



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**CAMBIOS EN LA MEMORIA VISUOESPACIAL  
DEPENDIENTES DE RECEPTORES CB1 EN  
RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO**

**T E S I S**

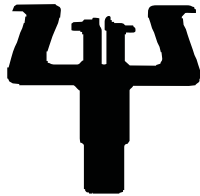
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

PRESENTA:

**CINTHYA ROCÍO GARCÍA VÁZQUEZ**

DIRECTOR DE TESIS: **DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ**

REVISOR: **DRA. ALEJANDRA EVELYN RUIZ CONTRERAS**



**FACULTAD  
DE PSICOLOGÍA**

**MÉXICO, D.F.**

**2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. David Erasmo García Díaz.

Gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (Clave del proyecto IN215813). Agradezco a la DGAPA-PAPIIT-UNAM por la beca recibida.

## Reconocimientos

Agradezco al Dr. David E. García por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por el tiempo, apoyo y experiencia que me brindo durante la realización de la tesis.

Muchas gracias a la Dra. Marina Martínez Vargas de la Facultad de Medicina por todo el apoyo, la experiencia y enseñanza brindada para la realización de las pruebas moleculares, perfusiones, así como la extracción de sangre, realizados para este trabajo.

Agradezco la colaboración de la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia del Instituto de Fisiología Celular y del Dr. Enrique Hong Chong del departamento de Farmacología Sede Sur del CINVESTAV en las mediciones de insulina en plasma.

Se reconoce la ayuda de la Dra. María de la Luz Navarro Angulo y de la Dra. Leticia Verdugo Díaz del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina por su colaboración con el equipo de mediciones de la presión arterial. Gracias al Dr. David Elías Viñas, al Ing. Esteban Ruíz y la Ing. Aime Salazar Anguiano del Departamento de Ingeniería Eléctrica sede Zacatenco del CINVESTAV los cuales proporcionaron el equipo de Bioimpedancia.

Se agradece al Dr. Enrique Pinzón Estrada, Jefe del Bioterio de la Facultad de Medicina, por proporcionar a los roedores utilizados en este trabajo. A la Dra. Irma Zarco Padrón de la Facultad de Medicina por proporcionar algunas ratas para experimentos.

Además, agradezco a Gabino Pérez por proporcionar el equipo para la medición de triglicéridos y al Ing. Amado García por el generador de ruido blanco.

Muchas gracias a la Bióloga Isabel Arenas y al Dr. Jorge Bravo Martínez de la Facultad de Medicina por su gran ayuda y apoyo técnico en este trabajo, y a Guillermo Luna por la valiosa ayuda en la construcción del laberinto de Barnes y el cuarto experimental, además a Luis Martínez, auxiliar de laboratorio por los cuidados que le dio a cada uno de los animales y el mantenimiento de la limpieza de los materiales del laboratorio.

Por último agradezco a la Dra. Alejandra Ruiz y a mis sinodales Oscar Prospéro, Hugo Sánchez y Rodrigo Pedroza por sus valiosas correcciones y comentarios para mejorar este trabajo. Al Dr. Víctor Rodríguez por su tiempo, experiencia y asesoría.

## Agradecimientos

A mi familia, a mis papas, por estar siempre conmigo, por saberme guiar, por quererme, cuidarme, también por preocuparse y regañarme; pero sobre todo por ayudarme a crecer, a cumplir mis metas y a ser una mejor persona, los quiero mucho. Y mis hermanos Luisito y Paola por estar conmigo, por su apoyo incondicional, por aguantar el mal humor después de las desveladas y el cansancio, porque hemos crecido juntos compartiendo experiencia y mucho amor; también a mi tía Nena por estar siempre pendiente, valoro mucho tu preocupación y el apoyo que me has dado toda la vida. Ustedes son las personas más importantes en mi vida y las que más quiero.

A mis compañeros y amigos de laboratorio:

Celes, por convertirte en una amiga y poder compartir contigo no solo esta experiencia de trabajo sino también ideas, pensamientos y sentimientos. Gracias por tu apoyo personal, moral y académico. Kari, por tus opiniones y discusiones que me han ayudado en esta formación y por supuesto, por la colaboración en el trabajo y los experimentos. Y Adrián, por la colaboración en los experimentos y los años compartidos que me dejaron conocerte mejor.

Al Dr, David García por adoptarme como parte no solo de su laboratorio, sino también de su familia, por consentirme y por compartir su experiencia académica y personal conmigo. A Isa, Arturito, Dr. Jorge, Liz, Héctor, Anahi y la Dra. Julieta, gracias por su familiaridad durante la estancia en el laboratorio, recuerden que a todos se les quiere! Muchas gracias al Sr. Luis, por siempre recibirme con una sonrisa, por ayudarnos con tantas cosas, sus ánimos fueron clave en este trabajo.

De manera especial quiero agradecer a la Dra. Marina Martínez por compartir su conocimiento conmigo y por toda la ayuda que me brindo, por su tiempo y confianza, sin usted este trabajo no habría sido posible.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Psicología por permitirme desarrollarme profesionalmente y darme la oportunidad de dedicarme a lo que más me apasiona.

Agradezco a mis amigos:

Mariana Zuñiga gracias por tu amistad, porque sé que puedo contar contigo siempre y porque con las niñas siempre me harán sacar una sonrisa, las quiero mucho. Julio, porque gracias a ti di un salto para llegar a donde estoy; porque desde muy pequeña me ayudaste a darme cuenta que saber es algo que me gusta

mucho, que la curiosidad, el conocimiento y sorprendernos de la vida son de las mejores cosas que pueden existir, gracias por ayudarme a sacar lo mejor de mí.

A Paola y Joel, por ser como unos hermanos con los que puedo compartir todo, porque en este camino han estado conmigo siempre y por todo lo que hemos vivido que nos ha hecho crecer.

A Rebeca, por ser mi amiga y porque sé que eres una persona en la que siempre puedo confiar, porque la carrera apenas comienza, continuemos con lo que sigue. A Alejandra Pérez, gracias por tu amistad, porque en estos años de carrera todas las cosas que pasamos juntas no las cambiaría por nada, contigo compartí muchas experiencias y aprendizaje y por eso formas una parte importante de mi vida.

Muchas gracias a Toñito y a Mike, porque como ya les he dicho más que mis vecinos son unos grandes amigos, y durante la realización de este trabajo ustedes estuvieron para escucharme en mis frustraciones, alegrías y por supuesto en las clásicas, espero que esto continúe por muchos años más.

Finalmente,...*gracias a esos seres que sacrificados por la experimentación cedieron nuevos horizontes a la vida, viejas y nuevas generaciones han visto alejar la muerte y el dolor. Gracias reiteradamente a esos "conejiillos de indias" que en aras de la ciencia, la enseñanza o la investigación mitigan la angustia, el dolor y la agonía del eterno sueño...*

A todos muchas gracias por formar parte de mi vida y de este camino académico.

# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>2</b>
<b>a) SÍNDROME METABÓLICO</b> .....	<b>4</b>
Fisiopatología del síndrome metabólico .....	4
Alteraciones metabólicas.....	8
Alteraciones cognitivas relacionadas al síndrome metabólico .....	10
<b>b) MEMORIA</b> .....	<b>13</b>
Modelo de memoria a corto plazo y memoria a largo plazo .....	14
Memoria declarativa y memoria no declarativa .....	18
Memoria visuoespacial.....	20
Bases anatómicas y neuroquímicas de la memoria visuoespacial.....	20
Laberinto de Barnes .....	23
<b>c) CANABINOIDES</b> .....	<b>26</b>
Absorción y metabolismo.....	27
Receptores a cannabinoides .....	28
Receptor a cannabinoides CB1 .....	29
Distribución de los receptores a cannabinoides CB1 .....	30
Cannabinoides endógenos.....	31
Cannabinoides sintéticos.....	34
Funciones del sistema.....	35
Cannabinoides: procesos de aprendizaje, memoria y plasticidad .....	36
Cannabinoides y conductas apetitivas, ingestión de alimentos y alteraciones metabólicas	38
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>41</b>
JUSTIFICACIÓN .....	42
OBJETIVOS .....	42
Objetivo general.....	42
Objetivos particulares .....	42
HIPÓTESIS .....	42
<b>IV. MÉTODO</b> .....	<b>43</b>
Sujetos .....	43
Diseño experimental.....	44
Fármacos.....	44
Parámetros físicos.....	45

Estereotaxia .....	49
Administración .....	49
Evaluación de memoria visuoespacial con Laberinto de Barnes .....	50
Extracción de RNA total de hipocampo y reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (PCR-RT).....	55
Western blot .....	56
Histología .....	58
Análisis estadístico:.....	58
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
Resultados metabólicos.....	59
Resultados conductuales .....	69
Resultados moleculares .....	71
Correlación entre resultados conductuales y resultados moleculares .....	74
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>94</b>
<b>VIII. REFERENCIAS.....</b>	<b>95</b>



## Abreviaturas

<b>(2-AG)</b>	2-araquidonil-glicerol
<b>(5 HT)</b>	5-hidroxitriptamina/ Serotonina
<b>(AC)</b>	Adenilato ciclasa
<b>(Ach)</b>	Acetilcolina
<b>(AM-251)</b>	1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H-pirazole-3-carboxamida
<b>(AMPc)</b>	Monofosfato cíclico de adenosina
<b>(Anandamida)</b>	N-araquidoniletanolamida
<b>(ATP III)</b>	Programa de tratamiento para adultos III
<b>(BDNF)</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>(CBD)</b>	Canabidiol
<b>(CBN)</b>	Canabinol
<b>(CREB)</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc
<b>(DA)</b>	Dopamina
<b>(dB)</b>	Decibeles
<b>(DM2)</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>(DMSO)</b>	Dimetil sulfóxido
<b>(ECV)</b>	Enfermedades cardiovasculares
<b>(FAAH)</b>	Hidrolasa de ácidos grasos amidados
<b>(FOXO)</b>	Factores de transcripción forkhead clase O
<b>(GAA)</b>	Glucosa alterada en ayuno
<b>(GABA)</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>(GLUT2)</b>	Transportador de glucosa tipo 2
<b>(GPCR)</b>	Receptores acoplados a proteínas G
<b>(HDL)</b>	Lipoproteína de alta densidad

<b>(IDF)</b>	Federación Internacional de Diabetes
<b>(ih)</b>	Intrahipocampal
<b>(IL-1<math>\beta</math>)</b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>(IL-6)</b>	Interleucina 6
<b>(IMC)</b>	Índice de masa corporal
<b>(ip)</b>	Intraperitoneal
<b>(LDL)</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>(LTP)</b>	Potenciación a largo plazo
<b>(MAGL)</b>	Lipasa de monoacilglicerol
<b>(MAPK)</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos
<b>(MCP)</b>	Memoria a corto plazo
<b>(MLP)</b>	Memoria a largo plazo
<b>(MVE)</b>	Memoria visuoespacial
<b>(NAES)</b>	N-acetil-etanolaminas
<b>(NAPE)</b>	N-acil fosfatidiletanolamina
<b>(NMDA)</b>	N-metil D-aspartato
<b>(NOM)</b>	Norma oficial mexicana
<b>(NPH)</b>	Núcleo paraventricular hipotalámico
<b>(OMS)</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>(ON)</b>	Óxido nítrico
<b>(PCR)</b>	Proteína C reactiva
<b>(PCR-TR)</b>	Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa
<b>(PGAM)</b>	Peptidil glicina $\alpha$ -amida monooxigenasa
<b>(PIP2)</b>	Fosfoinositol-bis-fosfato
<b>(PKA)</b>	Proteína cinasa dependiente de AMPc
<b>(RI)</b>	Resistencia a la insulina

<b>(RNA)</b>	Ácido ribonucleico
<b>(ROS)</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>(rpm)</b>	Revoluciones por minuto
<b>(SeC)</b>	Sistema endocanabinoide/Canabinérgico
<b>(SIDA)</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>(SM)</b>	Síndrome metabólico
<b>(SNC)</b>	Sistema nervioso central
<b>(SNP)</b>	Sistema nervioso periférico
<b>(TGA)</b>	Tolerancia a la glucosa alterada
<b>(TNF-<math>\alpha</math>)</b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>(VIH)</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>(WIN55 212-2)</b>	(R)-(+)-WIN 55,212-2 mesilato de sal
<b>(<math>\Delta</math>9- THC)</b>	$\Delta$ 9-Tetrahidrocanabinol

# CAMBIOS EN LA MEMORIA VISUOESPACIAL DEPENDIENTES DE RECEPTORES CB1 EN RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO

## I. RESUMEN

Recientemente la obesidad y el síndrome metabólico (SM) se han convertido en una epidemia que está causando serios problemas de salud. El aumento en el consumo de refresco es una de las principales causas del desarrollo del SM. El SM se ha vinculado con deterioro cognitivo leve que puede progresar a demencia, provocando alteraciones en la conducta y daños en las funciones cognitivas, como es el caso de la memoria visuoespacial (MVE).

Diversos estudios han considerado al sistema canabinoide (SeC) como crucial para hablar de obesidad y trastornos metabólicos. Así mismo en el hipocampo, este sistema juega un papel importante en la modulación de la memoria. Los objetivos de este estudio fueron evaluar las complicaciones que el SM ocasiona en la MVE en un modelo de rata y relacionarlos con alteraciones en los receptores CB1 en el hipocampo.

Los resultados muestran que una dieta alta en sacarosa conduce al desarrollo de SM y ocasiona un incremento de errores en una evaluación de MVE con el laberinto de Barnes, después de 12 semanas de tratamiento, similar al que se observa cuando se administra WIN55 212-2; sin embargo, la ejecución del laberinto de los sujetos con SM no es significativamente diferente respecto del control. También se muestra, que la inhibición del SeC con el antagonista AM-251, revierte el deterioro leve de la curva de aprendizaje en los sujetos con SM y puede representar una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento del SM y de daños en la memoria.

**Palabras clave:** síndrome metabólico, memoria visuoespacial, receptores CB1, hipocampo.

## II. ANTECEDENTES

En la actualidad, la obesidad es un problema a nivel mundial que ha incrementado de manera alarmante, a tal grado que se ha convertido en una epidemia (OMS, 2012; Grundy, 2004). México se ha colocado en el primer lugar del mundo en padecer obesidad, tanto en niños como en adultos, 70% de la población tiene sobrepeso (25-29.9 de IMC) y un tercio de ellos obesidad (>30 de IMC) (ONU, 2013). La Federación Internacional de Diabetes (IDF) reporta que una cuarta parte de los adultos del mundo tienen síndrome metabólico (SM) y tienen un riesgo cinco veces mayor de desarrollar diabetes tipo 2 (DM2); esto pone al SM y a la DM2 por encima de las cifras de morbilidad y mortalidad respecto de VIH/ SIDA (IDF, 2011).

Las principales causas del desarrollo de SM han sido el aumento en el consumo de refresco, la proliferación de comida chatarra y la vida sedentaria (Instituto Nacional de Salud Pública, INSP, 2011), que se ven reflejadas en un desbalance entre el consumo calórico y el gasto energético, donde las investigaciones se han centrado para estudiar este problema. Esta epidemia está causando serios problemas de salud a mediano y largo plazo, los cuales ya están siendo reportados y estudiados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que por año fallecen al menos 2,8 millones de personas como consecuencia del sobrepeso o la obesidad. Estas últimas son unas de las principales causas de la aparición de enfermedades crónicas, cardiovasculares y DM2 (Grundy, 2004; Razay, 2007). También se ha relacionado con ciertos tipos de cáncer y trastornos de sueño (Grundy, 2004).

Además, se ha vinculado al SM con deterioro cognitivo leve (Razay, 2007; Frisardi, 2012) que puede progresar a demencia (Frisardi, 2012), modificaciones en la conducta y daños

en las funciones cognitivas, como es el caso de la memoria visuoespacial (MVE) (Dinel, 2011; Van der Kommer et al., 2012; Molteni, 2002; Pistell, 2010; Farr, 2008).

De acuerdo con lo anterior, el interés de este trabajo se centra específicamente en las alteraciones que el SM ocasiona en la MVE. Para este propósito se ha estudiado en un modelo de rata enfocado al sistema endocanabinoide (SeC). Diversos trabajos han considerado crucial el estudio del SeC, por su relación con los mecanismos de recompensa y homeostáticos, en la comprensión de las alteraciones que producen los trastornos metabólicos como la obesidad. Así mismo, este sistema tiene un papel relevante en la modulación de la memoria.

Aunque ya se ha estudiado la participación del SeC con relación a la obesidad, el SM (Chen, 2013; Nunn, 2010; Di Marzo, 2001; Bermúdez et al., 2009; Pagotto, 2006; Méndez-Díaz et al., 2010; Fride, 2007; Engeli, 2008) y a la memoria (Lichtman, 1999; Abush, 2010; Robinson, 2008; De Oliveira, 2008; Davies, 2002; Rueda-Orozco, 2008) por separado, no existen estudios en donde se describa la relación que existe entre los receptores a canabinoides 1 (CB1), el SM y los cambios que se producen en la MVE.

Esta tesis tiene como objetivo analizar los cambios en la MVE en ratas con SM y su correlación con modificaciones en la densidad de los CB1. Se evaluó la MVE por medio del protocolo de laberinto de Barnes a cinco grupos de ratas Wistar macho. Tres grupos que consumieron una dieta control (rat *Chow* 5001 y agua simple *ad libitum*). Dos grupos que consumieron una dieta hipercalórica (rat *Chow* 5001 y agua al 20% sacarosa *ad libitum*) para desarrollar SM con el modelo estandarizado por el grupo de Larqué en el 2011. Para probar la participación del SeC en estos procesos, se usaron el antagonista y el agonista a receptores CB1 (WIN 55,212-2 y AM251 respectivamente). Finalmente, los

resultados se correlacionaron con la cuantificación de la densidad de receptores CB1 a través de PCR-TR y Western blot.

## **a) SÍNDROME METABÓLICO**

### **▪ Fisiopatología del síndrome metabólico**

El Síndrome Metabólico (SM) es la conjunción de varias alteraciones de riesgo en un mismo individuo que aumentan la probabilidad de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV) (angina de pecho, infarto al miocardio, apoplejía, enfermedad arterial periférica, insuficiencia cardiaca congestiva -IDF, 2012- ), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hígado graso, trastornos de sueño y algunos tipos de cáncer (Grundy, 2004). En 1988 Reaven y colaboradores observaron que varias alteraciones metabólicas (dislipidemia, hipertensión, hiperglucemia) tendían a manifestarse en conjunto, a ésta condición la llamaron síndrome X. Posteriormente, fue denominado síndrome de resistencia a la insulina, ya que postulaban que la resistencia a la insulina era la base de éste síndrome. Finalmente, en 1998 el término SM se introdujo como entidad diagnóstica con criterios definidos por la OMS (Pineda, 2008) (Tabla 1).

La definición más utilizada es según los criterios establecidos en el 2001 por el Programa de Tratamiento para Adultos III (ATP III) (Tabla1), por un conjunto de signos y síntomas metabólicos entre los que destacan: obesidad abdominal (central), dislipidemia (alteración en las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en la sangre), presión sanguínea elevada (hipertensión), resistencia a la insulina (captación inadecuada de glucosa dependiente de insulina), intolerancia a la glucosa (valores elevados de glucosa en sangre), estado preinflamatorio (elevación de proteína C reactiva) y protrombótico (aumento de plasma inhibidor del activador del plasminógeno (PAI)-1 y el fibrinógeno),

colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) alto o lipoproteína de alta densidad (HDL) bajo y aumento de triglicéridos (Grundy, 2004). Si se presentan al menos tres de las alteraciones metabólicas mencionadas, puede diagnosticar SM.

**Tabla 1. Criterios de diagnóstico del síndrome metabólico** (tomada y modificada de Grundy, 2004).

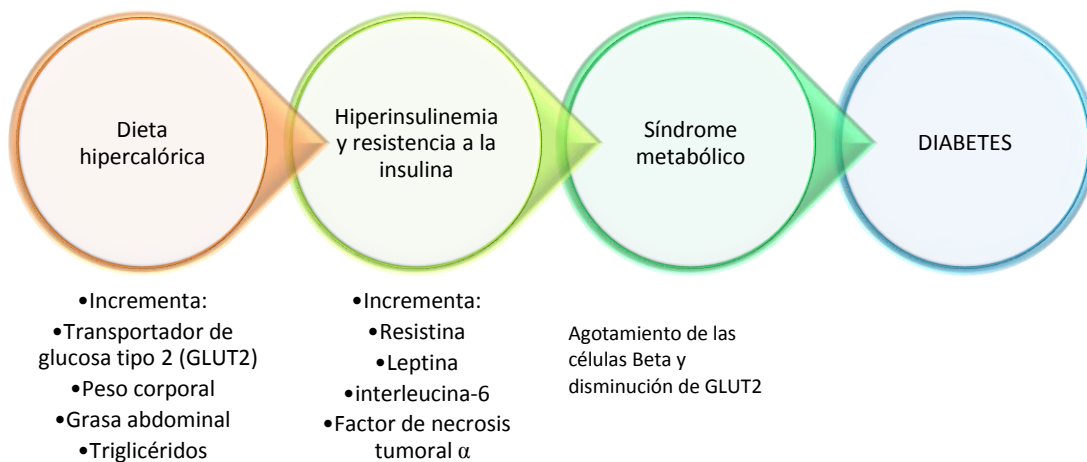
<b>Criterios de diagnóstico del síndrome metabólico según el ATP III (2001)</b>	<b>Criterios de diagnóstico del síndrome metabólico según la OMS (1998)</b>
Obesidad abdominal: circunferencia abdominal >102 cm en varones y >88 cm en mujeres; Hipertrigliceridemia: $\geq 150$ mg/dL (1,69 mmol/l);	Alteración de la regulación de la glucosa: glucosa en ayunas $>110$ mg/dL y/o 2 h postcarga $\geq 140$ mg/dL; Resistencia a la insulina: captación de glucosa por debajo del percentil 25 en clamp euglicémico- hiperinsulinémico;
HDL – colesterol: $<40$ mg/dL (1,04 mol/L) en varón y $<50$ mg/dL(1,29 mol/L) en mujer; Presión arterial: $\geq 130/85$ mmHg;	Hipertensión arterial: presión arterial $\geq 140/90$ mg/dL; Dislipidemia: triglicéridos $\geq 150$ mg/dL y/o colesterol HDL $<35/39$ mg/dL en varón/mujer;
Glucemia basal en ayunas: $\geq 110$ mg/dL (6,1 mmol/L).	Obesidad: índice cintura/cadera $>0,9/0,85$ en varón/mujer y/o IMC $>30$ kg/m <sup>2</sup> ; Microalbuminuria: excreción urinaria de albúmina $\geq 20$ µg/min.

Tratamiento para adultos III (ATP III), Organización mundial de la salud (OMS), lipoproteína de alta densidad (HDL), índice de masa corporal (IMC).

Dietas altas en sacarosa o glucosa, y grasa, acompañadas de baja actividad física pueden provocar SM. Entre los modelos que se han utilizado para inducir SM está modificar la dieta de los roedores, aumentando la cantidad de grasa o azúcar. Por ejemplo, al cambiar en la dieta el suministro de agua simple por agua con sacarosa al 20% (p/v). Los estudios de Larqué y colaboradores (2011) han mostrado que después de 8 semanas con dicha dieta, se observa que en los islotes  $\beta$  pancreáticos aumenta la cantidad total del transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2). Cuando esto ocurre entonces hay una mayor entrada de glucosa a las células y eso se refleja en un incremento en la secreción de insulina, lo cual provoca hiperinsulinemia, resultado que representa una de las primeras respuestas moleculares en el SM.



En el SM la resistencia periférica a la insulina, modificaciones sobre la síntesis y degradación de la glucosa y el metabolismo de los lípidos son signos y una advertencia importante para el desarrollo de la DM2 (Fig 1). Asimismo, las células beta son continuamente estimuladas y secretan altas cantidades de insulina. Con el paso del tiempo, se agotan y son incapaces de secretar la hormona suficiente para mantener los niveles normales de glucosa, entonces, se desarrolla hiperglucemia. Los mecanismos celulares que conducen a la hipersecreción de insulina en las primeras etapas de SM podría implicar la cadena de eventos en el acoplamiento de glucosa estimulada por secreción de insulina, tales como un aumento en los transportadores de glucosa, enzimas o canales iónicos (Larqué et al., 2011).




---

**Fig 1. Modelo del desarrollo de SM.** El modelo que muestra como las dietas con alto contenido calórico inducen al incremento en la secreción de adipocitos, cambios en las células beta y en la expresión de GLUT2 provocando hiperinsulinemia que puede conducir a síndrome metabólico y finalmente a diabetes (Tomado y modificado de Larqué et al., 2011).

---

En el modelo de SM en ratas con la dieta donde se incrementa la sacarosa (Larqué et al., 2011) se encontró un incremento en los niveles de plasma de insulina y de los niveles de

triglicéridos; además, un aumento en la presión arterial sistólica y alteraciones de la frecuencia cardíaca; cabe señalar que las investigaciones no reportan datos acerca de la presión diastólica y ésta es determinante de hipertensión en el humano. Finalmente, muestran un aclaramiento más lento en la curva de tolerancia a la glucosa (Larqué et al., 2011). Dichas alteraciones son uno de los puntos clave de esta investigación.

### **Alteraciones metabólicas**

- **Obesidad central y sobrepeso:** se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2012). Se conoce como obesidad central a la acumulación excesiva de tejido adiposo en el área abdominal. Esta puede agravar ciertos factores de riesgo metabólicos, por ejemplo, causa incremento de citocinas, y esto puede provocar un estado preinflamatorio (Grundy, 2004). Para identificar el sobrepeso y la obesidad se utiliza el índice de masa corporal (IMC) o índice de Quetelet, éste es un indicador de la relación entre el peso y la talla. Se calcula dividiendo el peso en kilos de una persona entre el cuadrado de su talla en metros (m<sup>2</sup>). La clasificación de la OMS se puede revisar en la Tabla 2.

**Tabla 2. Clasificación del estado nutricional**

<b>Clasificación</b>	<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>
<b>Desnutrición</b>	< 18.5
<b>Peso adecuado</b>	18.5 - 24.9
<b>Sobrepeso</b>	25.0 - 29.9
<b>Obesidad I</b>	30 - 34.9
<b>Obesidad II</b>	35 – 39.9
<b>Obesidad III</b>	≥ 40

Índice de masa corporal (IMC)

La principal causa del sobrepeso y la obesidad es un desbalance entre el consumo calórico y el gasto energético (INSP, 2012). La obesidad es uno de los principales factores que contribuyen a la alteración del transporte de glucosa e insulina (Kahn, 2004).

- **Resistencia a la insulina (RI) / Hiperinsulinemia:** la insulina es la hormona producida por el páncreas que permite que la glucosa entre en las células del cuerpo, donde se convierte en la energía necesaria para la vida diaria. La RI es un trastorno fisiopatológico que depende de alteraciones en los receptores a insulina (INSR) y defectos intracelulares (Carrillo et al., 2006). Se produce cuando existe una deficiencia en los efectos que ocasiona la insulina sobre la captación, el metabolismo o el almacenamiento de la glucosa (Kahn, 2004; Ganong, 2006; Martínez de Morentin et al., 2003). La hiperinsulinemia resulta de la RI debido a que hay un incremento en la secreción de insulina, esto con la finalidad de compensar el desequilibrio que hay en el mantenimiento de la glucosa, y produce regulación a la baja de los INSR, por la desensibilización de vías pos-receptoras. Se considera RI cuando HOMA (*homeostasis model assessment*) es mayor que o igual a 3.8 mUI/dl. Cuando el mecanismo compensador se agota o resulta insuficiente se desarrolla intolerancia a la glucosa y/o DM2 (Kahn, 2004; Martínez de Morentin et al., 2003).

La RI y la hiperinsulinemia, así como la obesidad pueden ser mecanismos etiopatogénicos comunes que conducen a factores de riesgo de ECV y alteraciones en el metabolismo tales como la hipertensión arterial (Carrillo et al., 2006; Martínez de Morentin et al., 2003; González Sarmiento et al., 2008).

- **Hipertensión arterial:** es el término que se utiliza para definir a la tensión arterial alta. La presión arterial es producto del gasto cardiaco y la resistencia periférica; a medida que

el corazón bombea sangre a través del cuerpo, se puede ver afectada por trastornos que modifican uno o ambos factores (Ganong, 2006). Los niveles normales de presión sistólica son de 120 mmHg y de presión diastólica están alrededor de 70 mmHg en posición sentada o en decúbito. La OMS considera hipertensión cuando la tensión arterial sistólica es  $\geq 140$ , o la presión arterial diastólica es  $\geq 90$ .

La presión arterial puede aumentar por diferentes mecanismos activados por la hiperinsulinemia como son el aumento en la reabsorción tubular renal de sodio, la activación del sistema nervioso adrenérgico, la alteración de la función endotelial y las modificaciones del intercambio iónico transmembrana (Carrillo, 2006; Martínez de Morentin et al., 2003; De Fronzo et al., 1991).

- **Tolerancia alterada a la glucosa:** las personas que tienen altos niveles de glucosa en sangre (70 -100 mg/dL), pero que no alcanzan los niveles para diagnosticar DM2 (>126 mg/dL), son denominadas como tolerancia alterada a la glucosa o intolerancia a la glucosa (IDF, 2011). Ésta puede ser medida en dos condiciones, en ayuno o después de comer (con una carga de glucosa) (Tabla3).

**Tabla 3. Criterios diagnósticos de normalidad, prediabetes y diabetes**  
(Tomada de Friege et al., 2010).

Diagnostico metabólico	Glucosa Plasmática (MG/DL)	
	Ayuno (8 hrs)	2hrs postcarga de glucosa
<b>Normal</b>	<100	<140
<b>GAA</b>	100-125	<140
<b>TGA</b>	<100	140-199
<b>GAA+TGA</b>	100-125	140-199
<b>Diabetes</b>	$\geq 126$	$\geq 200$

Glucosa alterada en ayuno (GAA), tolerancia a la glucosa alterada (TGA)

La intolerancia a la glucosa se asocia generalmente con obesidad y las personas que la padecen tienen un mayor riesgo de desarrollar DM2, sin embargo, no todas terminan con esta enfermedad.

- **Dislipidemias:** se define como dislipidemia a la alteración en la concentración normal de los lípidos en la sangre (Grundy, 2004). Esta se manifiesta con un incremento de triglicéridos (hipertrigliceridemia), bajas concentraciones de colesterol HDL y alta proporción de LDL, así como elevación en la apolipoproteína B (Grundy, 2004; IDF, 2011). Los valores promedio son: hipertrigliceridemia  $\geq 150$  mg/dL; HDL  $<35$  mg/dL.

Las dislipidemias generalmente son producidas o están acompañadas de otras alteraciones metabólicas. En estudios longitudinales (con sujetos de una media de 65 años) se encontró que niveles elevados de triglicéridos y niveles elevados de inflamación se asocian con un nivel más bajo de rendimiento de la memoria (Van der Kommer et al., 2012). Por esta razón tanto las lipoproteínas como los lípidos y la obesidad han sido relacionadas con demencia y con deterioro cognitivo (Van der Kommer et al., 2012; Farr et al., 2008).

### **Alteraciones cognitivas relacionadas con el síndrome metabólico**

Evidencia reciente muestra una alta incidencia de alteraciones cognitivas que se asocian con el SM. Distintos estudios experimentales (Dinel, 2011; Van der Kommer et al., 2012; Molteni, 2002; Pistell, 2010; Farr, 2008) y con humanos (Razay, 2007; Frisardi et al., 2012; Frisardi et al., 2010; Yaffe et al., 2004) han abordado los mecanismos fisiológicos mediante los cuales las alteraciones metabólicas que conllevan al SM afectan el cerebro, por lo tanto, los procesos cognitivos como: atención, aprendizaje y memoria; sin embargo, no se han entendido del todo los componentes que pueden estar asociados.

Dentro de las investigaciones que se han realizado con humanos (con una media de edad de 75 años), los resultados apuntan a que el SM está relacionado con un deterioro cognitivo leve que puede progresar hacia demencia (Frisardi et al., 2012; Razay, 2007); incluso se ha propuesto un término para nombrar a los pacientes con SM más deterioro cognitivo de origen vascular; este modelo fisiopatológico es conocido como “síndrome metabólico-cognitivo” (Frisardi et al., 2012). Así mismo, se ha correlacionado el SM con el Alzheimer (Razay, 2007; Frisardi, 2010); se considera que se debe a alteraciones en los mecanismos de la insulina que pueden regular la agregación de proteína  $\beta$  amiloide para luego formar placas seniles (Razay, 2007) aunque aún no se han establecido bien los mecanismos que pueden estar involucrados.

Para la evaluación de las capacidades cognitivas con los pacientes (de 75 años) se han utilizado pruebas neuropsicológicas (*The Teng Modified Mini-Mental State Examination* 3MS) (Yaffe, 2004; Razay, 2007; Van der Kommer et al., 2012) y estudios longitudinales con lo que comprueban que los pacientes con SM obtienen un puntaje menor o bien tienen una incidencia del SM como factor para el desarrollo y diagnóstico de déficit cognitivo o demencia (Yaffe, 2004; Razay, 2007, Frisardi et al., 2010).

Por otro lado, se han realizado pruebas en distintos modelos animales con SM (dietas altas en grasa (Dinel, 2010; Pistell, 2010), dieta alta en azúcar refinada (Molteni, 2002) y ratones *knock-out* db/db (Dinel, 2010); todos coinciden en sus resultados en que hay un déficit en funciones cognitivas. Las alteraciones cognitivas pueden estar asociadas a inflamación central, neuroinflamación y activación de citocinas en ciertas zonas del cerebro (Dinel, 2011). Las investigaciones señalan que hay un incremento de citocinas inflamatorias como interleucina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), proteína C reactiva (PCR) y una disminución de factor neurotrófico derivado del

cerebro (BDNF) en hipocampo (Dinel, 2011; Van der Kommer et al., 2012; Molteni, 2002; Yaffe, 2004; Pistell, 2010). También están implicados otros factores como el incremento de lipoproteínas, lípidos e inflamación (Van den Kommer, 2012), aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden llevar a estrés oxidativo, modificaciones en la liberación del óxido nítrico (ON) y, finalmente, afectan receptores NMDA, ya que disminuye su activación porque hay una menor entrada de  $Ca^{2+}$  alterando la inducción y el mantenimiento de la LTP, elementos importantes para los procesos de memoria (Farr et al., 2008); sin embargo, no es posible determinar que estos son los únicos procesos y/o mecanismos y consecuencias que están implicados.

Aunado a los análisis para determinar los niveles de citocinas, los estudios experimentales con los modelos en ratas y ratones utilizan paradigmas cognitivos y conductuales como laberintos (laberinto de Morris, laberinto en T, laberinto Y, laberinto elevado en cruz) (Farr et al., 2008; Dinel, 2011; Pistell, 2010). Para la evaluación de memoria dependiente de hipocampo, la cual parece ser una de las principales funciones cognitivas que se ven afectadas por el SM, especialmente la memoria visuoespacial (MVE); este es uno de los objetivos en este trabajo.

## **b) MEMORIA**

El aprendizaje se ha definido como el proceso para adquirir nueva información, mientras que la memoria involucra el almacenamiento de dicha información y la capacidad para usar el conocimiento adquirido como producto de la experiencia (Bermúdez y Prado, 2001). Estos procesos se logran a través de cambios persistentes en las relaciones entre las neuronas, ya sea a través de modificaciones estructurales y/o eventos bioquímicos en el interior de las neuronas, que determinan cambios en la manera en la cual las neuronas se comunican (Bear et al., 2001; Kandel et al., 2001). Tanto el aprendizaje como la memoria son propiedades del sistema nervioso que permiten adquirir, retener y evocar diferentes tipos de información (Bermúdez y Prado, 2001).

Los estudios científicos de la memoria comenzaron en 1885 con la investigación de Herman Ebbinghaus (Bermúdez y Prado, 2001), quien desarrolló un experimento sencillo en el que utilizó listas de sílabas sin sentido, con el que realizó un análisis sistemático de la memoria humana. Ebbinghaus encontró que la memoria se establecía gradualmente y que había una correlación directa entre las veces que se realiza una tarea y la cantidad de información que recordaba (Bermúdez y Prado, 2001). Estos principios siguen vigentes actualmente y dieron pie a investigaciones posteriores.

Por ejemplo, un caso que ayudó al entendimiento de la memoria fue el del paciente H.M., un hombre a quien le extirparon quirúrgicamente los lóbulos temporales mediales con el objetivo de parar las crisis epilépticas que padecía. Este caso ayudó al entendimiento de la memoria; gracias a los estudios y las pruebas que realizaron Brenda Milner y William Scoville con H.M (Milner et al., 1998), pudieron establecer que existen distintos tipos de memoria y que al parecer están localizadas en diferentes zonas del cerebro.



Encontrar una respuesta a ¿cómo y en dónde almacenamos la información? ha sido desde hace muchos años un gran reto y motivo de investigaciones para poder revelar uno de los procesos más complejos que podemos realizar. Diversas aproximaciones experimentales han tratado de contestar a estas cuestiones y se han basado principalmente en tres preguntas: ¿cuántos tipos de memoria existen?, ¿qué regiones del cerebro están involucradas? Y ¿cuáles son los correlatos fisiológicos que se encargan de estos procesos? Una pregunta complementa a la otra y demuestra que la memoria se puede estudiar desde distintas perspectivas.

Así pues la memoria se ha categorizado de diferentes maneras. Se han realizado modelos teóricos que pueden predecir el curso temporal de la memoria, es decir, cuánto tiempo podemos mantener la información que se ha adquirido.

- **Modelo de memoria a corto plazo y memoria a largo plazo**

El primer modelo hace referencia al tiempo que permanece la información con nosotros. El trabajo de Ebbinghaus anticipó esta primera división de la memoria y fue formalizado en 1890 con William James, él fue el primero en sugerir la existencia de dos tipos de memoria, una memoria primaria (la información constituye el foco de nuestra atención) y una memoria secundaria (conocimientos de eventos pasado). Estas se conocen actualmente como la memoria a corto plazo (MCP), la cual tiene una duración limitada, puede durar desde segundos hasta minutos, y poca capacidad. Y la memoria a largo plazo (MLP), que tiene una mayor capacidad y puede ser permanente (Bermúdez y Prado, 2001).

La idea de que la MCP y MLP son las dos formas de almacenar la información la describieron más detalladamente Atkinson y Shiffrin en el modelo que propusieron (1968, citado en Smith y Kosslyn, 2008; Bermúdez y Prado, 2001). Lo llamaron modelo modal y sugiere que la información del entorno se registra mediante los receptores sensoriales (memoria sensorial, guarda una representación sensorial de un estímulo que persiste cerca de milisegundos después que desaparece la señal sensorial), luego ésta pasa a la MCP y, por medio de estrategias, como ensayo y codificación, se almacena en la MLP (Smith y Kosslyn, 2008) (Fig 2).



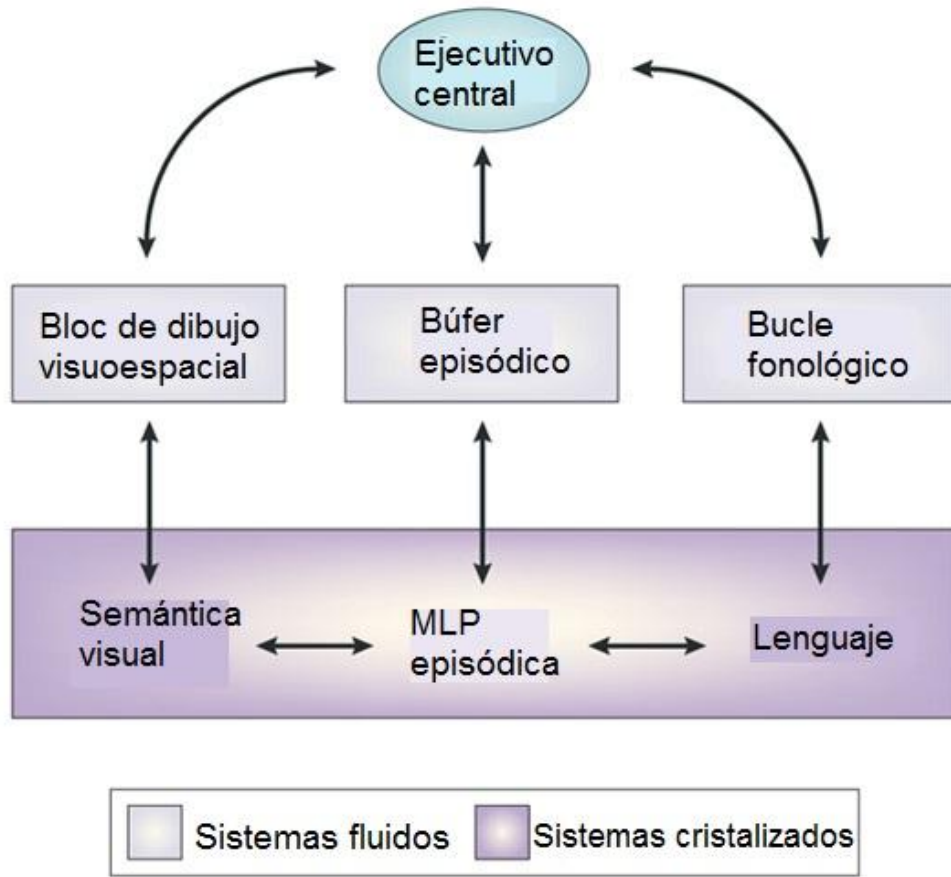
**Fig 2. Modelo modal de la memoria propuesta por Atkinson y Shiffrin.** La información ambiental es procesada por los registros sensoriales en varias modalidades físicas y entra en el almacén de corto plazo (MCP). La información permanece temporalmente en este almacén, su duración está en función de los procesos de control. Mientras la información está en la MCP y es ensayada puede ser copiada en el almacén de largo plazo (MLP) (tomada y modificada de Atkinson y Shiffrin, 1971).

El modelo de Atkinson y Shiffrin fue muy criticado porque resultaba ser secuencial y con pacientes como H.M. se comprobó que aunque su MCP estaba intacta, tenía la incapacidad de pasar la información al almacén de largo plazo.

El término memoria de trabajo fue inventado por Milner, Galanter y Pribram, y fue adoptado por Baddeley y Hitch para enfatizar las diferencias entre el modelo de tres componentes y los modelos unitarios de la MCP (Baddeley, 2003). El modelo de tres componentes de la memoria de trabajo, comprenden un sistema de control de atención limitada, llamada ejecutivo central, y dos sistemas de almacenamiento subsidiarios denominados bucle fonológico (verbal) y el bloc de dibujo visuoespacial (visuoespacial), los cuales se han ido modificando los últimos años (Baddeley, 2003) .

El bucle fonológico evolucionó para facilitar la adquisición de la lengua y para dominar nuevas palabras, que comprenden secuencias desconocidas de fonemas; el bloc de dibujo visuoespacial tiene la capacidad de sostener y manipular representaciones visuales y espaciales. El ejecutivo central funciona como una reserva de capacidad de procesamiento general. Sin embargo, en el primer modelo propuesto tenía problemas para interactuar con la MLP y carecía de un sistema por el cual podría ocurrir 'fragmentación', permitiendo complementar recuerdo serial inmediato con la información de la MLP. Por lo que se propuso un cuarto componente, el búfer episódico, un almacén de capacidad limitada que une la información para formar episodios integrados (Fig 3) (Baddeley, 2003).

Actualmente la memoria de trabajo se conoce como un sistema que mantiene y almacena la información en el corto plazo; además, puede manipular y crear nuevas representaciones, en lugar de solo activar viejos recuerdos (Baddeley, 2003).



**Fig 3. Modelo de la memoria de trabajo de múltiples componentes.** Las áreas de color púrpura oscuro representan el conocimiento a largo plazo o cristalizado. El buffer episódico proporciona una interfaz entre los subsistemas de memoria de trabajo y memoria a largo plazo (MLP). (Tomada y modificada de Baddeley, 2003).

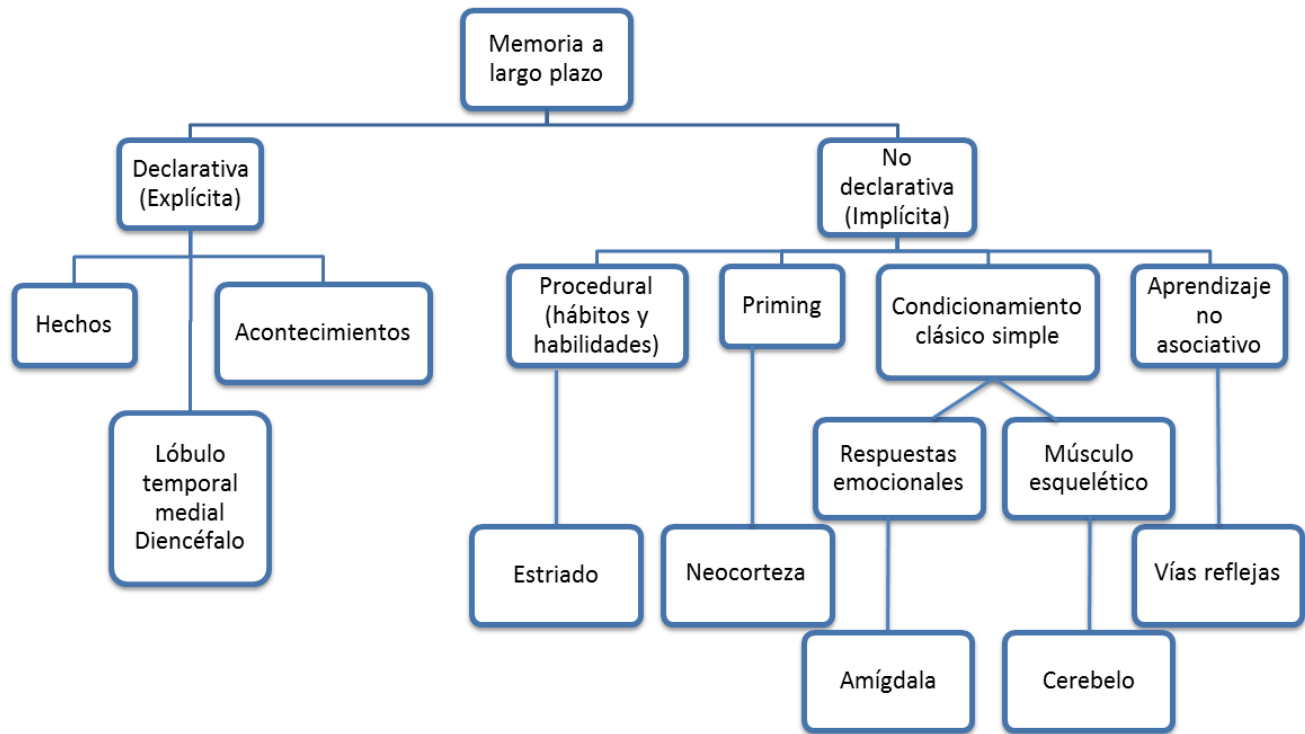
Los modelos teóricos para describir la memoria se realizaron tomando en cuenta distintas categorías; basados en cuanto dura la memoria se realizaron modelos cuantitativos como el que ofrecen Atkinson y Shiffrin. Squire describe una subdivisión de la MLP basada en la naturaleza de la información almacenada, de forma que esta pertenece a un modelo cualitativo (Squire, 2004).

- **Memoria declarativa y memoria no declarativa**

Los teóricos creen que hay múltiples formas de MLP, que estas tienen propiedades de procesamiento de la información diferentes y que cada una puede depender de estructuras cerebrales distintas. Larry Squire (1986) propuso que estas formas podían clasificarse en dos grandes subsistemas, como memoria declarativa y memoria no declarativa (Bear, 2001; Kandel, 2000; Squire, 2004).

La memoria declarativa (o memoria explícita) aborda hechos y acontecimientos, se recuerda con esfuerzo consciente y deliberado, también la han llamado memoria de personas lugares y objetos (Bear, 2001; Smith y Kosslyn, 2008). El psicólogo Endel Tulving fue el primero en clasificar la memoria explícita en episódica y semántica (Kandel, 2000). La memoria semántica se encarga de recuerdos de hechos particulares, no involucra ninguna estructura de eventos o ubicación témporo-espacial, por ejemplo datos concretos como hechos y conocimientos del mundo. La memoria episódica es aquella que hace referencia a eventos que ocurrieron en un lugar y tiempo específicos, de manera personal, su recuerdo puede incluir una gran variedad de tipos de información: contextual, visual, auditiva, olfativa, somestésica, temporal, espacial, emotiva. La memoria episódica es autobiográfica (Bear, 2001; Smith y Kosslyn, 2008, Kandel, 2000).

La memoria no declarativa (se conoce también como memoria implícita) se refiere a la información sobre cómo realizar algo, por ejemplo aprender a manejar o andar en bicicleta, y una vez que esta se automatiza se puede evocar de manera inconsciente (Bear, 2001; Smith y Kosslyn, 2008; Kandel 2000). Estas pueden ser de diversas categorías. Squire las clasifica en el modelo de la taxonomía de la memoria (Fig 4) (Squire, 2004).



**Fig 4. Taxonomía de la memoria a largo plazo.** Ésta clasifica las estructuras cerebrales y conexiones que se cree son especialmente importantes para cada tipo de memoria, declarativa y no declarativa (tomado y modificado de Squire, 2004).

Tulving describió que un sistema de memoria se puede dividir en tres mecanismos que interactúan: adquisición o codificación, consolidación y evocación (Tulving, 2002). La codificación es la forma en que ingresa la información nueva y se convierte en una representación de memoria; la consolidación es la modificación de estas representaciones en la memoria para que se vuelvan estables, esta implica la expresión de los genes y la síntesis de nuevas proteínas, que inducen a cambios estructurales para que finalmente podamos manipular y usar esa información y si es necesario traer de nuevo al presente los recuerdos, (evocarlos; Tulving, 2002; Smith y Kosslyn, 2008; Kandel, 2000).

H.M., era incapaz de retener más de un minuto información sobre personas, lugares u objetos, es decir, sus problemas revelaban una alteración en la memoria declarativa;

además tenía una grave dificultad con la orientación espacial (Kandel, 2000; Bear, 2001; Milner et al., 1998), un tipo específico de memoria declarativa, llamada memoria espacial o visuoespacial, que es objeto de estudio del presente trabajo.

- **Memoria visuoespacial**

La memoria visuoespacial se refiere a la capacidad de recuperar información sobre el entorno o el contexto, para orientarse y ubicarse a través de claves visuales (Sharma et al., 2010). Su objetivo final es el almacenamiento de la representación espacio-perceptual de los lugares a los que se expone un animal (Barnes, 1988; Sharma et al., 2010; Kandel, 2007). La evocación de esta información, para la solución de tareas, requiere de la asociación entre las características sensoriales del medio ambiente y las señales visuoespaciales. Este proceso asociativo se complementa con la memoria de trabajo, ya que permite la recuperación de la información incluso después de que las señales ya no están.

- **Bases anatómicas y neuroquímicas de la memoria visuoespacial**

Los estudios de Penfield, Milner y Scoville, con pacientes que tenían lesiones en los lóbulos laterales, incluido H.M., mostraron que los daños en estos causaban deterioro en el aprendizaje y la memoria (Milner et al., 1998). El trabajo de Milner y colaboradores así como recientes investigaciones (Konishi y Bohbot, 2013) proveen evidencia de que la memoria declarativa y la consolidación están relacionadas con el lóbulo temporal medial, en especial con el hipocampo (Milner et al., 1998). Además, se encontró, en roedores y con el empleo de laberintos, que daños en el hipocampo producen un notable deterioro en el aprendizaje y en la memoria para recordar la información espacial -el hipocampo

derecho ha sido relacionado específicamente con tareas de MVE- (Barnes, 1988; Klur et al., 2009).

El hipocampo se ha distinguido como una estructura fundamental para la memoria (Barnes, 1988; Klur, 2009; Milner et al., 1998; Ievglevskiy et al., 2012), este posee tres vías principales: la vía perforante, la vía de las fibras musgosas y la vía colateral de Schaffer (Per Andersen, 1971; Kandel, 2000). Aunado a los estudios comportamentales con relación al hipocampo, se encuentran los estudios electrofisiológicos (Ievglevskiy et al., 2012).

Bliss y Lømo (1973) descubrieron que cuando se estimulaba tetánicamente (100 Hz) la vía que va del patrón perforante hacia el giro dentado, en el hipocampo de conejos, aumentaba la fortaleza de las conexiones sinápticas. (Kandel, 2000). Dicha facilitación se conoce con el nombre de potenciación a largo plazo (o LTP por sus siglas en inglés; *Long-Term Potentiation*). En mamíferos la memoria explícita implica la LTP en el hipocampo, es decir, que es el reflejo de procesos celulares que ocurren durante la transmisión sináptica y que subyace a los cambios sinápticos durante la formación de la memoria (Bailey et al., 2000; Kandel, 2000).

O'Keefe y Dostrovsky (1971) encontraron que en el hipocampo se forma un mapa cognitivo del ambiente espacial en el que se mueven los animales. La localización del animal se codifica por el ritmo con el que se activan las células piramidales del hipocampo, mismas que experimentan la LTP cuando la vía perforante se estimula eléctricamente (Kandel et al., 2000; Lynch, 2004). Los estudios de Barnes en 1979 demuestran que la LTP está relacionada con los procesos que ocurren en la memoria espacial, ya que encontró una relación entre las tasas de olvido de la tarea del laberinto



de Barnes y las tasas de decaimiento de la LTP en animales jóvenes y viejos (Barnes, 1988; Milner et al., 1998; Ievlevsky et al., 2012).

La LTP requiere de dos sucesos, activación de las sinapsis y despolarización de la neurona postsináptica; emplea como principal neurotransmisor al glutamato, que se libera de la terminal presináptica y actúa en los receptores N-metil D-aspartato (NMDA) y en los AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4isoxazol propiónico). Cuando la membrana postsináptica se despolariza los receptores NMDA se desbloquean (que estaban bloqueados por  $Mg^{2+}$ ), esto permite la entrada de  $Ca^{2+}$ , el cual activa cinasas dependientes de calcio (cinasa dependiente de  $Ca^{2+}$ / calmodulina y proteína cinasa C) que juntas inducen la LTP (Bailey et al., 2000; Kandel, 2000). Esto ocurre cuando se provoca una salva de estímulos. Pero si se provocan cuatro o más salvas de estímulos pueden inducir a una fase persistente o tardía de LTP, la cual requiere síntesis de nuevas proteínas y de ARNm además de la activación de las señales de Adenosín Monofosfato cíclico (AMPC), proteína cinasa dependiente de AMPC (PKA), proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y CREB (proteína de unión al elemento de respuesta AMPC). Por ejemplo, está descrito que cuando un ratón carece de CREB, la LTP y el aprendizaje dependiente de hipocampo se interrumpen; la LTP en rebanadas de hipocampo de mutantes de CREB decae con el valor basal 90 minutos después de la estimulación tetánica, y tienen una peor ejecución del laberinto de Morris comparado con ratones control (Bourtchouladze et al., 1994).

Entonces, la LTP es un mecanismo sináptico con el que se puede mantener a largo plazo el mapa espacial, se considera un modelo electrofisiológico que explica el correlato anatómico funcional de la memoria (Bailey et al., 2000; Kandel, 2000).

Además del glutamato, otros neurotransmisores relacionados con la memoria son el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) con sus distintas subunidades receptoras, puesto que funciona como inhibidor en el hipocampo y la acetilcolina (ACh), ya que han observado que infusiones de agentes muscarínicos agonistas en la banda *septum* diagonal medial, que da lugar a la vía septohipocámpica, aumentan la capacidad de aprendizaje y memoria, por un aumento en el flujo de impulsos en la vía GABAérgica septohipocámpica (Wu et al., 2000). Uno de los paradigmas utilizados en la evaluación de la MVE de roedores, que ha sido utilizado para explicar y entender como la LTP está implicada en este tipo de memoria es el laberinto circular de Barnes (Barnes, 1979), mismo que se utilizó en este estudio.

### **Laberinto de Barnes**

El laberinto de Barnes es una prueba de memoria y aprendizaje visuoespacial diseñado por Carol Barnes para el uso con ratas de edad avanzada (Barnes, 1979). Consiste en una plataforma circular elevada, con orificios espaciados uniformemente alrededor del perímetro, (en una habitación bien iluminada). Uno de estos orificios dirige hacia una caja oscura, denominada caja de escape, que se encuentra situada debajo de la mesa. El sujeto se coloca en el centro de la plataforma y, debido a que a los roedores no les gustan los lugares abiertos ni muy iluminados, tratan de escapar; ya que en este laberinto utilizan motivadores que inducen a la conducta de escape (la exposición a un campo abierto, luz brillante y ruido) (Patil et al., 2009). Los animales deben aprender mediante claves visuales espaciales, que se encuentran distribuidas en las paredes externas al laberinto, una trayectoria determinada que los lleve a la caja de escape logrando huir (Troncoso et al., 2010).

La curva de aprendizaje es una medición clásica que se utiliza para conocer cómo un sujeto ejecuta una tarea de MVE. Entonces, el objetivo final de la evaluación es que, posterior a una serie de ensayos, el sujeto encuentre una estrategia que le permita llegar más rápidamente a la caja de escape, cometiendo el menor número de errores. Es decir, que finalmente muestre una curva de aprendizaje (Barnes, 1988).

Otros paradigmas que se han utilizado para la evaluación de la MVE son el laberinto de Morris y el laberinto radial, sin embargo, se ha visto que producen mayores niveles de corticosterona en plasma, medido 30 min después de la última sesión (Harrison, 2009), por lo tanto mayor estrés, que puede intervenir en los resultados finales. Por lo cual el laberinto de Barnes se ha utilizado como una alternativa que no involucra factores estresantes como la privación de alimento y la exposición al agua (Harrison, 2009; Patil, 2009; Sunyer et al., 2011).

La MVE puede verse afectada por diferentes factores internos o externos. La edad avanzada, así como daños en el hipocampo, en roedores, se relacionan con un peor rendimiento en la ejecución del laberinto de Barnes (Barnes, 1988; Raber et al, 2004; Klur, 2009). La interrupción o manipulación en la LTP también provoca un mayor o menor número de errores en la ejecución de tareas que evalúan MVE (Guerra et al., 2011). Asimismo, el estrés puede intervenir en la ejecución de la tarea (Troncoso, 2010; Harrison, 2009).

Otras sustancias, además de los neurotransmisores, que están implicadas en el proceso de la memoria y pueden alterar la LTP son los cannabinoides endógenos. Varias investigaciones (Lichtman, 1999; Abush, 2010; Robinson, 2008; Robinson, 2010; De Oliveira, 2008; Davies, 2002; Rueda-Orozco, 2008) han examinado los efectos de los

canabinoides (derivados de la planta *Cannabis Sativa*, o marihuana) en los procesos de memoria y aprendizaje. Han observado que la aplicación de estos también interviene en la MVE. Este es uno de los objetivos del presente trabajo, por lo cual se hace una revisión a continuación de dichas investigaciones.

### c) CANABINOIDES

Los cannabinoides han sido utilizados y estudiados desde la antigüedad por los efectos que producen. Como se describirá más adelante, existen cannabinoides y receptores a estos en distintos sistemas fisiológicos, en donde se sabe que tienen una función moduladora.

Los cannabinoides forman un conjunto de compuestos psicoactivos presentes en la resina secretada a partir de las hojas y flores de la planta del género *Cannabis* (conocida comúnmente como marihuana). Esta planta contiene aproximadamente 400 compuestos químicos distintos de los cuales cerca de 66 corresponden a la estructura denominada canabinoide (Sharma, 2012; Mendez-Díaz, 2008). Los cannabinoides tienen características lipofílicas, lo que hace que permite el paso de la barrera hematoencefálica (Ameri, 1999).

El  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC o THC), es el principal y más potente componente psicoactivo de la marihuana. Fue aislado por Gaoni y Mechoulam en 1964. Otros cannabinoides presentes en la planta *cannabis* son el canabinol (CBN) que fue uno de los primeros aislados de la planta en los cuarentas, el  $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC) y el canabidiol (CBD) (Méndez-Díaz, 2008).

Tras el consumo de marihuana, los principales efectos que se producen son un periodo de euforia y relajación seguido por un periodo de depresión, estos dependen de la cantidad consumida y las expectativas de los sujetos (Ameri, 1999). Las personas que tienen un consumo agudo de marihuana tienen un deterioro en el desempeño de una o varias tareas de funcionamiento cognitivo, incluyendo problemas de memoria (Riedel y Davies, 2005), alteración de la percepción del tiempo (Mackie, 2006) y decrementos en

tareas donde evalúan tiempo de reacción, aprendizaje, coordinación motora y la atención (Mackie, 2006; Ameri, 1999). Esto también depende de la forma de consumo.

- **Absorción y metabolismo**

El consumo de los cannabinoides se realiza principalmente de dos formas, por vías respiratorias y por vía oral. Cuando se fuman los cigarrillos preparados con hojas de marihuana los componentes activos son absorbidos por los pulmones y la entrada del THC en sangre, así como la posterior distribución en los tejidos tardan de segundos a minutos después de haberse inhalado el humo, y van de los 30 a 60 minutos después de ingerirla (Huestis, 2005; Ruiz et al., 2010). Su elevada liposolubilidad permite que alcance al sistema nervioso central (SNC) (Arévalo-Martín et al., 2002).

Al fumarse, el  $\Delta^9$ -THC es absorbido por los pulmones, mientras que al ingerirse se absorbe vía hepática, donde se convierte en el 11-hidroxi- $\Delta^9$ -THC, que es el metabolito activo central, y es más potente que el  $\Delta^9$ -THC (Huestis, 2005). Finalmente, el 11-hidroxi- $\Delta^9$ -THC es convertido en el hígado en varios metabolitos inactivos incluido en 11-nor-carboxi- $\Delta^9$ -THC; este último es el metabolito más abundante en plasma y orina y se puede detectar hasta 2 o 3 días después de consumir marihuana (Huestis, 2005; Ameri, 1999). El THC y su metabolito el 11-hidroxi- $\Delta^9$ -THC son los que se acumulan en mayor proporción en los tejidos, sobre todo en los que están altamente vascularizados, posteriormente pasa a tejido adiposo donde puede tardar varias semanas en ser totalmente eliminada tras la interrupción de su administración (Arévalo-Martín et al., 2002; Huestis, 2005). En el cerebro la concentración de THC únicamente alcanza cerca del 1% de la concentración plasmática máxima (Arévalo-Martín et al., 2002).

Durante mucho tiempo se pensó que los cannabinoides ejercían sus efectos a través de interacciones inespecíficas con lípidos de membrana. Sin embargo, ahora es bien sabido que sus mecanismos están mediados por receptores específicos (Mackie, 2006).

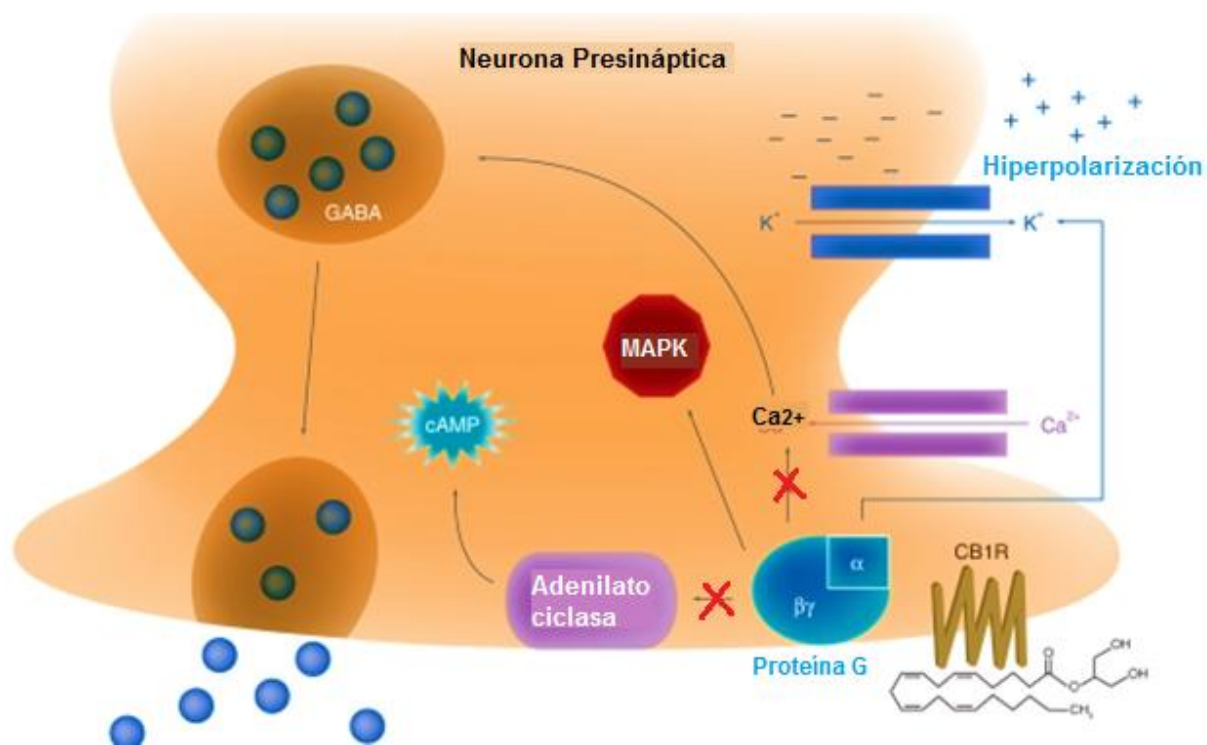
- **Receptores a cannabinoides**

Una vez descubierto el componente psicoactivo de la marihuana, una de las interrogantes que surgió fue ¿cómo actúa esta molécula en el SNC? Esta pregunta comenzó a contestarse con los estudios que se realizaron en células de neuroblastoma. A estas células les agregaron  $\Delta^9$ -THC y observaron que la adenilato ciclasa (AC) se inhibía, esta acción sugería la participación de proteínas G inhibitoras, además de la intervención de un receptor metabotrópico específico (Howlet y Felling, 1984; Mackie, 2006). Posteriormente, se encontró que los efectos del  $\Delta^9$ -THC eran mediados por un receptor de membrana específico; esto lo descubrió el investigador Devane en 1988, cuando realizó estudios con agonistas marcados radioactivamente. Finalmente, el primer receptor a cannabinoides fue descrito y clonado en 1990, este fue denominado CB1 (Pertwee, 2005).

Hasta ahora han sido clonados 2 tipos de receptores a cannabinoides, el receptor CB1 y el CB2. Ambos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), que se caracterizan por tener siete dominios transmembranales. El receptor CB1 tiene una amplia distribución en el SNC, mientras que el CB2 tiene una mayor distribución en células del sistema inmune y en el sistema nervioso periférico (Pertwee, 2005; Mackie, 2006). En esta investigación el interés es específico sobre CB1, por lo cual el receptor CB2 no será descrito.

## ▪ Receptor a cannabinoides CB1

El receptor CB1 es miembro de la familia de GPCR que están farmacológicamente bien definidos (Console-Bram et al., 2012). Está formado por siete dominios transmembranales con tres dominios intracelulares y tres extracelulares. Cuando se activa el CB1, se inhibe la AC (por lo que pertenece a una proteína G de tipo inhibidora) y disminuye la producción de AMPc, además interviene en la activación de MAPK (Fig 5). Está reportado que este receptor también inhibe la actividad de canales iónicos como los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje de tipo N, P/Q; y canales de potasio tipo A (Mackie, 2006; Bisogno, 2005).



**Fig. 5 Mecanismos de transducción de señales estimuladas por el receptor CB1 en una terminal nerviosa presináptica.** La activación del receptor CB1 estimula el acoplamiento a una proteína G. La proteína G activa la proteína quinasa (MAPK) e inhibe la adenilato ciclasa, atenuando así la producción de AMPc. Debido a la disminución en la acumulación de AMPc, la PKA también es inhibida (Tomada y modificada de Seely, 2011).



Cuando un agonista se une al receptor CB1 activa una proteína G que, a través de la subunidad  $\alpha$ , inhibe la actividad de la AC y reduce los niveles de AMPc modulando la actividad de la PKA (Seely, 2011). Las acciones inhibitoras de los cannabinoides sobre la neurotransmisión son el resultado principalmente de la hiperpolarización de las neuronas presinápticas, debido a la inhibición del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de  $\text{Ca}_v2.2$  y la pérdida intracelular de iones  $\text{K}^+$  a través de la apertura de canales (Seely, 2011). Además, inhibe también la liberación de GABA, lo que resulta en una disminución de la neurotransmisión (Seely, 2011; Mackey 2008). Por esta razón, se sabe que los ligandos a endocannabinoides son importantes en la regulación de la función sináptica, pues a través del CB1 pueden inhibir la transmisión sináptica en el SNC; esto a su vez se relaciona con la plasticidad a corto y a largo plazo (Chevalleyre et al., 2007; levglevskyi et al., 2012).

#### ▪ **Distribución de los receptores a cannabinoides CB1**

Mediante diferentes técnicas autorradiográficas y estudios inmunohistoquímicos se ha logrado describir de una forma detallada la distribución del receptor CB1 en la rata y en humanos (Mackie, 2005). De esta manera se ha encontrado que los CB1 están principalmente en el SNC y también en ciertos tejidos periféricos (Davies et al., 2002; Mackie, 2005).

Distintos estudios tanto en humanos como en ratas han demostrado que existen altas concentraciones de receptores CB1 en el cerebro, principalmente en algunas estructuras como la corteza cerebral, el hipotálamo, el globo pálido y el bulbo olfatorio (Ameri, 1999; Davies et al., 2002; Mackie, 2005). Mediante el uso de autorradiografía y técnicas de inmunohistoquímica en el cerebro humano postmortem, se ha encontrado que los receptores CB1 se distribuyen con alta densidad en sustancia negra *pars reticulada*, globo

pálido, el putamen, el hipocampo (región CA3 y capa molecular del giro dentado; Ameri, 1999; Mackie, 2005) y cerebelo (Burns et al., 2007). Sin embargo, se ha encontrado, *in vivo* con ayuda de técnicas de imagen como la tomografía por emisión de positrones (PET), y con el agonista radioactivo específico para este receptor [ $^{18}\text{F}$ ] MK-9470, que la mayor expresión del receptor se observa en el cuerpo estriado, la corteza frontal, y cingulada posterior. De igual forma, observaron una captación intermedia en el cerebelo y la absorción más baja fue vista en el tálamo y en el hipocampo (Burns et al., 2007).

La alta y específica distribución de receptores a cannabinoides en el cerebro ha proporcionado avances en las posibles explicaciones sobre los efectos farmacológicos que producen los cannabinoides en distintas funciones, como el aprendizaje y la memoria.

Además de su localización en el SNC, los receptores CB1 también están presentes a nivel periférico. Se han encontrado estos en diferentes órganos y tejidos como: bazo, amígdalas, corazón, próstata, útero, ovarios, glándulas endocrinas, tejido adiposo (Arévalo-Martín et al., 2002) donde las investigaciones han indagado su función pero que de igual forma los involucra en múltiples funciones de distintos sistemas fisiológicos.

#### ▪ **Canabinoides endógenos**

La presencia de un receptor sugiere la existencia de algún ligando endógeno. Por esto, la clonación del CB1 intensificó la búsqueda de un compuesto endógeno que imitara al  $\Delta^9$ -THC (Mackie, 2006). Las sustancias que son producidas por el cerebro y que tienen un efecto parecido al  $\Delta^9$ -THC son llamadas endocannabinoides.

En 1992 el grupo de Mechoulam, descubrió la primera sustancia endógena con características farmacológicas parecidas a las producidas por los cannabinoides (Devane

et al., 1992). La N-araquidoniletanolamida (anandamida), es el primer y más estudiado endocanabinoide, fue aislada del cerebro de cerdo. Su nombre proviene de la palabra en sánscrito “*ananda*” que significa “bendición interna” y “amida” por su estructura química (Devane et al., 1992). Unos años después Cravatt y colaboradores (1995) describieron otro lípido, el Cis-9,10 octadecenamida, al cual llamaron oleamida, que también produce efectos parecidos a los del  $\Delta^9$ -THC cuando se administra sistémicamente (Prospéro-García et al., 2010). Otro canabinoide que fue identificado es el 2-araquidonilglicerol (2-AG) que fue aislado de intestino canino y mostraba tener efectos muy parecidos al del  $\Delta^9$ -THC (Mechoulam et al., 1995). Los tres endocanabinoides tienen afinidad a los receptores CB1 y los activan (Murillo-Rodríguez et al., 2006). Existen otros endocanabinoides como el noladín éter, la O-araquidoniletanolamida también llamada *Virodamina* y la N-araquidonildopamina (NADA) que han sido poco descritos (Tabla 4) (Murillo-Rodríguez et al., 2006; Prospéro-García et al., 2010).

**Tabla 4. Endocanabinoides y compuestos relacionados (Tomado de Prospéro-García et al., 2010).**

Nombre	Abreviatura	Acción
N-araquidonoil-etanolamina	Anandamida	Agonista parcial del CB1, agonista débil del CB2
2-araquidonoil-glycerol	2- AG	Agonista potente del CB1 y CB2
Cis-9,10 octadecenamida	Oleamida	Agonista débil del CB1 y del CB2
N-palmitoil etanolamina	PEA	Agonista del PPAR- $\alpha$ Inhibe la expresión de la FAAH
N-oleoil etanolamina	OEA	Agonista del TRPV1 y del PPAR $\alpha$
2-araquidonoil-gliceril-eter	Noladin eter	Agonista del CB1
O-araquidoniletanolamina	Virodhamina	Agonista parcial del CB2 y antagonista del CB1
N-araquidonoil-dopamine	NADA	Agonista del CB1 y agonista potente del TRPV1

Receptor a canabinoides 1 (CB1), receptor a canabinoides 2 (CB2), receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR- $\alpha$ ), aminohidrolasa de ácidos grasos (FAAH), receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1).

Tanto la anandamida como el 2-AG y la oleamida se han aislado del cerebro así como de varios tejidos de humano y rata (Mackie, 2006). Los niveles más altos de estos endocannabinoides se encuentran en áreas con más densidad de receptores, en el SNC incluye regiones como corteza, hipocampo, estriado, cerebelo y tallo cerebral (Ameri, 1999; Murillo-Rodríguez et al., 2006).

Existe una diferencia entre los endocannabinoides y los neurotransmisores clásicos, los endocannabinoides parecen ser sintetizados “a demanda”, en lugar de ser presintetizados y almacenados en vesículas sinápticas, como ocurre con los neurotransmisores clásicos (Mackie, 2006). Los endocannabinoides se sintetizan y liberan en respuesta al incremento en la concentración celular de  $Ca^{2+}$  que se produce por despolarizaciones (Ramos y Martínez, 2005; Mackie, 2006; Méndez-Díaz, 2008). Además, actúan como mensajeros sinápticos retrógrados y se liberan de las neuronas postsinápticas.

Existen ciertas diferencias entre la síntesis de los endocannabinoides. La anandamida, es un compuesto formado por ácido araquidónico unido por un enlace amida a etanolamina (Devane et al., 1992). Se sintetiza y libera tras la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior de la neurona. Es producida mediante la hidrólisis por una fosfolipasa D específica (Mackie, 2006; Ramos y Martínez, 2005) de un precursor fosfolipídico que está presente en la membrana celular, la N-araquidonil fosfatidiletanolamina (NAPE). Cuando la anandamida cumple su función es captada tanto por neuronas como por células gliales, donde son degradadas por la hidrolasa de ácidos grasos amidados (FAAH por sus siglas en ingles), que se localiza postsinápticamente, a etanolamina y el ácido araquidónico (Ramos y Martínez, 2005).

Por otro lado, el 2-AG, que está formado por ácido araquidónico unido a glicerol por un enlace éster, se sintetiza a partir del diacil glicerol, puede formarse a través de la hidrólisis de fosfoinositol-bis-fosfato (PIP2) por una fosfolipasa C (enzima diacil glicerol lipasa), el cual libera una molécula de ácido graso de la posición sn1 del glicerol conservando ácido araquidónico en la posición 2. La enzima se activa por canales de  $Ca_v2.2$ . El 2-AG es degradado a ácido araquidónico y glicerol, por una monoacilglicerol lipasa (MAGL), que es presináptica; también se ha visto que puede ser degradado por la FAAH (Ramos y Martínez, 2005; Mackie, 2006).

La oleamida es sintetizada a partir de ácido oleico y amonio, por la acción de la enzima peptidil glicina  $\alpha$ -amida monooxigenasa (PGAM) y también es degradada por la FAAH (Mckinney y Cravatt, 2005).

#### ▪ **Canabinoides sintéticos**

A partir de la disponibilidad del  $\Delta^9$ -THC en su forma pura, el conocimiento acerca de su estructura química, además de otros canabinoides naturales como el CBN y el  $\Delta^8$ -THC y su función sobre los receptores, algunas compañías farmacéuticas y los laboratorios de investigación han desarrollado canabinoides análogos con alta estabilidad metabólica y potencial que interactúan con el receptor CB1 (Méndez-Díaz, 2008; Ameri, 1999).

De acuerdo con su estructura química, los agonistas del receptor CB1 pueden ser divididos en grupos con comportamiento farmacológico similar al del  $\Delta^9$ -THC (Ameri, 1999). A partir de estos fármacos se ha podido determinar, en experimentos, la relación entre la estructura y la actividad de los compuestos canabinoides. De igual forma ha funcionado para poder tener un mejor manejo terapéutico (Méndez-Díaz, 2008). En la Tabla 5 se muestran algunos de los canabinoides sintéticos que han sido estudiados.

**Tabla 5. Canabinoides sintéticos. (Tomada y modificada de Méndez-Díaz, 2008).**

<b>Componente</b>	<b>Características</b>
CP-55940	Agonista a receptores CB1 y CB2. Altamente psicoactivo, 40 veces más potente que el THC.
HU-210	Agonista de CB1. 100 veces más potente que el THC.
WIN55,212-2	Agonista CB1
JWH-133	Agonista CB2
URB597 (KDS-4103)	Inhibidor selectivo de la FAAH
AM251	Antagonista de CB1
AM404	Inhibidor de la recaptura de canabinoides endógenos.
<b>Componentes terapéuticos</b>	<b>Uso</b>
Dronabinol	Análogo a THC. Prescrito para estimular el apetito en pacientes con SIDA, quimioterapia y con bypass gástrico. Antiemético.
Nabilona	Análogo a THC. Antiemético y analgésico.
SR141716A (Rimonabant)	Antagonista CB1, anoréxico antiobesidad.
Sativex	Análogo a THC y CBD, usado para dolor neuropático en esclerosis múltiple.

Receptor a canabinoides 1 (CB1), receptor a canabinoides 2 (CB2), hidrolasa de ácidos grasos amidados (FAAH), tetrahidrocanabinol (THC), canabidiol (CBD).

- **Funciones del sistema**

La localización cerebral y periférica de los elementos del SeC, han permitido hacer una aproximación a las funciones que ejerce este sistema, así como explicar los efectos que producen los canabinoides endógenos y exógenos. Para poder conocer mejor las funciones que este sistema desarrolla es importante saber su interacción con neurotransmisores y en qué regiones produce dicha interacción.

Su participación en diferentes sistemas se relaciona principalmente con la capacidad que tienen para modular la actividad neuronal en distintas regiones cerebrales y de ciertos neurotransmisores. Se ha descrito que interfiere con la liberación de GABA, glutamato, dopamina (DA), 5HT y norepinefrina (Mackie, 2008; Prospéro-García et al., 2010). Esto se ve reflejado en diferentes funciones fisiológicas por ejemplo, en la actividad locomotora

(Martínez, 2012; Ameri, 1999), en funciones reguladoras del sueño (Prospéro-García et al., 2010; Murillo-Rodríguez, 2006; Navarro et al., 2003), el control nociceptivo (Martin et al., 1999; Mackie, 2006) así como en adicciones (Ruiz et al., 2010)

Otras dos funciones donde se ve involucrado el SeC y que son de principal interés para este trabajo son, la regulación de conductas apetitivas, particularmente en la ingestión de alimento, donde puede haber alteraciones y desarrollarse SM u obesidad (Méndez-Díaz et al., 2010; Fride, 2007; Chen, 2013; Pagotto et al., 2006; Di Marzo, 2001). Y procesos de aprendizaje y memoria (Lichtman, 1999; Abush, 2010; Robinson, 2008; De Oliveira, 2008; Davies, 2002; Rueda-Orozco, 2008). Que se describirán a detalle en seguida.

- **Canabinoides: procesos de aprendizaje, memoria y plasticidad**

Por mucho tiempo se ha sabido que los canabinoides tienen efectos sobre la cognición, en específico en los procesos de aprendizaje y memoria, sin embargo, no ha sido posible dilucidar con precisión cuáles son los mecanismos a los que se deben estos efectos.

Los estudios acerca de memoria y canabinoides se han descrito en uso humano y animal (Lichtman, 1999; Abush, 2010; Robinson, 2008; Robinson, 2010; De Oliveira, 2008; Davies, 2002; Rueda-Orozco, 2008), además, se han abordado desde diferentes perspectivas investigando detalladamente los mecanismos que pueden estar involucrados; no obstante las conclusiones nos son definitivas puesto que, los resultados dependen de distintos factores que se deben tomar en cuenta, como las dosis, formas de administración y las tareas a las que se somete a los sujetos.

El hipocampo es una de las estructuras donde existe una alta expresión de CB1, esta razón se considera la principal evidencia para relacionarse con el aprendizaje y la MVE

(Mackie, 2005); asimismo, hay evidencia de que en el hipocampo están presentes cannabinoides endógenos como la anandamida y el 2-AG donde se considera que modulan el aprendizaje y la memoria (Robinson et al., 2008).

Por otro lado, gran número de estudios donde se evalúa la conducta (Lichtman, 1999; Abush, 2010; Robinson, 2008; Robinson, 2010; De Oliveira, 2008; Davies, 2002; Rueda-Orozco, 2008) han investigado la función que tiene el SeC en la modulación de la memoria. En estos se han probado diferentes cannabinoides agonistas y antagonistas, ya sean sintéticos y/o endógenos, administrados de forma sistémica o intrahipocampal y aplicados en distintas dosis. Posteriormente, evalúan a los sujetos con tareas de aprendizaje y memoria espacial. Los resultados muestran, en la mayoría de los casos, que los agonistas a los receptores CB1 deterioran la memoria y plasticidad, mientras que los antagonistas la mejoran (Robinson, 2010; Abush, 2010); aunque no siempre siguen estos patrones simples, especialmente cuando se habla de memoria emocional (Abush, 2010).

Como se había mencionado antes, la LTP es un modelo celular de aprendizaje y memoria (Bailey, 2000; Kandel, 2000). Los resultados de las investigaciones (Abush, 2010; Mackie, 2008) muestran que los cannabinoides interfieren con la LTP, ya que son capaces de inhibir la liberación de glutamato en las células del hipocampo y también interfieren con la recaptura de GABA (Ievglevskyi et al., 2012; Mackie, 2008, Abush, 2010). Además, en el hipocampo cuando los cannabinoides se unen con los CB1, inhiben los  $Ca_v2.2$  proceso que esta mediado por la acción directa de las subunidades G  $\beta/\gamma$  (García et al., 1998; Ikeda, 1996; Chevaleyre et al., 2007). Las subunidades, a su vez, modulan la actividad del AMPc que modula la fosforilación de PKA. La inducción de LTP en hipocampo depende



de la señalización de AMPc/PKA. Los CB1, a través de la PKA, regulan la secreción de GABA por una modulación de los Ca<sub>v</sub>2.2 (Chevaleyre et al., 2007). Esto también sugiere que la participación de los cannabinoides y sus receptores en el hipocampo modulan la fosforilación de PKA y por lo tanto el aprendizaje y la memoria. De aquí la relación tan estrecha que se ha descrito de los efectos de los cannabinoides sobre los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria.

Así como existe un considerable número de investigaciones que abordan la participación del SeC en los procesos de aprendizaje y memoria, los estudios acerca de la participación de este sistema en la regulación de conductas apetitivas, ingestión de alimento y en enfermedades metabólicas como obesidad es vasta y se aborda a continuación.

- **Canabinoides y conductas apetitivas, ingestión de alimentos y alteraciones metabólicas**

El SeC está vinculado con diversas funciones fisiológicas, de acuerdo con la evidencia experimental, el sistema constituye una pieza clave en la en la regulación de la ingestión de alimento (Fride, 2007; Cruz et al., 2010; Bermúdez et al., 2009). Del mismo modo que ocurre en el estudio de la memoria, se han encontrado diversos resultados que colocan al SeC como un sistema de homeostasis energética (Bermúdez et al., 2009; Méndez-Díaz et al., 2010; Pagotto et al., 2006).

El control que ejerce este sistema lo hace a nivel central y periférico, nuevamente esto se atribuye a la distribución de la expresión de los receptores. A nivel central uno de los principales participantes es el hipotálamo, éste tiene una densidad relativamente baja de CB1 (Mackie, 2005; Bermúdez et al., 2009). Se sabe que el hipotálamo es el sitio primario de integración de diversos procesos homeostáticos (Kandel, 2001). El núcleo

paraventricular hipotalámico (NPH) es considerado el núcleo donde converge gran parte de la información necesaria para el control del balance del consumo y gasto energético (Cruz et al., 2010; Mancilla-Díaz et al., 2003). También hay CB1 presentes en células neuronales hipotalámicas que tienen hormonas reguladoras de la digestión como: la leptina, el péptido de tiroxina (PYY), orexinas A y B, colecistoquinina (CCK), entre otras (Fride, 2007; Di Marzo, 2001). A nivel periférico la distribución de CB1 sigue siendo tema de investigación pero hasta el momento se ha encontrado que están presentes en hígado (donde inducen lipogénesis e inhibición de la oxidación de ácidos grasos), tracto gastrointestinal (actúan en la potenciación vía terminales sensoriales de señales proorexigénicas e inhibición de señales proanorexigénicas), páncreas (aumento en la secreción de insulina) y tejido adiposo (aumento de la captación de glucosa inducida por insulina) (Bermúdez et al., 2009).

Se ha encontrado que la administración cerebral en el NPH derecho, a ratas, de agonistas a cannabinoides se relaciona con la ingestión de alimento, disminuyendo el tiempo de descanso y remplazándolo por tiempo de ingesta (Cruz et al., 2010), congruente con esto se ha visto que una inyección intravenosa de leptina (hormona anorexigénica) disminuye la concentración de endocannabinoides, que a su vez se relaciona con un menor consumo de alimento (Di Marzo, 2001); también la inyección (intraperitoneal) de oleamida y anandamida incrementan la ingestión de alimento (Martínez-González et al., 2004) y la oleamida es capaz de inducir condicionamiento de preferencia de lugar que se puede provocar por comida agradable al paladar, relacionando al sistema canabinérgico con el valor hedónico de la comida (Méndez-Díaz et al., 2010).

El efecto de los agonistas en el aumento de la ingestión se ha visto inhibido por antagonistas a los CB1, como el AM-251, produciendo efecto de saciedad en los sujetos (Droste, 2010; Cruz et al., 2010; Méndez-Díaz et al., 2010; Chambers, 2004). Otro importante antagonista que ha sido ampliamente estudiado es el Rimonabant, pues hace algunos años se había considerado como un tratamiento para la obesidad por los efectos que producía (la inhibición de la ingesta, inducción de la pérdida de peso y mejora de parámetros metabólicos), sin embargo, se recomendó la suspensión de la distribución de Rimonabant debido a los efectos secundarios que producía (depresión, irritabilidad, agitación, ansiedad, insomnio, dolor de cabeza y otros eventos psiquiátricos adversos) (Van Gaal, 2008; Bermúdez et al., 2004).

Por lo tanto, la obesidad parece ser una condición asociada con una sobre activación patológica del SeC (Bellocchio, 2006; Bermúdez et al., 2009). Ciertos grupos argumentan que cuando el sistema es disfuncional hay obesidad y/o SM (D'Eon et al., 2008; Nunn et al., 2010) aunque no se sabe si es una causa o un efecto. Así mismo, se ha sugerido que la exacerbación del sistema está estimulada por el incremento en las concentraciones de algunos endocannabinoides (como anandamida y 2-AG) en varios tejidos (Engeli, 2008), que a su vez se puede asociar con modificaciones en los receptores, regulándose a la alza o a la baja (Engeli, 2008; Pagotto; 2006; Harrold, 2002; Miller y Devi, 2011).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La memoria está modulada por diferentes sistemas entre los que destaca el SeC; se ha mostrado que el predominio del SeC se debe a la amplia distribución del receptor CB1 en el SNC, en especial en estructuras como el hipocampo.

Asimismo, el SeC también ha sido relacionado con numerosos datos de la literatura sobre la ingesta de alimento y desórdenes alimenticios, incluyendo la obesidad y el SM, gracias a la vasta distribución de CB1 en el organismo. Se ha observado que la activación del CB1 provoca un incremento en la ingestión, mientras que el uso de antagonistas disminuye el apetito al producir saciedad (Fride, 2007; Cruz et al., 2010).

Los cambios en la memoria, específicamente en la de tipo visuoespacial, en ratas con SM, se han estudiado extensamente; sin embargo, no existen estudios que establezcan una correlación entre los CB1, el SM y los cambios que se producen en la MVE.

Los datos anteriores sugieren que cuando se padece SM, el SeC se encuentra exacerbado debido a una mayor liberación de ligandos y a una posible hiperactivación de receptores (resultado de modificaciones en la expresión de los mismos), y esto puede relacionarse con déficit en el aprendizaje y la memoria. Por lo tanto, el presente trabajo busca responder la siguiente pregunta central: **¿los cambios en la MVE que se observan en ratas con SM se deben a alteraciones en el SeC?**

Para responder a esta pregunta se evaluó la MVE por medio del protocolo de Laberinto de Barnes en animales que desarrollaron SM, a través de la caracterización estandarizada en rata Wistar macho (Larqué, 2011); posteriormente se correlacionaron

estos resultados con la cuantificación de la expresión de receptores CB1 en hipocampo, mediante PCR-RT y Western blot.

## **HIPÓTESIS**

Si el SM produce hiperactividad del SeC, y éste a su vez causa efectos deletéreos sobre la MVE, entonces el SM inducido en ratas y la activación experimental de los receptores CB1 se reflejará en alteraciones conductuales consistentes con el deterioro de la MVE.

## **JUSTIFICACIÓN**

Teniendo en cuenta los antecedentes y el elevado número de casos de SM que constituyen un problema de salud en la población general, resulta relevante estudiar en un modelo de rata uno de los mecanismos fundamentales por el cual se modifica la MVE, una vez que el SM ya se ha instalado.

## **OBJETIVOS**

Objetivo general

Caracterizar los cambios en la memoria visuoespacial en ratas con SM y su correlación con modificaciones en los receptores CB1.

Objetivos particulares

1. Determinar si el SM produce un deterioro en la MVE.
2. Determinar si el SM se correlaciona con cambios en los CB1.
3. Correlacionar las modificaciones en los CB1 con los cambios en la MVE.

## IV. MÉTODO

### Sujetos

Se emplearon 45 ratas macho de cepa Wistar de 250-280 g con ciclo luz oscuridad 12:12, temperatura entre 18 y 26°C y acceso libre a alimento y agua. Los animales fueron tratados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el Uso, Cuidado y Reproducción de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

**Dieta:** Se replicó el modelo de dieta hipercalórica en rata Wistar macho realizado por el grupo de la Dra. Marcia Hiriart (Larqué, 2011). Se manejaron dos tipos de dieta, una dieta para los grupos controles y una dieta alta en carbohidratos para desarrollar SM.

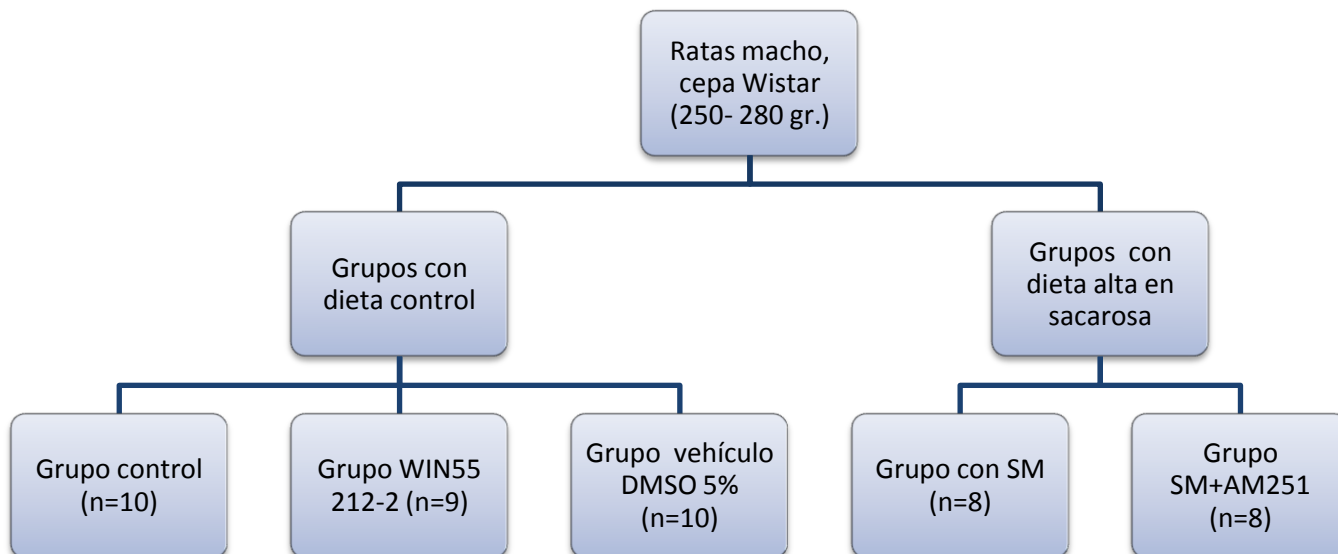
- **Control:** alimento estándar *chow* 5001 en *pellet* LanDiet (proteína 28.5%, grasas 13.5%, 58% carbohidratos de las calorías proporcionadas) y agua *ad libitum*.

- **Alta en sacarosa (SM):** dieta alta en carbohidratos, constituida por alimento estándar *chow* en *pellet* 5001 y el agua simple se reemplazó por una solución de sacarosa al 20% (p/v) en el agua *ad libitum* (Larqué et al., 2011). Dieta que se mantuvo durante todo el experimento.

Los sujetos se distribuyeron de manera aleatoria y se colocaron por parejas en cada caja. Los animales que se sometieron a cirugía estereotáxica se dejaron en cajas individuales después de la cirugía de manera permanente.

## Diseño experimental

Los sujetos se dividieron en 5 grupos de la siguiente manera:



La administración de los fármacos se realizó de forma intrahipocampal (ih), unilateralmente (hipocampo derecho), con las siguientes dosis: 5µg/4µL de WIN, 4µL de DMSO al 5%, 1.6µg/4µL de AM-251. Las dosis fueron seleccionadas de acuerdo a trabajos previos (Abush, 2010; Robinson, 2008; Rueda-Orozco et al., 2006).

## Fármacos

- ◆ (R)-(+)-WIN 55,212-2 mesilato de sal (WIN), en una concentración de 5 µg/4 µL (Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V.)
- ◆ 1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H-pirazol-3-carboxamida (AM-251), en una concentración de 1.6 µg/4 µL (Cayman Chemical).
- ◆ Como vehículo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V.) diluido al 5% con solución salina (0.9% NaCl).

## **Parámetros físicos**

Las evaluaciones para los grupos SM se realizaron entre la semana 11 y la semana 13 de tratamiento, ya que la rata debía tener SM para las evaluaciones conductuales. Para determinar que el sujeto desarrolló SM se realizaron las siguientes mediciones:

Peso corporal: se pesó semanalmente a cada rata para registrar el efecto de la dieta hipercalórica en el peso corporal.

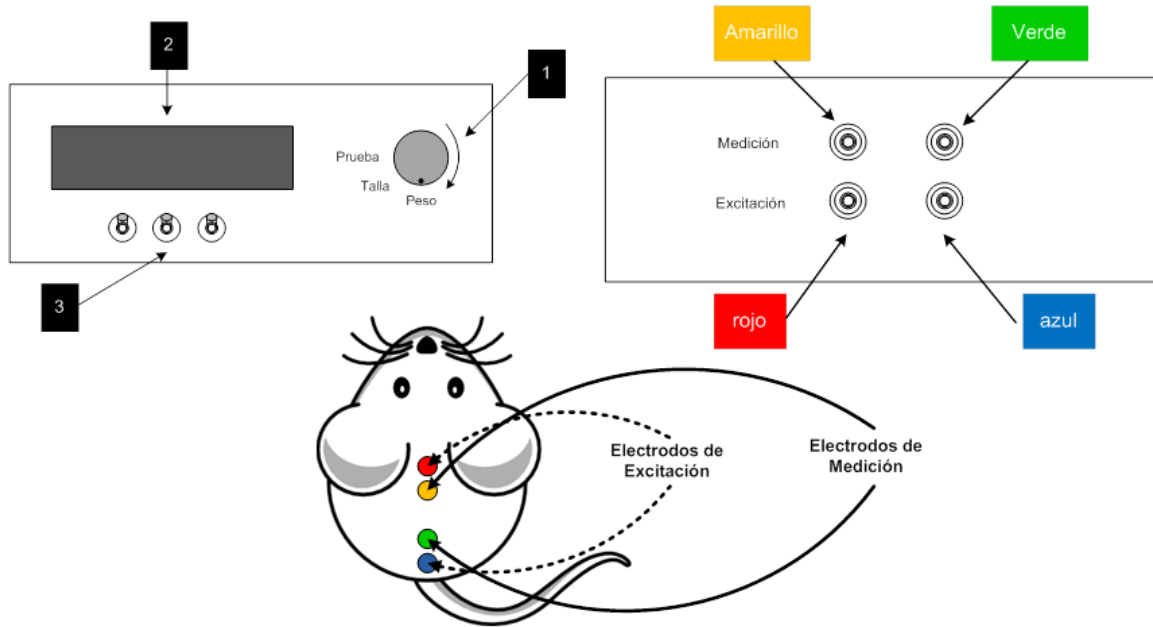
Ingestión de alimento y agua al día: la ingestión de alimento y agua fueron medidos diariamente durante 12 semanas con el fin de comparar el consumo entre los sujetos control y los sujetos con dieta hipercalórica. Asimismo, se relacionó con el peso de cada sujeto.

Medida por impedancia del índice de grasa corporal (composición corporal): La impedancia bioeléctrica es un método no invasivo para evaluar la composición corporal en ratas, este mide la resistencia del tejido a través de una corriente eléctrica que analiza la masa grasa (o tejido adiposo), la masa libre de grasa o tejido magro (que incluye: tejido óseo, músculos, vísceras, proteínas circulantes y fluidos), el agua extra celular (plasma o volumen vascular e intersticial que incluye linfa y agua de huesos y tejido conjuntivo) y el agua corporal total. Con el fin de identificar si había diferencias entre ambos grupos se realizó esta medición la decimoprimer semana de tratamiento. Por medio de dos electrodos se inyecta una corriente no mayor de 800  $\mu\text{A}$  a una frecuencia de 5 kHz y 50 KHz para excitar el tejido de la rata, con otros dos electrodos se mide la respuesta del tejido con un voltaje en forma sinusoidal a la misma frecuencia que la inyectada. Conocidos los valores de las resistencias extracelular y total de agua del cuerpo se



obtiene el peso total de agua en el cuerpo, la masa libre de grasa, la masa grasa y el agua extracelular (Rutter, 1998).

Una vez anestesiada la rata (pentobarbital 40 mg/kg de peso ip), se colocaron los electrodos de aguja la parte dorsal (Fig 6).



**Fig 6. Esquema del aparato de impedancia para medir composición corporal.** 1 perilla para indicar peso, talla e inicio de la prueba, 2 pantalla de panel de control, 3 interruptores para introducir valores en centenas, decenas y unidades. Posición de los cables de colores-electrodos y forma y orden de colocación de los dos electrodos de excitación y los dos electrodos de medición en la rata.

- a) El electrodo de excitación indicado con color rojo fue colocado en la intercepción imaginaria de la línea que va de una oreja a otra con la línea que va de la punta de la nariz hacia la base la cola.
- b) El electrodo de medición indicado de color amarillo fue colocado a una distancia de 1 cm con respecto al electrodo rojo distalmente de la cabeza

- c) El electrodo de excitación indicado de color azul se colocó en la intercepción imaginaria de la línea que viene de la de la nariz a la cola con la intercepción que hacen los músculos del muslo.
- d) El último electrodo de color verde se colocó a 1 cm de distancia del electrodo de color azul distalmente de la cola.

Colocados los electrodos de aguja correctamente se engancharon a los cables que vienen del sistema indicados con el color que corresponde a la posición de los electrodos.

Medida de los niveles de azúcar en sangre: La curva de tolerancia a la glucosa es una prueba que mide la capacidad que tiene el organismo para metabolizar la glucosa. En los sujetos con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos esta capacidad se encuentra alterada. Se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa ip (PTGI). Las ratas tuvieron un ayuno de 16 hrs, se les retiró el alimento *chow* y la solución de sacarosa y se sustituyó por agua natural a las 19:00 hrs (la prueba comenzó a las 11:00 am). Esta prueba se realizó el mismo día que la de composición corporal por lo cual las ratas estaban anestesiadas. Se les administró una carga de glucosa (2 g glucosa/Kg de peso corporal), en una solución madre de 1 g glucosa/ 2 ml agua desionizada) de manera ip. Se tomaron muestras de sangre periférica de la cola, la primera justo antes de la administración de la glucosa (tiempo 0), y después de la carga inmediatamente a los 10, 20, 30, 60 y 120 minutos. Las mediciones se realizaron con el glucómetro y las tiras de la marca *AgaMatrix Keynote*.

Medida de los niveles de triglicéridos en sangre: se tomaron muestras de sangre periférica de la cola a las 12:00 hrs del día, en este caso no fue necesario ningún ayuno, las

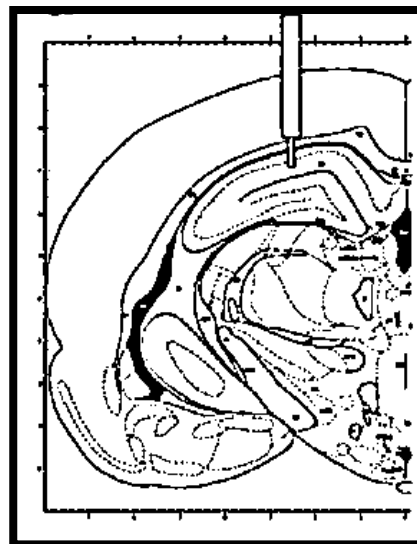
mediciones se realizaron con el aparato de la marca *Accutrend GCT* y las tiras reactivas *Accutrend Triglycerides Roche*.

Presión arterial: se midió con el monitor no invasivo CODA *Estándar* (de las 10:00 hrs a las 16:00 hrs del día), que calcula la presión en la rata determinando el volumen de sangre en la cola del animal. Utiliza dos manguillos, uno como sensor de presión y el otro de oclusión. El sistema arrojó seis parámetros de presión: diastólica, sistólica, media, velocidad, flujo y volumen de sangre en cola. El *software* permitía visualizar la información en tiempo real y se almacenó directamente en la computadora.

Medida de niveles de insulina: las muestras de sangre para medir los niveles de insulina fueron tomados al final de todas las pruebas, ya que era necesario sacrificar a la rata. Las ratas tuvieron un ayuno de 12 hrs, la extracción de la sangre se realizó a las 12:00 hrs del día. La sangre se sacó de la vena cava superior, se colocó en tubos Vacutainer con heparina (tapa verde). Posteriormente fue centrifugada a 2000 rpm durante 15 min, se obtuvo el plasma y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se procesó con el kit de ELISA, de la marca ALPCO, para la determinación cuantitativa de insulina en plasma de rata. Este es un inmunoensayo tipo *sándwich* de 96 pocillos recubierto con el anticuerpo monoclonal específico para insulina. El ensayo es de unión de ligando, utiliza una relación sigmoideal para el análisis de la concentración de insulina.

## Estereotáxia

La cirugía se realizó para administrar WIN55 212-2, AM251 y el vehículo intracranalmente en el hipocampo derecho, específicamente en CA1. Se efectuó bajo anestesia general (mezcla de anestésicos: solución salina 6 ml, ketamina 2.5 ml, maleato de acepromazina 1 ml y de una solución al 2% del hidrocloreuro de xilazina 0.5 ml en una dosis de 1 a 1.2 ml). Las coordenadas se determinaron a partir de Bregma AP= -4.3 mm, L=  $\pm$  2.0 mm, D= 2.0 mm (Fig 7) (Paxinos, 1986), en este punto se perforó el cráneo para colocar la cánula y otros dos tornillos pequeños se anclaron en el cráneo (en puntos arbitrarios) para apoyar el implante que se hizo con acrílico dental para mantener la cánula en su lugar. La rata tuvo de 3 a 5 días de recuperación antes de comenzar las pruebas conductuales (Robinson, 2008; Fornari, 2012).



**Fig 7. Fotografía esquemática de la posición de la cánula.** Se muestra la posición donde se colocó la cánula según las coordenadas de Paxinos, 1986, para llegar al área CA1 del hipocampo.

## Administración

Los fármacos fueron administrados por vía ih  $\mu$ L/min, en las dosis WIN 5 $\mu$ g/4 $\mu$ L, AM251 1.6  $\mu$ g/4 $\mu$ L y DMSO al 5% 4 $\mu$ L como vehículo, entre las 13:00 y 16:00 hrs.

Las administraciones se realizaron antes de comenzar el primer ensayo de entrenamiento en el primero, segundo, tercero y cuarto días del periodo de aprendizaje en el protocolo del laberinto de Barnes. El esquema de administración permite observar los efectos de los

fármacos (canabinoides) sobre la adquisición de la tarea, así como en los siguientes procesos de memoria incluyendo la consolidación, además de que simula el efecto de los canabinoides en el sistema cuando se cursa SM.

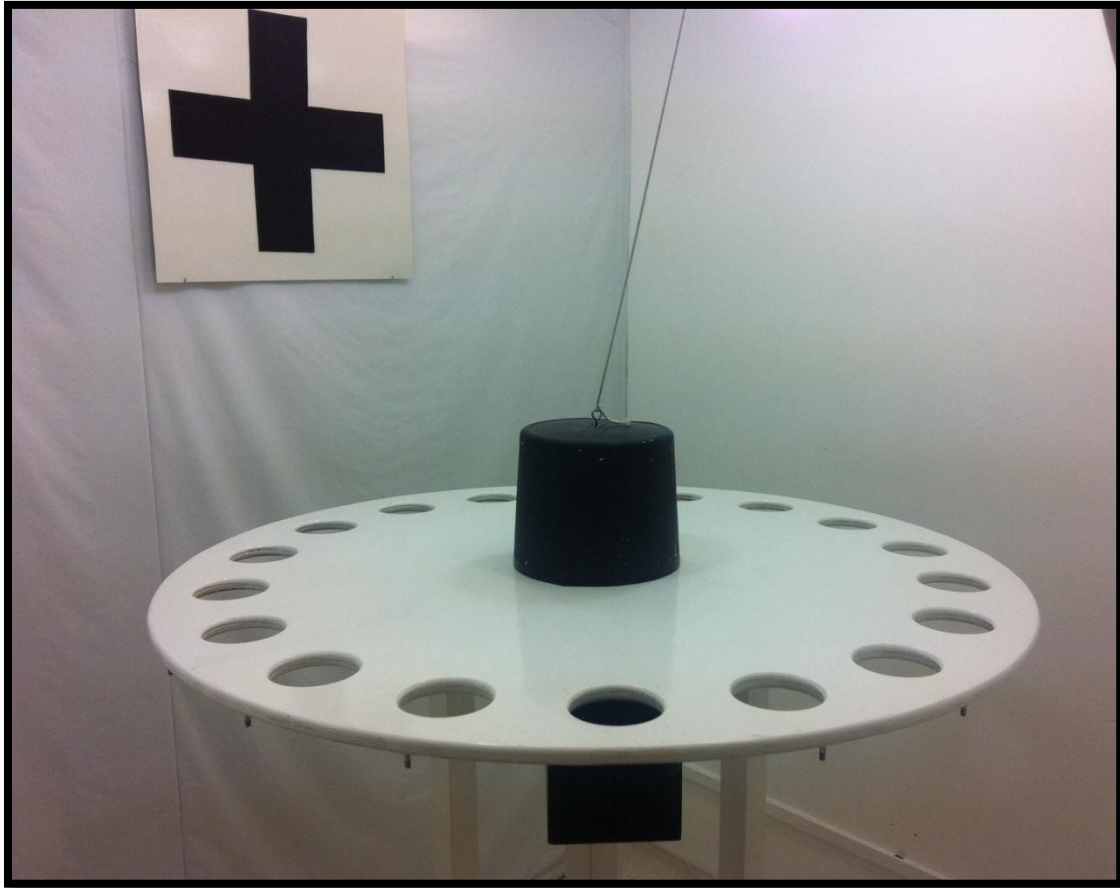
### **Evaluación de memoria visuoespacial con el Laberinto de Barnes**

El laberinto de Barnes consiste en una plataforma blanca circular de 122 cm de diámetro, elevada a 120 cm, con 18 agujeros, espaciados uniformemente alrededor del perímetro de la plataforma, de un diámetro de 9 cm cada uno. Uno de los orificios dirige a la caja de escape (de 30 cm x 12 cm x 8 cm) que se encuentra colocada debajo.

En este laberinto (Fig 8) las ratas son motivadas a buscar el orificio de escape con luz brillante y ruido blanco a 90dB el cual se enciende cuando comienza la tarea y se apaga una vez que la rata logra entrar a la caja de escape (Troncoso et al., 2010).

Debido a que los animales deben aprender mediante claves visuales espaciales una trayectoria determinada que los lleve a la caja de escape, logrando huir (Troncoso et al., 2010), el laberinto se encuentra en una habitación totalmente blanca, con dos claves visuales en las paredes (una cruz y un triángulo negros). Todos los ensayos fueron grabados con una cámara de video directo a la computadora.

Los ensayos se realizaron durante el periodo de luz de las ratas, después de las 13:00 hrs, sin un horario fijo, tomando en cuenta las variaciones diurnas en la expresión de receptores CB1 antes reportadas (Martínez-Vargas et al., 2003).



**Fig 8. Laberinto de Barnes.** Fotografía del laberinto que fue utilizado para realizar las evaluaciones conductuales de aprendizaje y memoria visuoespacial. Se muestra la mesa giratoria, el cilindro, la caja de escape y una de las claves visuales usadas.

---

### *Aprendizaje*

- Antes de comenzar con la fase de entrenamiento y después de cada ensayo, la mesa del laberinto fue limpiada en su superficie y cada agujero, usando una solución de alcohol al 10%. Además de la limpieza, la mesa se rotó sobre su eje central azarosamente y cuidando que no volviera a coincidir con el agujero anterior, todo esto, con el fin de evitar las señales olfativas.

- 1) El primer día se realizó la habituación del sujeto al laberinto, para esto se colocó en el cilindro durante 10 s, posteriormente se dirigió y se introdujo a la rata a la caja de escape, y se le mantuvo dentro de esta durante dos minutos, con el fin de habituarla al lugar donde debía llegar. Todas las manipulaciones se realizaron durante el periodo de luz de los animales (Fig 9).
- 2) A partir del segundo día comenzaba el periodo de aprendizaje. Se colocaba al sujeto en el cilindro de escape y se dejaba al centro de la mesa; pasados 10 s, se levantaba el cilindro y se encendía el ruido blanco a 90 dB (utilizado como reforzador negativo). Se dejaba a la rata explorar 4 min. Durante estos minutos el número de errores y la latencia fueron medidos y registrados por el experimentador.

El ensayo terminaba cuando la rata entraba en la caja de escape, o bien después de que transcurrían los 4 min. Inmediatamente después de que la rata entraba en el agujero donde estaba la caja de escape se apagaba el ruido. Se contabilizaban 10 s de permanencia dentro de la caja. Si al paso de 4 min la rata no entraba en la caja de escape, el experimentador debía guiarla hacia ahí, como lo hacía durante la habituación.

**Se cuantificaron:**

**Errores:** número de veces que la rata introducía la cabeza en un orificio que no es el de la caja de escape, se contaban desde que se levantaba el cilindro y hasta que tenía el primer encuentro con el agujero meta.

**Latencia:** tiempo que transcurría desde el inicio hasta el primer encuentro con la caja de escape.

- 3) Una vez terminado el ensayo, se regresaba a la rata a su caja hasta la siguiente prueba, el intervalo entre ensayos era de 15 min y se realizaba 4 veces al día. Se repetían estos pasos durante los 4 días correspondientes al periodo de aprendizaje.

#### *Evaluación de memoria 24 hrs después*

El día 5 después de 24 hrs de haberse realizado el último ensayo del día 4 de aprendizaje, se realizaba una evaluación de memoria. En ésta, la caja de escape no se colocaba en el laberinto. El sujeto se ponía en el laberinto y exploraba durante un intervalo fijo de 90 s. La prueba se realizaba para determinar si el animal recordaba en donde se encontraba la caja de escape. Se contabilizaba el número de veces que introducía la cabeza en el agujero (y 2 agujeros antes o 2 después) en donde había estado la caja de escape los 4 días de aprendizaje.

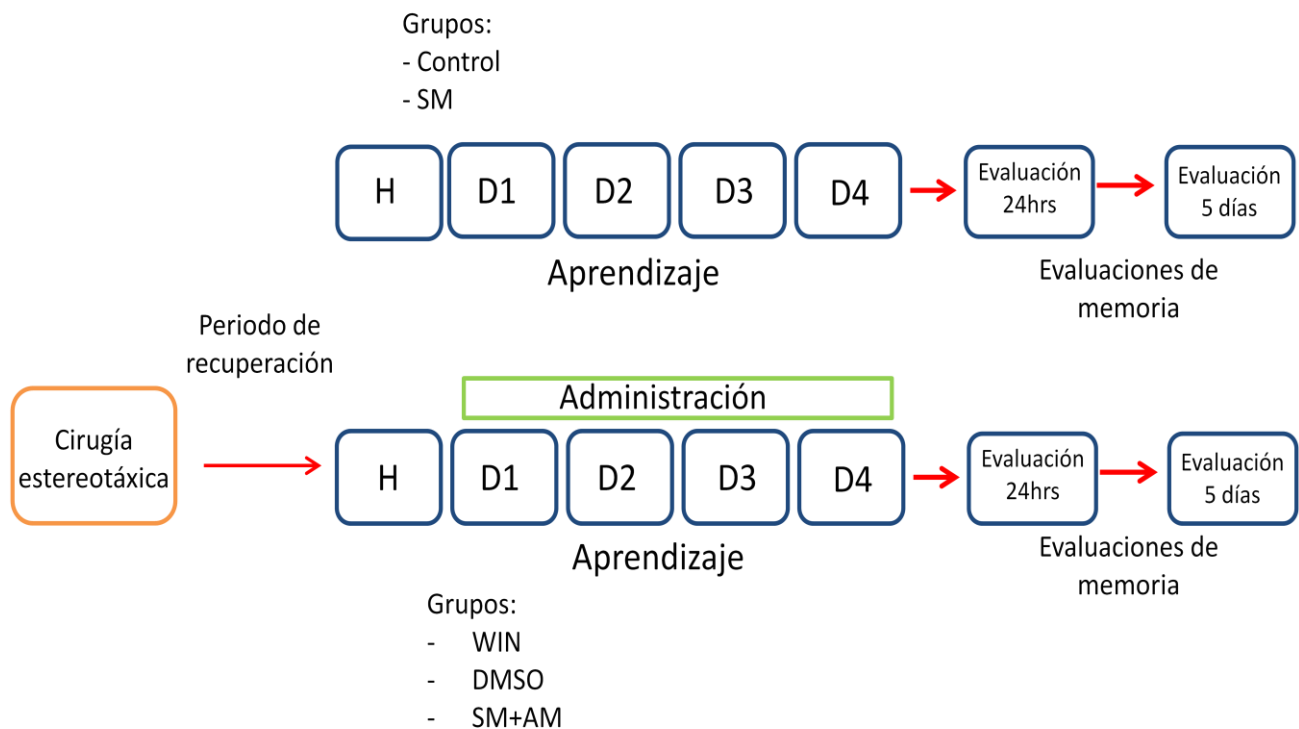
#### *Evaluación de memoria 5 días después*

Para esta evaluación, la prueba se efectuaba el día 12, sin ningún tipo de sesión de entrenamiento previo entre los días 5 y 12. Se repetían los pasos de la evaluación de memoria 24 hrs después.



### Periodo de reversión

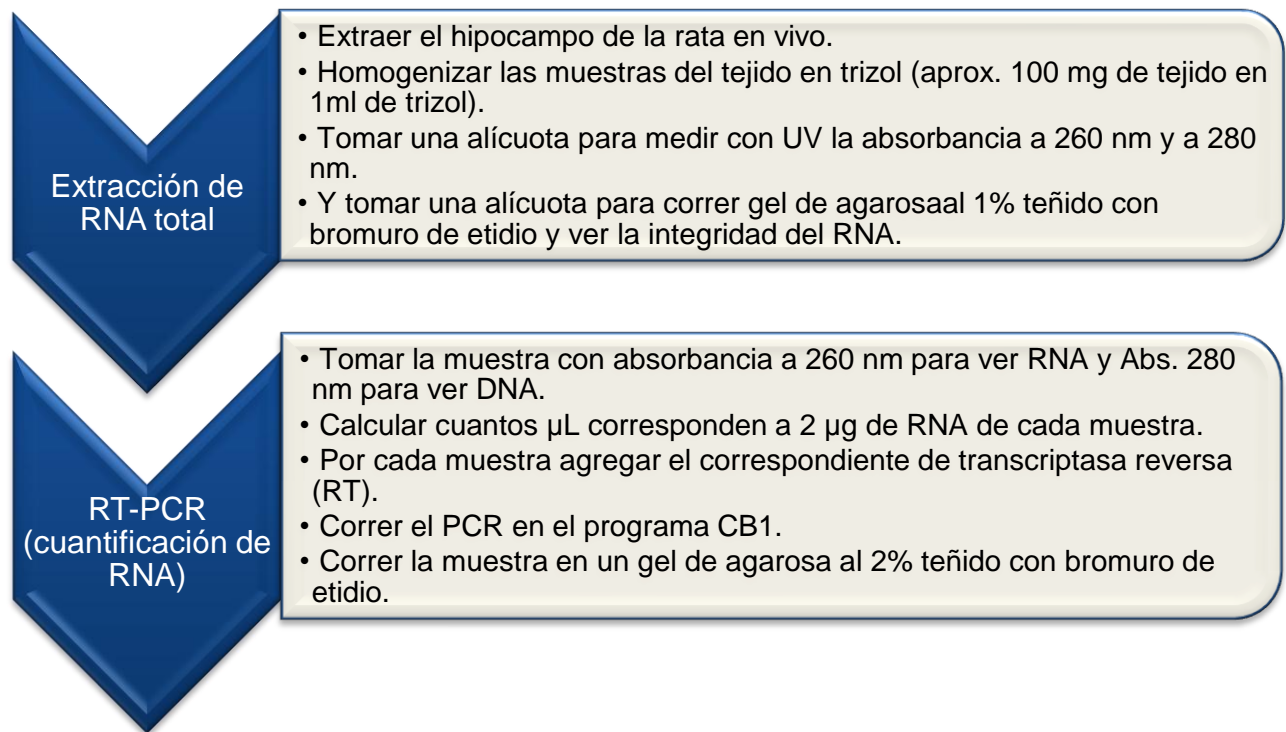
Los pasos de la fase de aprendizaje se repitieron durante el periodo de reversión, pero en esta fase la caja de escape se colocó a 180° del agujero original para todos los días y en todos los ensayos. Este periodo se realizó siguiendo el protocolo original de O'Leary et al. (2011), permite verificar que los sujetos se guiaron con las claves visuales y evalúa procesos de flexibilidad y reaprendizaje de los sujetos. Por otro lado, también funciona como un control positivo con el uso de los fármacos, ya que en este periodo los sujetos no recibieron administración de ninguno. Los resultados de esta parte del protocolo no se muestran.



**Fig 9. Protocolo de laberinto de Barnes.** Procedimientos que se llevaron a cabo, para cada grupo por día, durante la aplicación del protocolo del laberinto de Barnes.

## **Extracción de RNA total de hipocampo y reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT- PCR)**

La extracción de RNA total y el PCR-TR son dos ensayos semicuantitativos estandarizados que se utilizan para la detección de RNAm de receptores. Se hacen con la ayuda de oligonucleótidos específicos para la retrotranscripción y amplificación del mensajero del receptor, en este caso se utilizó para CB1 y para Ciclofilina (CYC), que se usó como control. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, terminado el último día de prueba en el laberinto; se les extrajo el cerebro y se manipuló en frío. Para determinar si ocurrió una modificación en la expresión de los receptores CB1 se extrajo el hipocampo izquierdo de la rata y se preparó para realizar un análisis RT-PCR (Fig 10) o bien el hipocampo derecho para el análisis de Western blot. Estos procedimientos se realizaron con una muestra ( $n=5$ ) de cada grupo, una vez que se había aplicado el protocolo de laberinto de Barnes a todos los grupos. Parte de este trabajo se realizó con la colaboración de la Dra. Marina Martínez y la Dra. Luz Navarro en el Laboratorio de Neuroinmunología de la Facultad de Medicina. Con el protocolo descrito en Martínez-Vargas et al., 2003.

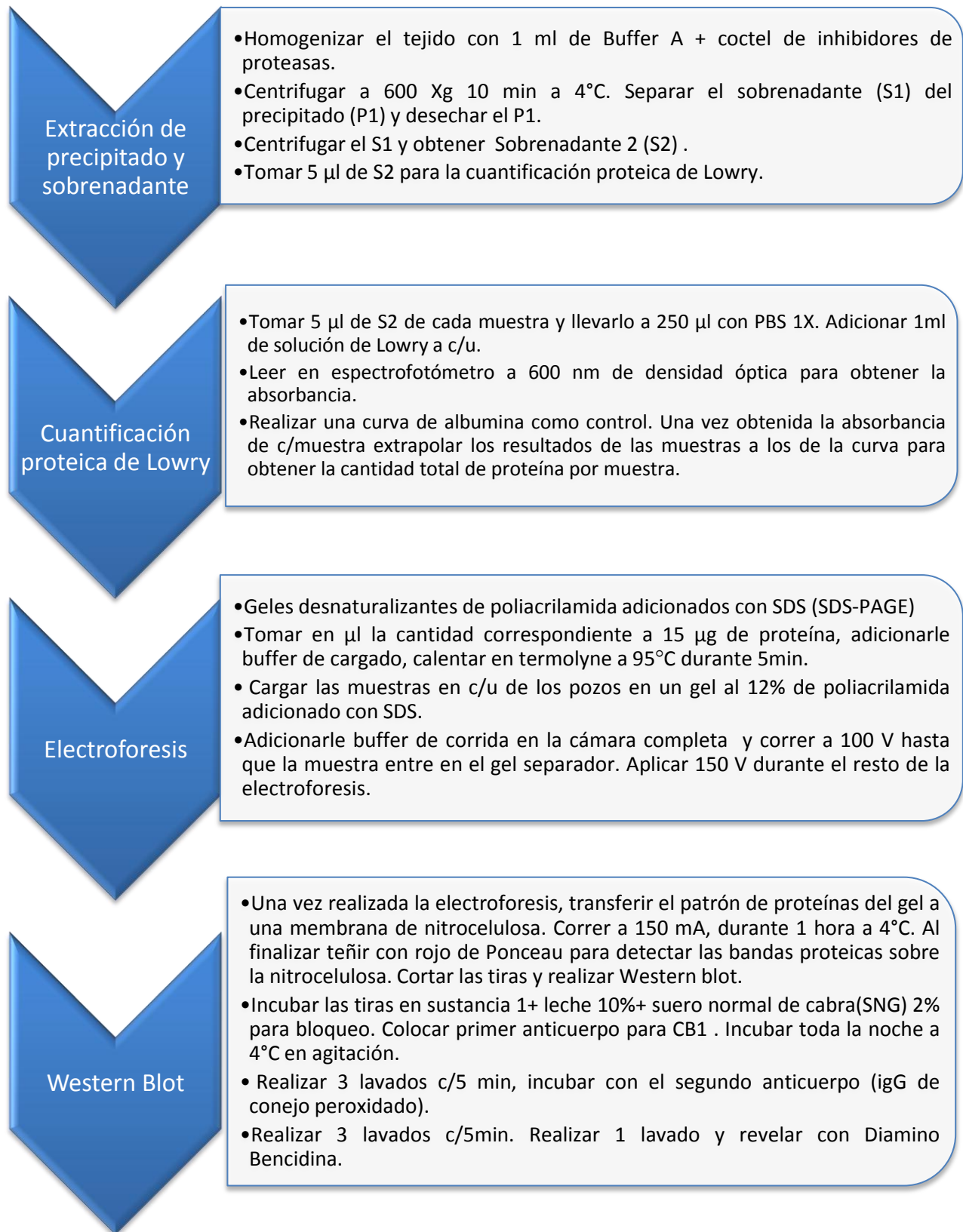


**Fig 10. Procedimiento que se realizó en para la extracción de RNA total de hipocampo y reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR).**

### **Western blot**

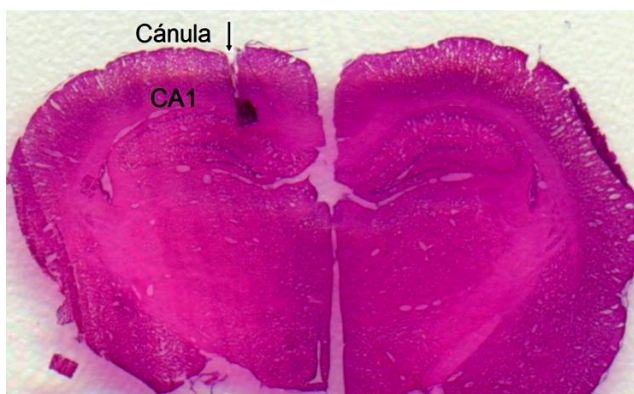
El Western blot es un ensayo cualitativo *in vitro* para la detección de anticuerpos IgG contra la proteína CB1. Para realizar el análisis se usó una  $n=5$  por grupo. Se utilizó el hipocampo derecho de la rata, este se extrajo y se colocó en tubos *ependorf* y se congeló inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  en hielo seco. Para esta prueba se siguió el procedimiento estandarizado y utilizado en el laboratorio de Neuroinmunología de la Facultad de Medicina con la colaboración de la Dra. Marina Martínez. El procedimiento consta de cuatro procesos y estos están descritos en la Figura 10 (Martínez-Vargas et al., 2003).

**Fig 11. Procedimiento para muestras de Western blot**



## Histología

Al finalizar las pruebas conductuales los cerebros de los animales a los que se les realizó cirugía estereotáxica fueron extraídos y almacenados en una solución de paraformaldehído al 4% (en 0,1 M solución salina amortiguada con fosfatos; PBS). Los cerebros fueron cortados y montados en un portaobjetos, posteriormente se tiñeron con hematoxilina para verificar la posición de la cánula (Fig 12), se descartaron a los animales que la cánula no fue colocada correctamente (y los que desarrollaron otitis).



**Fig 12. Sitio de administración en el hipocampo.** En la figura se muestra la posición de la cánula en un corte coronal, representativo, del cerebro de los sujetos utilizados en este experimento, teñida con hematoxilina. El sitio de administración de los fármacos fue en el área de CA1 del hipocampo derecho.

---

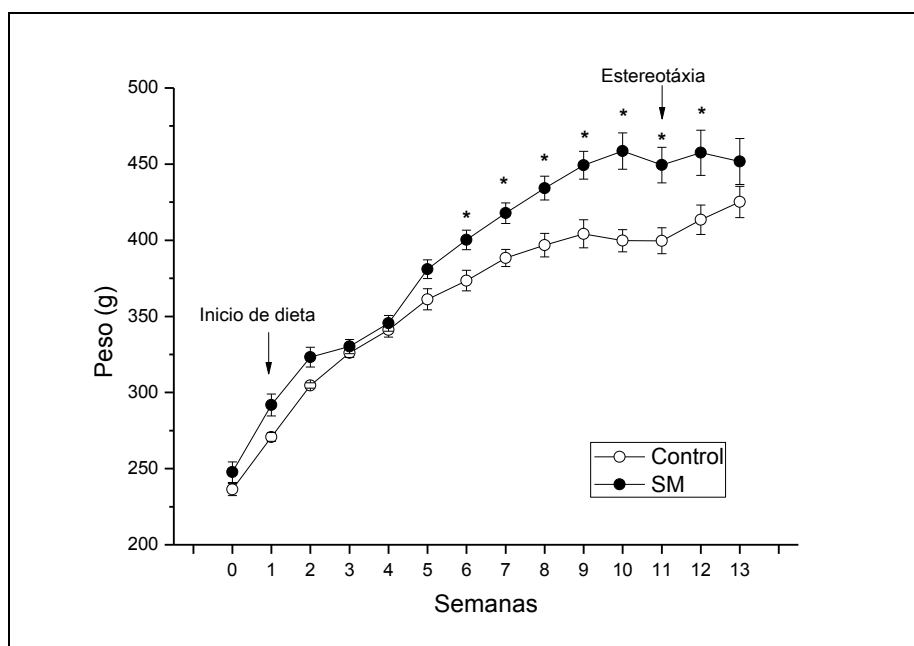
## Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con las pruebas t de *student*, ANOVA mixto y ANOVA de una vía según el caso. Además, se realizó la prueba *post hoc* *Tukey Honest significant Difference* (HDS). También se realizaron análisis de correlación de *Pearson* entre la densidad de los receptores CB1 y el aprendizaje (medido a través del número de errores) en la tarea de MVE. El nivel de significancia fue de  $p < 0.05$  para todas las pruebas.

## V. RESULTADOS

### *Resultados metabólicos*

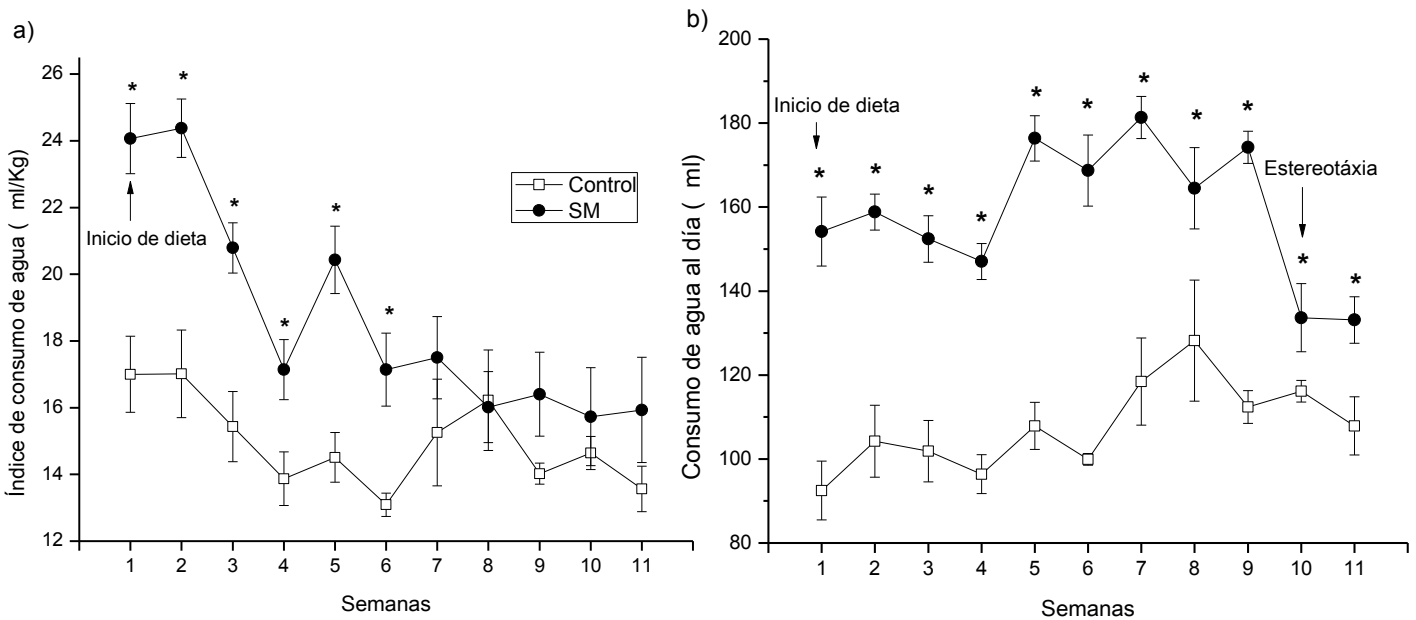
En este estudio se utilizó una dieta de sacarosa al 20% en el agua de beber para el grupo experimental (SM) y una dieta con agua simple para el grupo control. Para diagnosticarlas con SM se realizaron mediciones de los parámetros físicos y metabólicos. Con el objetivo de saber si la dieta influyó para provocar obesidad y el posterior desarrollo de SM, el peso corporal de ambos grupos (control y SM) fue medido semanalmente. Durante las primeras cuatro semanas que las ratas recibieron la dieta hipercalórica mostraron un incremento de peso igual al de las ratas control. A partir de la quinta semana, el grupo SM se separó del grupo control mostrando un mayor incremento de peso (aprox. 50 g más) (Fig 1). El ANOVA mixto indicó diferencias significativas para el factor grupo  $F_{(1,26)}=6.183$   $p=0.020$ , en función de la semana  $F_{(2.068, 53.776)}=201.374$   $p<0.001$  y para la interacción semana por grupo  $F_{(2.068, 53.776)}= 3.673$   $p=0.031$ . Posteriormente, para analizar en qué semanas se encontraban las diferencias, se realizaron comparaciones planeadas. Se encontró que a partir de la sexta semana el grupo SM muestra diferencias significativas  $p<0.05$ .



**Fig 1. Peso corporal.** Curva de la media  $\pm$  ES, del peso corporal durante 12 semanas de tratamiento con sacarosa. Se muestra el peso inicial, el inicio de la dieta y se encuentra marcada la semana en que se realizó la cirugía estereotáxica a los sujetos del grupo SM (por lo que se observa una disminución de peso en esa semana S11). ANOVA mixto, grupo control (en círculos blancos)  $n=8$  y SM (en círculos negros)  $n=20$ , \*  $p<0.05$ .

Con el objetivo de responder si el incremento de peso observado fue debido a las diferencias en la dieta se cuantificó el consumo de agua con sacarosa y alimento de ambos grupos. Se calculó el índice de consumo de agua (por sujeto), para saber cuánto bebía con respecto a su peso. Se observa que las ratas del grupo SM consumieron mayor cantidad de agua durante las primeras seis semanas de dieta y este consumo disminuyó en las siguientes semanas (Fig 2a). El ANOVA mostró diferencias para el factor grupo  $F_{(1,9)}=14.613$   $p=0.004$ , el factor semana  $F_{(3,642, 32.782)}=11.33$   $p<0.001$ , y para semana por grupo  $F_{(3,642, 32.782)}=3.746$   $p=0.015$ . Las diferencias fueron significativas desde la semana uno a la semana seis.

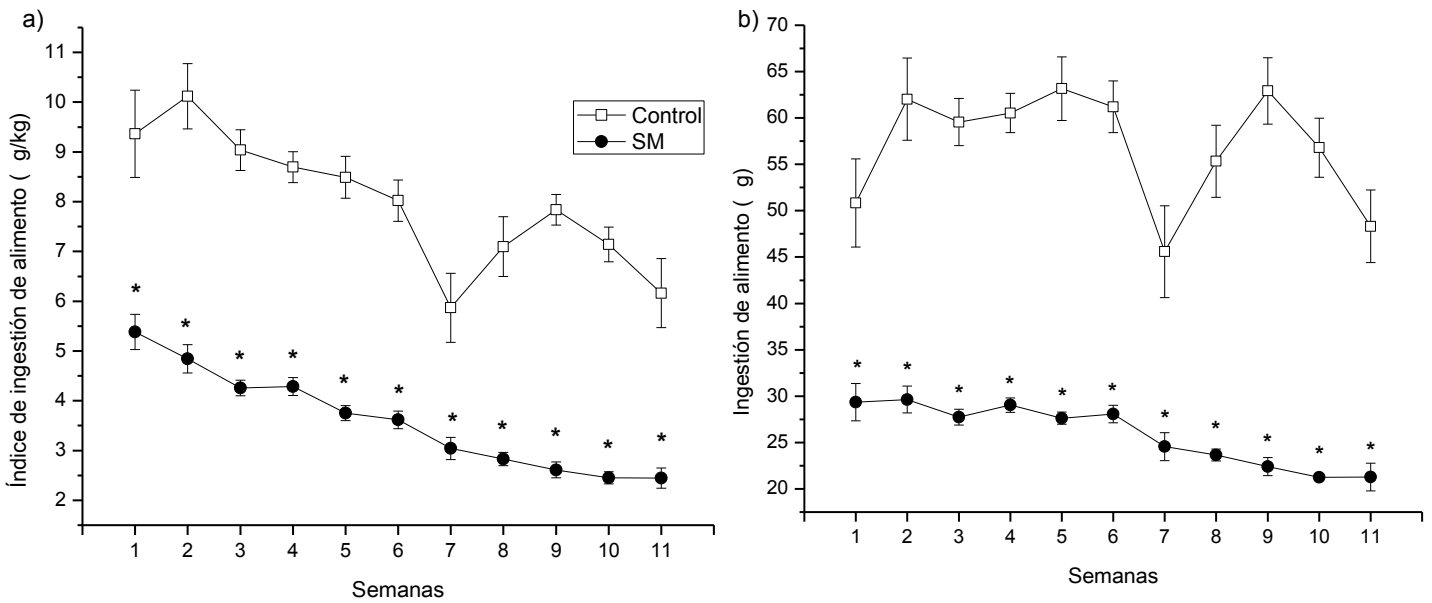
También, se muestra que las ratas que recibieron la dieta hipercalórica tuvieron un mayor consumo de agua que el grupo control, desde la primera semana con la dieta y durante todo el tiempo que recibió el tratamiento (Fig 2b). Se observa que el grupo SM tuvo un incremento gradual del consumo de sacarosa que es mayor en la quinta semana, esto concuerda con el incremento de peso que tuvo el grupo SM en la misma semana (Fig 1). Nuevamente, el ANOVA arrojó las diferencias para el factor grupo  $F_{(1,14)}=23.119$   $p<0.001$ , el factor semana  $F_{(3,642,50.986)}= 4.762$   $p=0.003$ , y para la interacción semana por grupo  $F_{(3,642,50.986)}= 3.082$   $p=0.027$ . Estas diferencias ocurrieron en todas las semanas.



**Fig 2. Tratamiento de sacarosa. (a) Índice de consumo de agua.** Media  $\pm$  ES de cuanto bebe la rata con respecto a su peso. **(b) Consumo de agua al día.** Media del consumo de agua con sacarosa (en el caso de SM) graficado por semana. Grupo control (en cuadrados blancos)  $n= 8$  y SM (en círculos negros)  $n=20$ , \* $p<0.05$ .



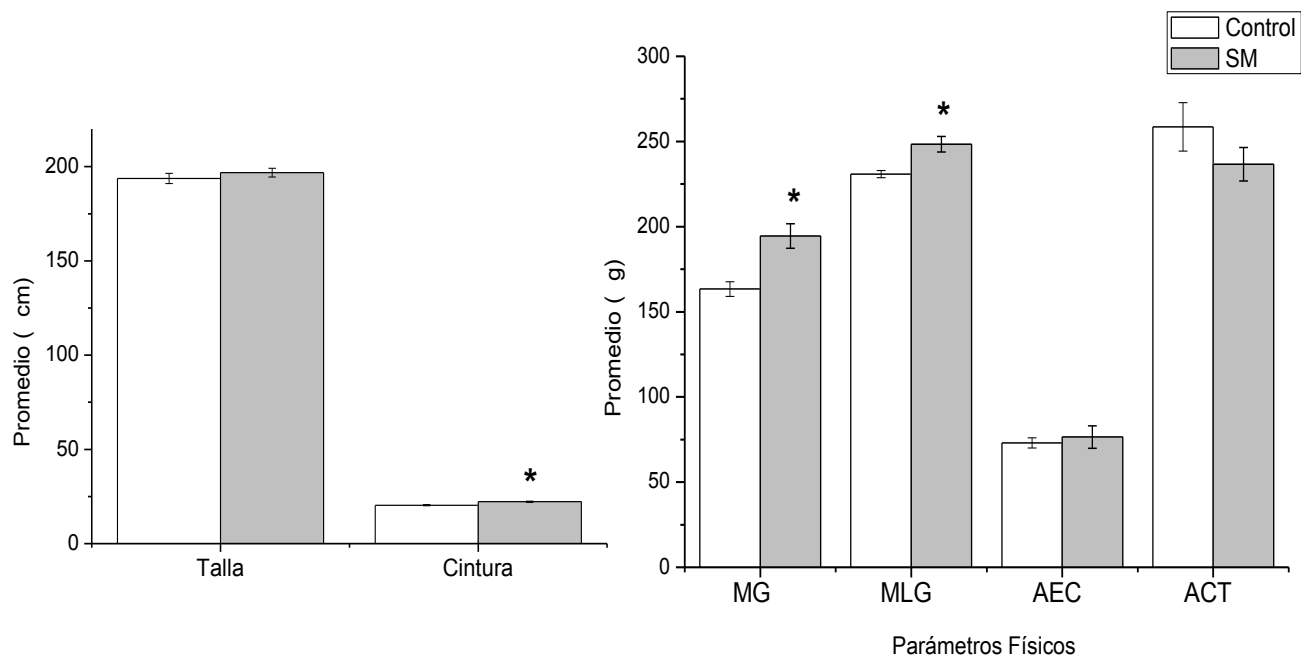
Por otro lado, se encontró que las ratas del grupo SM disminuyeron su ingestión de alimento comprados con el grupo control. Esto ocurrió tanto para el índice, como para el consumo de alimento (Fig 3a y Fig 3b). El ANOVA indicó en el análisis del índice de consumo, que hay diferencias significativas en función del grupo  $F(1,9) = 234.586$   $p < 0.001$  y el efecto semana  $F(2.644, 23.794) = 20.360$   $p < 0.001$ , pero no hubo interacción significativa ( $p = 0.194$ ). Para el análisis de la variable ingestión de alimento, todos los efectos fueron significativos con una  $p < 0.001$  (grupo  $F(1,14) = 336.780$   $p = 0.000$  semana  $F(3.280, 45.927) = 10.507$   $p = 0.001$ ; semana por grupo  $F(3.280, 45.927) = 5.528$   $p = 0.001$ ).



**Fig 3. Consumo de alimento. (a) Índice de ingestión de alimento.** Media  $\pm$  ES de cuanto come la rata con respecto a su peso. **(b) Ingestión de alimento al día.** Media del consumo de *rat chow* graficado por semana. Grupo control (en cuadrados blancos)  $n = 8$  y SM (en círculos negros)  $n = 20$ , \*  $p < 0.05$ .

Debido a que los resultados del peso corporal fueron significativamente diferentes, se midieron otros parámetros físicos, como la talla, la circunferencia abdominal (cintura) y la

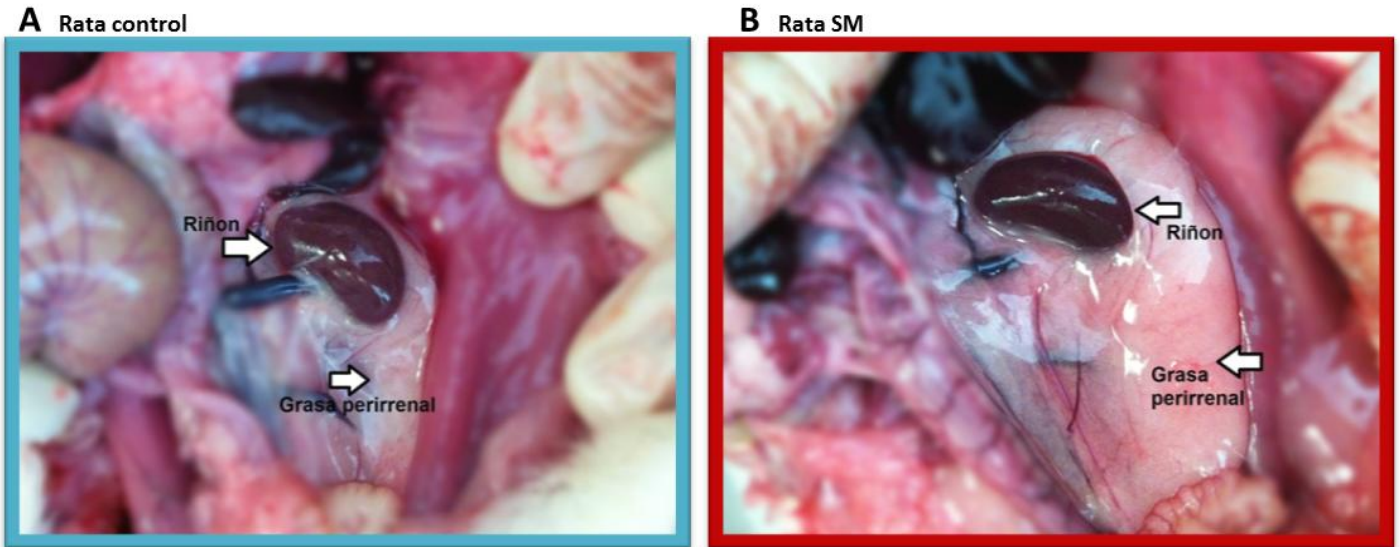
composición corporal. En la Fig 4 se muestran los datos obtenidos de los parámetros físicos de los dos grupos. Se observó que la cintura de los sujetos SM fue mayor (M=22.21; SD=1.61) que la de los controles (M=20.40; SD=1.19);  $t(29)=-3.35$ ,  $p=0.002$ . Esto mismo ocurrió con la grasa masa (tejido adiposo) que fue menor para el grupo control (M=163.34; SD=14.68) y mayor para el grupo SM (M=194.47; SD=31.58);  $t(29)=-3.18$ ,  $p=0.003$ ; y la masa libre de grasa (control, M=230.86; SD=7.44 y SM, M=248.42; SD=19.90);  $t(29)=-2.91$ ,  $p=0.007$  según el análisis estadístico realizado.



**Fig 4. Composición corporal. a)** Media  $\pm$  DE de la talla y cintura medida en cm. **b)** (MG) Masa grasa, (MLG) Masa libre de grasa, (AEC) Agua extracelular y (ACT) agua corporal total medida en gramos,  $t$  de *student* para grupos independientes, Control  $n=12$  y SM  $n=20$ ,  $*p<0.05$ .

Esto también se puede observar en la Fig 5 donde se muestran dos ratas de peso similar que fueron sacrificadas y diseccionadas, la cantidad de grasa acumulada perirrenal es mayor en la rata tratada a simple vista (no fue medida).

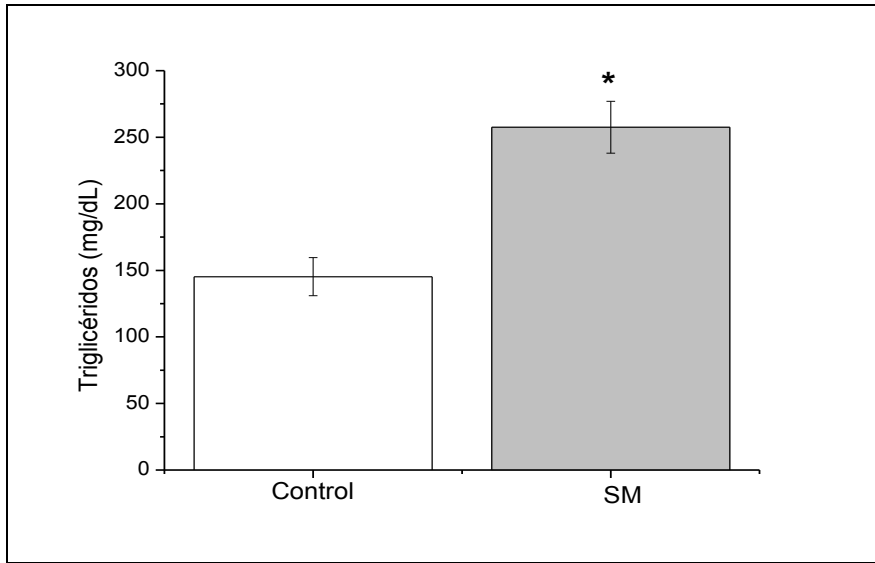
No se observaron diferencias entre los grupos en las medidas de talla, agua extracelular y agua corporal total.



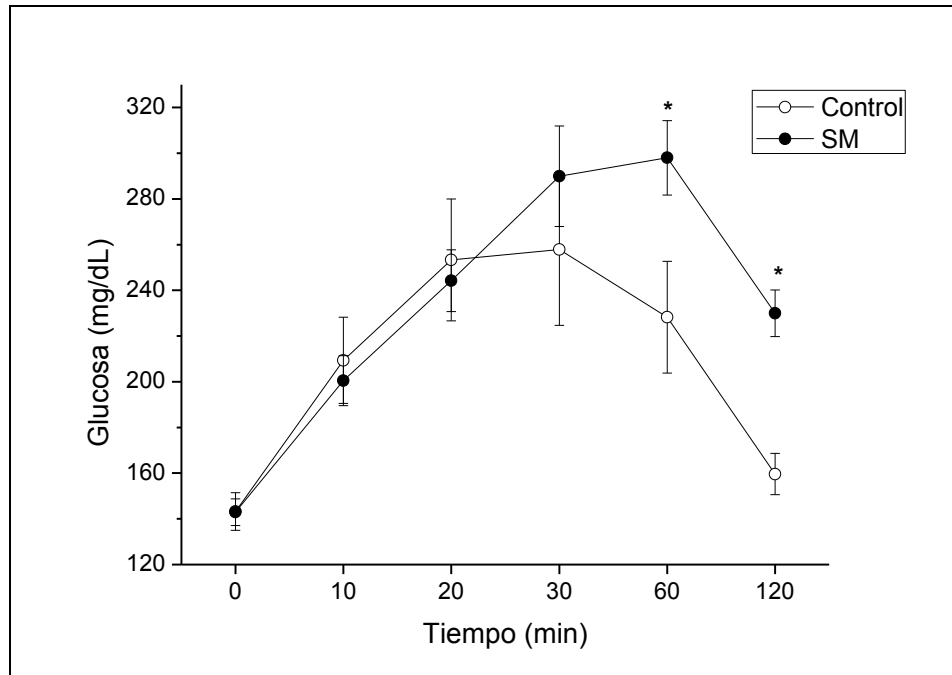
**Fig 5. Grasa corporal.** Fotografía de la disección a la altura de los riñones, de dos ratas, con pesos similares. Obsérvese la cantidad de grasa acumulada alrededor de los riñones; de lado izquierdo en margen azul rata control y del lado derecho en margen rojo rata con SM.

La hipertrigliceridemia es otra manifestación de los sujetos que padecen SM, cuando hay altas cantidades de grasa en el cuerpo los triglicéridos se pueden ver alterados o incrementados. Con el objetivo de analizar si los triglicéridos revelan alguna diferencia entre el grupo control y el grupo SM se realizó su medición en sangre de la cola de la rata.

Los niveles de triglicéridos incrementaron significativamente en los sujetos del grupo SM (M=257.50; SD=40.48) y las ratas control presentaron niveles normales (M=145.25; SD=40.48),  $t(24)=-3.61$ ,  $p=0.001$  (Fig 6).



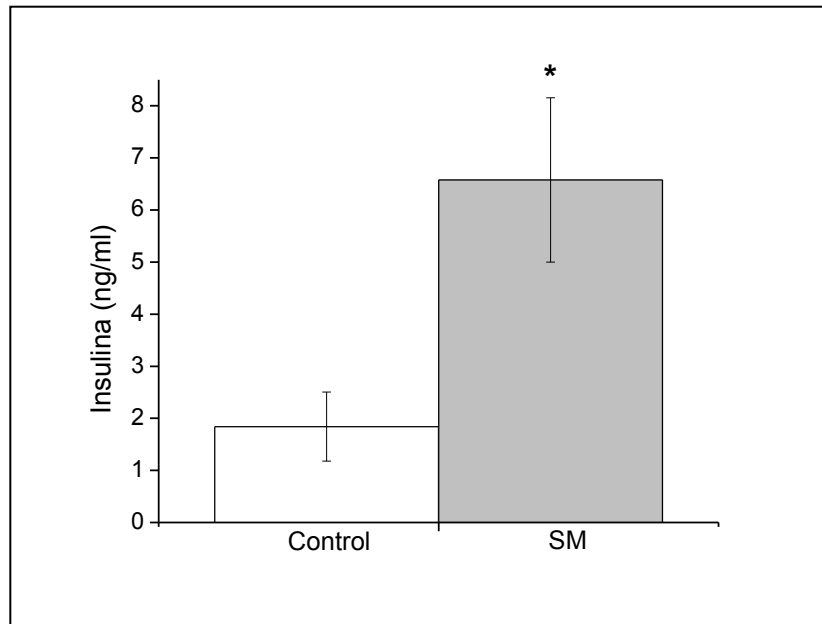
**Fig 6. Triglicéridos.** Media  $\pm$  DE del nivel de triglicéridos, *t* de *student*, control  $n=8$  y SM  $n=18$ , \*  $p<0.05$



**Fig 7. Curva de tolerancia a la glucosa.** Prueba intraperitoneal, se muestra la media de los niveles de glucosa en sangre del min cero (antes de la carga de glucosa) y hasta 120 minutos después de la carga; grupo control  $n=8$  y SM  $n=17$ , \*  $p<0.05$ .

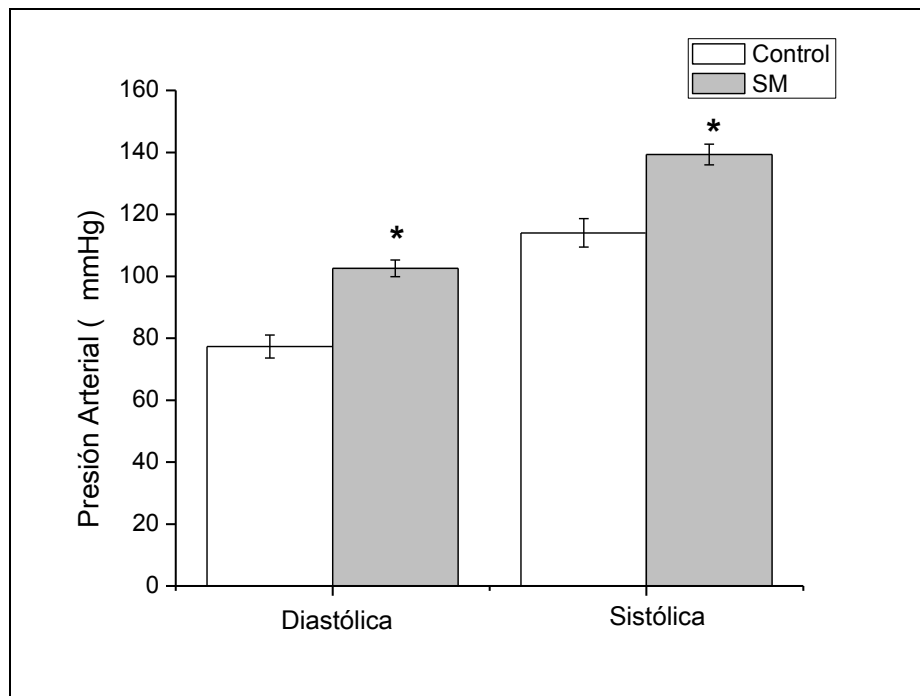
Se realizó la curva de tolerancia a la glucosa (prueba ip). La curva del grupo control presentó el máximo punto glucémico a los 20 minutos posterior a la administración de glucosa, que continuó con una baja gradual en la glucemia hasta alcanzar los niveles basales al minuto 120. Por otro lado, el grupo SM mostró el punto más alto en los niveles en el minuto 60 después de la administración de la glucosa, con una disminución más lenta y sin llegar a alcanzar los niveles basales (Fig 7). El ANOVA mixto muestra que hubo diferencias para el efecto tiempo  $F_{(3.008, 69.178)} = 26.864$   $p < 0.001$ , para la interacción tiempo por grupo  $F_{(3.008, 69.178)} = 3.836$   $p = 0.013$ . Pero no para el efecto grupo ( $p = 0.181$ ). Los puntos del minuto 60 y el minuto 120 del grupo SM fueron diferentes significativamente con respecto del grupo control.

La insulina rige un estrecho control del equilibrio que debe haber entre la producción de glucosa y su absorción, por esto una curva de tolerancia a la glucosa alterada sugiere una modificación en la secreción normal de insulina. Con el fin de analizar si se modificaron los niveles de insulina por la dieta hipercalórica se realizó su medición. Los niveles de insulina de las ratas control no se vieron alterados mientras que los de las ratas SM aumentaron hasta 7 ng/ml, de acuerdo con la prueba *t de student* se determinó que los niveles de insulina del grupo SM fueron más altos ( $M = 6.57$ ;  $SD = 4.46$ ) que los del grupo control ( $M = 1.84$ ;  $SD = 1.87$ );  $t(14) = -2.76$ ,  $p = 0.015$  (Fig 8). La hiperinsulinemia severa puede conducir a DM2; sin embargo, los niveles que presenta el grupo SM aún no se consideran suficientemente altos para diagnosticarla.



**Fig 8. Niveles de insulina.** Media  $\pm$  DE de los niveles de insulina en sangre (prueba a las 13 semana de tratamiento) grupo control  $n=8$  y grupo SM  $n=8$ , t de student, \*  $p<0.05$ .

Debido a que la hipertensión se conoce como un signo del SM se evaluó si se veían alteraciones en la presión arterial de las ratas que recibieron la dieta alta en sacarosa. Para esta prueba los sujetos fueron habituados durante 15 días en un inmovilizador para evitar que el estrés que provoca el aparato interfiriera en las mediciones. Se observó que las ratas del grupo SM mostraron una mayor presión diastólica ( $M=102.54$ ;  $SD=8.83$ ) y una mayor presión sistólica ( $M=139.72$ ;  $SD=11.04$ ) a la del grupo control (diástole  $M=77.30$ ;  $SD=10.57$ ; sístole  $M=114.01$ ;  $SD=13$ , diástole  $t(17)=-5.66$ ,  $p<0.0001$  y sístole  $t(17)=-4.57$ ,  $p<0.0001$ ; Fig 9). Según los resultados se puede considerar que las ratas que recibieron la dieta son hipertensas.



**Fig 9. Presión arterial.** Promedio  $\pm$  DE de la presión diastólica y sistólica, los valores se presentan en unidades de milímetros de mercurio (mmHg). Control  $n=8$  y SM  $n=17$ ,  $t$  de *student* para grupos independientes,  $*p<0.05$ .

En resumen, el grupo SM fue diferente al control significativamente en todos los parámetros metabólicos que se necesitan para diagnosticar el síndrome (obesidad central (con peso y grasa), curva de tolerancia a la glucosa alterada, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia e hipertensión). Por lo tanto, los sujetos que recibieron la dieta alta en sacarosa desarrollaron SM y, basados en ese diagnóstico, se analizaron el resto de los resultados.

## **Resultados conductuales**

Una vez comprobado que el grupo que recibió la dieta de sacarosa desarrolló SM, se evaluó el aprendizaje y la MVE de todos los grupos en el laberinto de Barnes y se analizaron las curvas de aprendizaje.

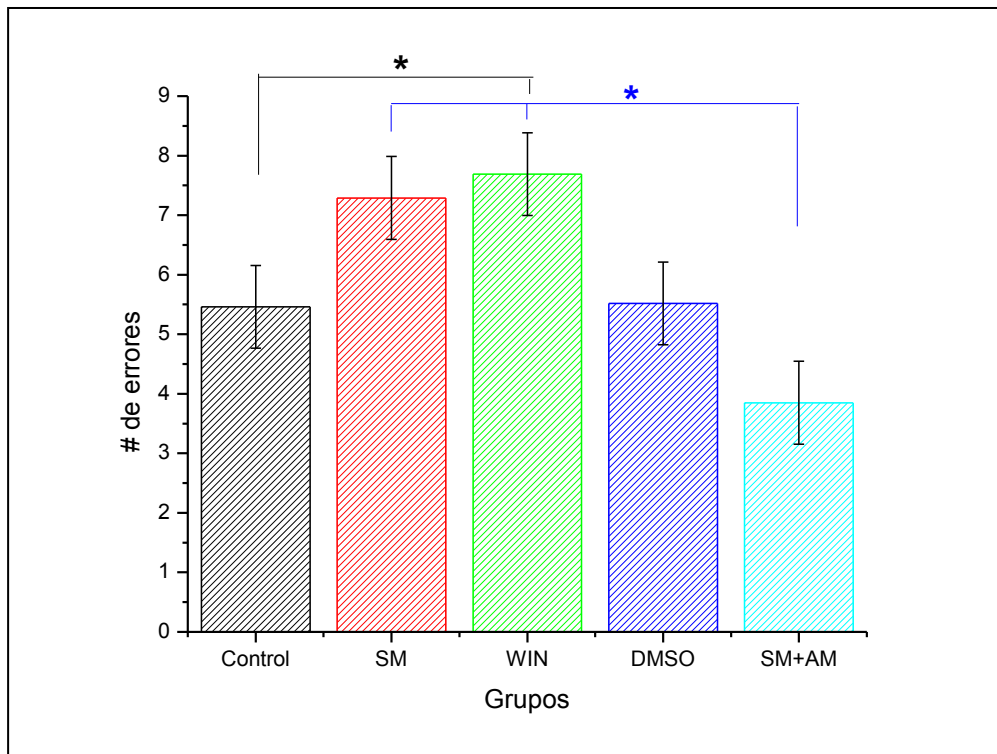
Los datos obtenidos en las curvas de aprendizaje muestran que la curva del grupo WIN es similar a la del grupo SM, ambos grupos se separan del resto con un mayor número de errores en el primer día de evaluación, siendo más notorio el cuarto día de aprendizaje, a diferencia del grupo control que los disminuyó. Se observó también, que la administración de AM-251 a los sujetos que desarrollaron SM (grupo SM+AM), reduce el número de errores, ya que mostraron una curva de aprendizaje sin alteraciones, el número de errores disminuyó desde el primer día y durante toda la ejecución de la tarea; en este caso el día cuatro no presentan el incremento de errores como lo hacen las ratas SM.

De acuerdo con el ANOVA mixto los resultados fueron significativos para el factor día  $F_{(3,12)} = 24.462$   $p < 0.001$ , y para grupo  $F_{(4,41)} = 5.197$   $p = 0.002$ ; la interacción no fue significativa ( $p = 0.692$ ). El *post hoc* de Tukey HDS indica que el grupo SM y WIN difieren significativamente con el grupo SM+AM (la curva no se muestra).

También, se hizo una comparación de la media total de errores de cada grupo, con el propósito de conocer las consecuencias del SM y de los fármacos que actuaron sobre el SeC (CB1). Para saber si ocasionaron las diferencias en los procesos de aprendizaje y MVE entre los diferentes grupos. Se observó que el grupo que presentó el menor número de errores fue al que se le administró el antagonista AM-251 aun cuando estas tenían SM. Estos resultados fueron analizados con ANOVA y la prueba *post hoc* de Tukey los cuales indican que esta diferencia es estadísticamente significativa con respecto de los grupos



SM y WIN. Los grupos WIN y SM tuvieron una tendencia similar a presentar un mayor número de errores; sin embargo, únicamente el grupo WIN fue estadísticamente diferente del control ( $p < 0.05$ ) (Fig 10).

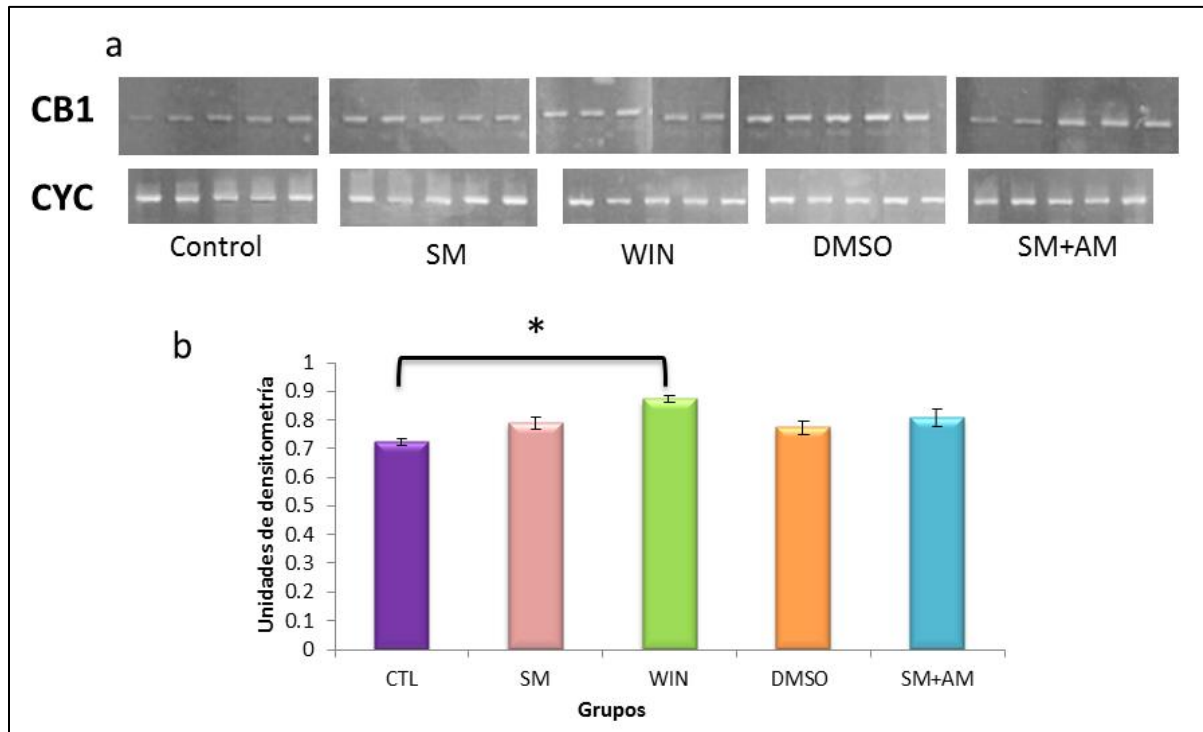


**Fig 10. Media total de errores primarios.** Comparación de la media total de errores primarios  $\pm$  ES, durante el periodo de aprendizaje. Están graficados el grupo control en barra negra ( $n=11$ ), el grupo SM en barra roja ( $n=8$ ), el grupo que recibió WIN en barra verde ( $n=9$ ), el grupo vehículo de DMSO en barra azul oscuro ( $n=10$ ) y el grupo con SM+AM en barra azul claro ( $n=8$ ). ANOVA mixto, *post hoc* Tukey HDS,  $*p < 0.05$ .

De igual forma, se cuantificó la latencia de ejecución de la prueba, con el fin de identificar diferencias. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos ( $p > 0.05$ ).

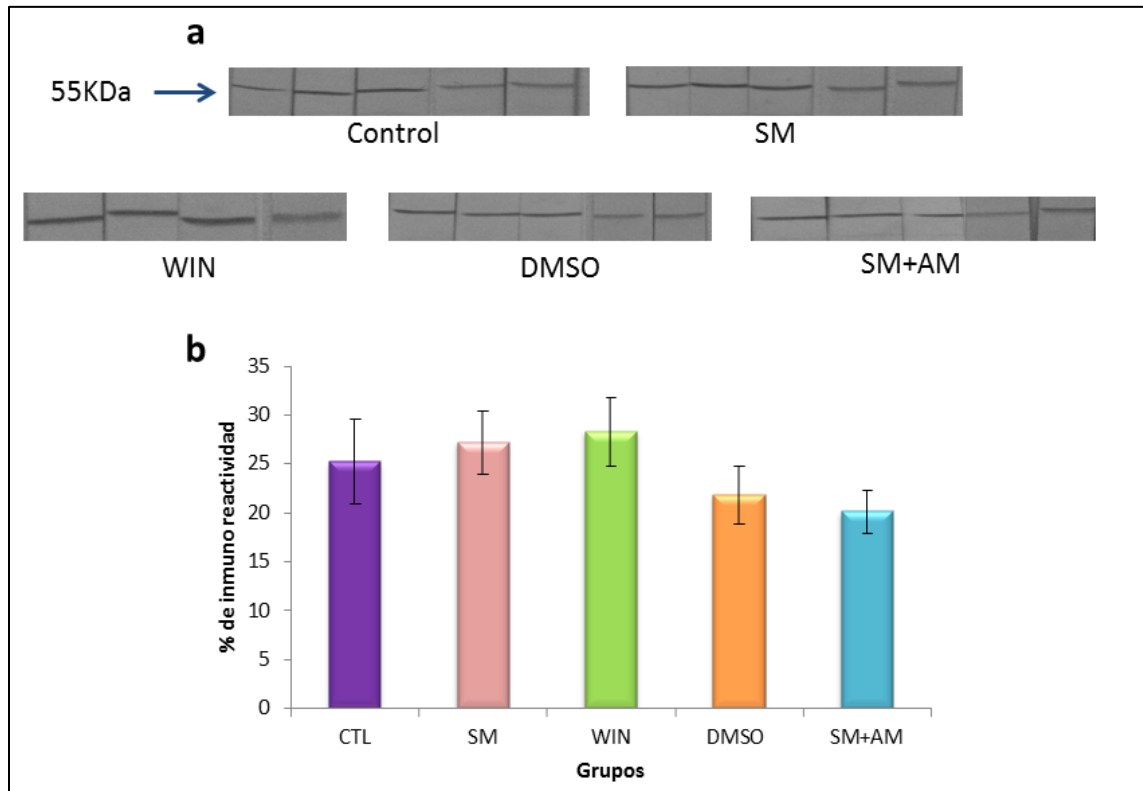
## **Resultados moleculares**

Posterior a analizar los resultados conductuales, se investigó si cambiaba la expresión de los CB1 en los sujetos que mejoraron la ejecución del laberinto de Barnes. Lo primero que se realizó fue la extracción total de RNA del hipocampo de las ratas para detectar los cambios en el RNAm del CB1. Se evaluó su integridad en un gel de agarosa al 1% y se observó con luz UV (no se muestra). Se amplificó el RNAm del CB1 con RT-PCR, y como control, se utilizó Ciclofilina (CYC). Se observó en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, donde distinguimos que la intensidad del grupo control es menor comparada con la de los grupos SM y WIN (Fig 11a). Para comprobar esta observación, se efectuó un análisis densitométrico de los geles, con el programa *Quantity one*, para determinar si la cantidad de RNAm se vio modificada y se graficaron los datos (Fig 11b). Los resultados que arrojó el análisis densitométrico muestran que el RNAm del CB1 en hipocampo aumenta en los grupos SM y WIN. De acuerdo con el ANOVA, existieron diferencias significativas ( $F_{(4,20)} = 4.190$   $p=0.013$ ), entre el grupo control y el de WIN; pero el grupo control no difirió significativamente con el grupo SM.



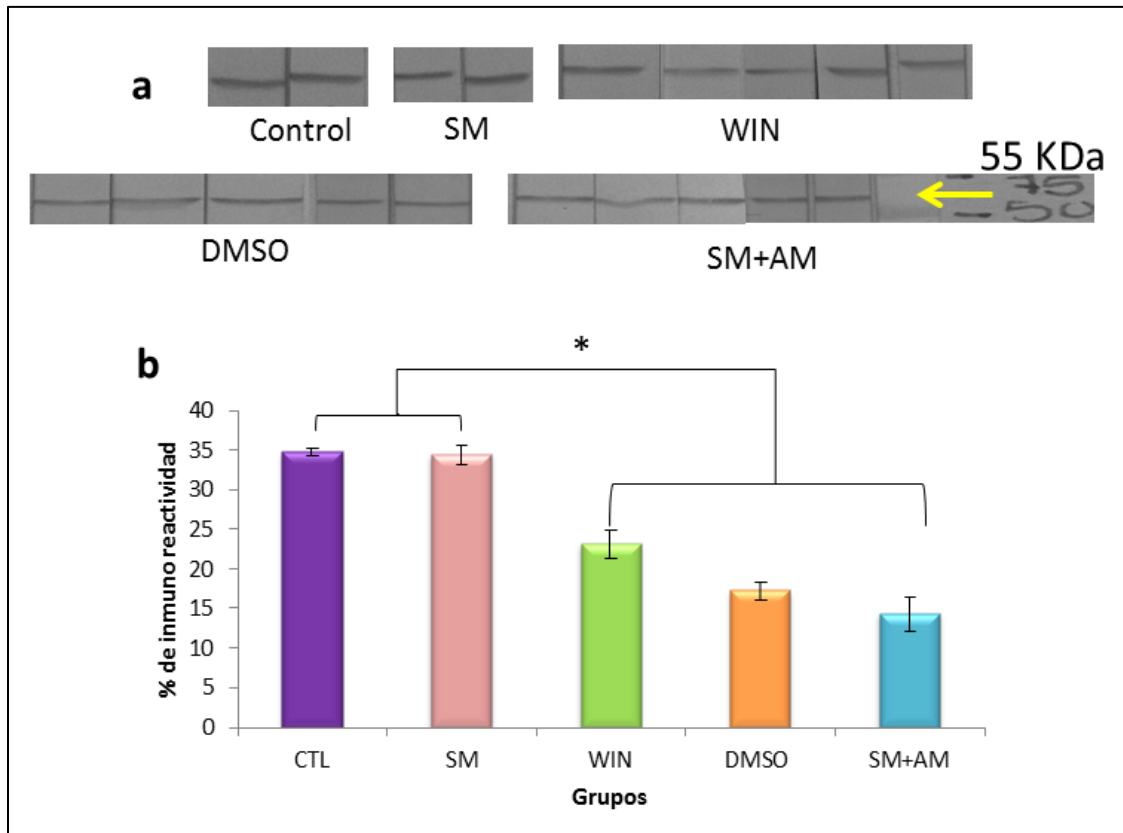
**Fig 11. Detección y cuantificación de RNAm del CB1. (a) RT-PCR (RNAm).** Amplificación del RNAm de CB1 en hipocampo, con oligonucleótido específico para proteína CB1 y con CYC como control, con RT-PCR ( $n=5$  para cada grupo). **(b) Promedio de intensidad de RNAm de CB1.** Datos obtenidos del análisis densitométrico. En morado ratas control, SM en rosa, WIN en verde, DMSO en naranja y SM+AM en Azul. Media  $\pm$  ES, ANOVA de un factor,  $*p<0.05$ .

Se realizó un Western blot para probar si la cantidad de proteína había cambiado y conocer cómo fue la codificación del RNAm en hipocampo. Los datos que obtuvimos se muestran en las bandas de Western blot que corresponden a la proteína CB1, con un peso aproximado a 55KDa que es el reportado que corresponde al receptor CB1 (Martínez-Vargas et al., 2003). Los resultados fueron arrojados nuevamente por un análisis densitométrico, no se observaron cambios estadísticamente significativos ( $p>0.05$ ) (Fig 12).



**Fig 12. Western Blot para CB1 en hipocampo. (a) Intensidad neta del receptor CB1 en hipocampo.** Fotografía de Western Blot de la proteína CB1 en hipocampo de rata en grupos con diferentes tratamientos. **(b) Densitometría del Western Blot.** Gráfica de la densitometría obtenida.  $n=5$  excepto grupo WIN con una  $n=4$ . En barra morada se muestra grupo control, barra rosa grupo SM, barra verde grupo WIN, barra naranja grupo DMSO y SM+AM en barra azul. Media  $\pm$  ES, ANOVA de un factor,  $*p<0.05$ .

Adicionalmente, se midió con Western blot la expresión de CB1 en el hipotálamo. Nuevamente se muestran las bandas que corresponden a la proteína CB1. Se encontró que los grupos control y SM presentan el porcentaje de inmunoreactividad más alto. Se muestra también, que el grupo SM+AM es el que tiene menor expresión de CB1 (Fig 13). De acuerdo con el ANOVA de un factor, estos resultados fueron significativos  $F_{(4,14)}=19.423$   $p<0.001$ . El *post hoc* Tukey indicó que los grupos control y SM difirieron significativamente con todos los grupos ( $p<0.05$ ). De igual forma, el grupo WIN es más alto que el grupo SM+AM significativamente.

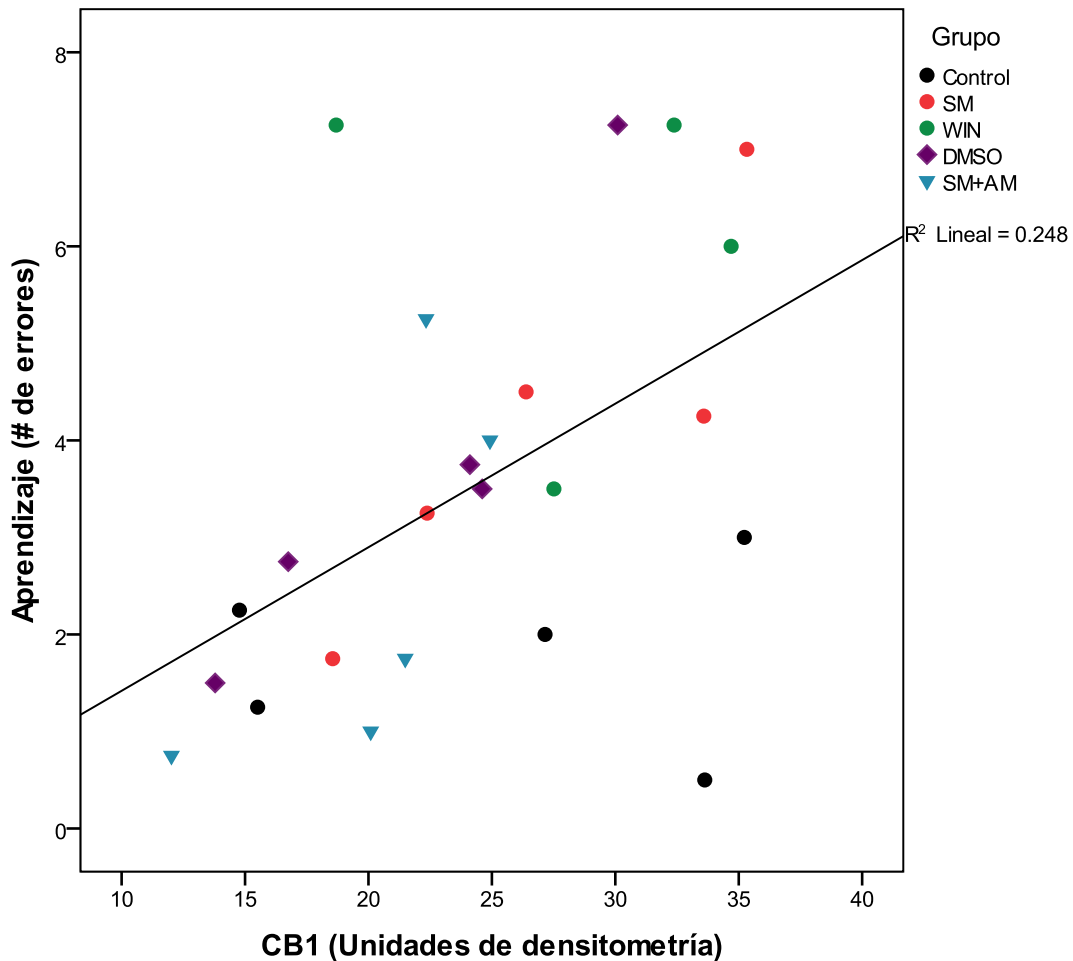


**Fig 13. Western Blot para CB1 en hipotálamo. (a) Intensidad neta del receptor CB1 en hipotálamo.** Fotografía de Western Blot del CB1 en el hipotálamo de rata en grupos con diferentes tratamientos. **(b) Densitometría del Western bolt.** Gráfica de la densitometría obtenida.  $n=2$  para grupo control y grupo SM y  $n=5$  para el resto de los grupos. En morado ratas control, SM en rosa, WIN barra verde, DMSO en naranja y SM+AM en Azul. Media  $\pm$  ES, ANOVA de un factor, *post hoc* Tukey HDS,  $*p<0.05$ .

### ***Correlación entre resultados conductuales y resultados moleculares***

Finalmente, para determinar si existía una relación entre las modificaciones de los receptores CB1 y los cambios en la MVE, se realizó una correlación de *Pearson* entre la densidad de CB1 en el hipocampo y el aprendizaje (medido a través del número de errores del D4).

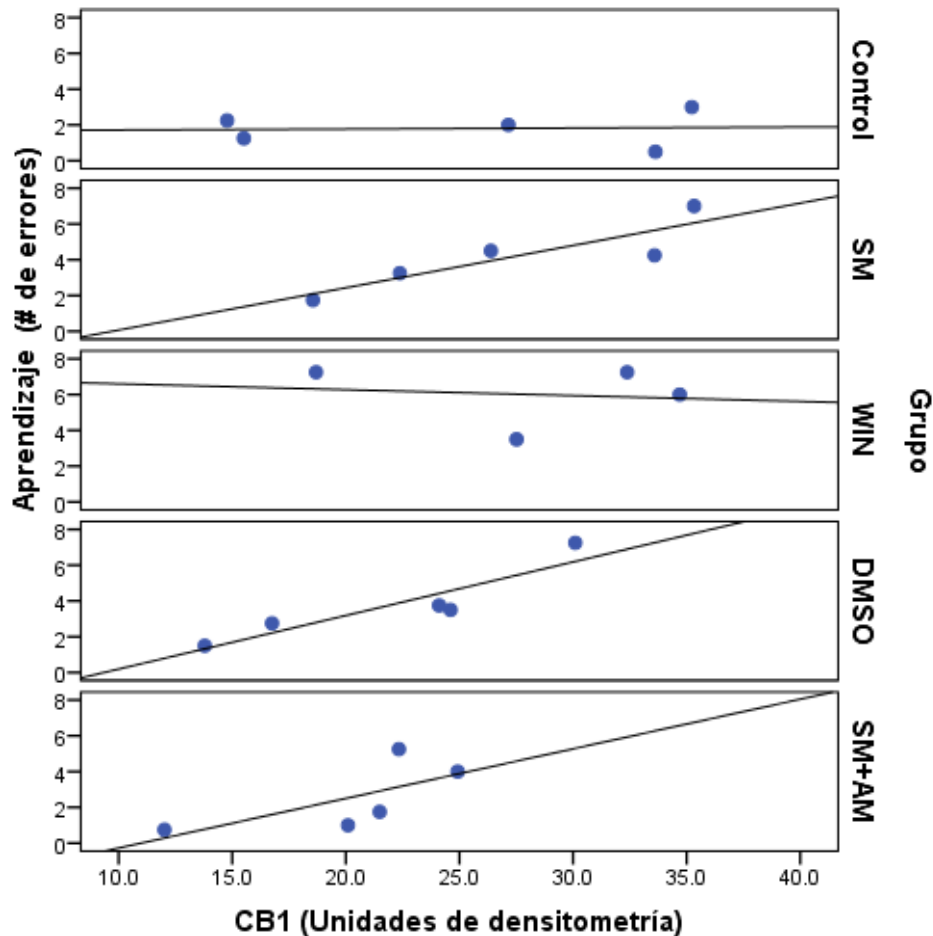
El coeficiente de correlación de *Pearson* fue de 0.551 ( $p= 0.006$ ). El coeficiente de determinación fue  $R^2=0.248$ , que indica que hay una correlación baja, aproximadamente de 24.8%, tomando en cuenta los tratamientos de todos los grupos (Fig 14).



**Fig 14. Correlación entre la densidad de receptores CB1 y el aprendizaje para todos los grupos.** Diagrama de dispersión de la correlación entre la densidad de receptores CB1 en el hipocampo y el aprendizaje ( $r=0.551$ ,  $p=0.006$ ),  $R^2$  Lineal = 0.248.

Esta dispersión es congruente con la heterogeneidad en la densidad de receptores CB1 de los grupos considerados. Con el propósito de estudiar la correlación con cada uno de los grupos, a continuación se muestra un diagrama de dispersión en función del grupo en relación con el resto de los grupos, para el cual  $R^2$  difiere entre cada uno. De acuerdo con

el coeficiente de determinación, se muestra que estos son para el grupo control  $R^2=0.003$ , para el grupo SM  $R^2=0.776$ , para el grupo WIN  $R^2= 0.017$ , para el grupo DMSO  $R^2=0.838$  y para el grupo SM+AM  $R^2= 0.468$  (Fig 15).



**Fig 15. Correlación entre la densidad de CB1 y aprendizaje de cada grupo.** Diagrama de dispersión por grupos, de la correlación entre la densidad de receptores CB1 en el hipocampo y el aprendizaje. Control  $R^2=0.003$ , grupo SM  $R^2=0.776$ , grupo WIN  $R^2= 0.017$ , grupo DMSO  $R^2=0.838$  y grupo SM+AM  $R^2= 0.468$ .

## VI. DISCUSIÓN

El objetivo de administrar una dieta alta en sacarosa fue el de reproducir en un modelo animal el exceso de carbohidratos de la dieta a la cual estamos expuestos actualmente. El incremento del consumo de refrescos y otras bebidas con alto contenido calórico, como jugos o tés no naturales, sin incluir los alimentos ricos en grasa, predisponen a la población a padecer SM, DM2 o ECV. Debido a esto la obesidad sigue incrementando y los problemas que ésta conlleva también han aumentado.

Uno de los primeros parámetros que se ven modificados cuando los sujetos desarrollan SM es el peso corporal (Grundy, 2004). Sin embargo, existe evidencia de que una dieta alta en sacarosa en algunos casos no produce obesidad o diferencias en el peso (Avena, 2008; Kanazawa, 2003). Las diferencias en el consumo de la dieta no siempre coinciden con un incremento de peso. En este trabajo se encontró que los cambios en el peso total se observaron después de cinco semanas de consumir la dieta. Esto se relaciona directamente con su consumo de agua.

En los resultados se muestra que las ratas a las que se les dio el agua azucarada tuvieron una preferencia por consumirla, incluso disminuyeron el consumo del alimento. Debido a que las ratas tienen un sistema de homeostasis muy difícil de romper, tienen la capacidad para hacer una regulación adecuada entre la ingesta calórica y el gasto energético llamado punto de ajuste. Por esta razón, disminuyen el consumo de comida, esto compensa las calorías adicionales obtenidas a partir del azúcar (Avena et al., 2010; Avena et al., 2008). Sin embargo, como la dieta se administró por un largo periodo esa regulación finalmente se vio alterada, lo que ocasionó que la dieta de sacarosa, aun con el decremento en la ingestión de comida, conceda a las ratas un mayor consumo calórico.



Esto provocó el incremento de peso que determina la etiopatogenia de las otras alteraciones metabólicas que conducen al SM.

En los resultados se mostró que las ratas del grupo con SM, tuvieron un mayor consumo de agua las primeras semanas de dieta, aun cuando en ambos grupos tenían el mismo peso. Posteriormente, el consumo lo hicieron con respecto a su peso, por lo cual, el consumo de agua al día en el grupo SM siempre fue mayor que el del grupo control; estos datos sugieren que las diferencias que se observaron en el consumo de agua son dependientes del tamaño de la rata, cuando estas llevan seis semanas de tratamiento.

Esta reportado que las ratas pueden desarrollar signos conductuales de adicción tras tener una dieta alta en sacarosa, uno de estos signos es el incremento de ingesta diaria de azúcar (Avena et al., 2010). En la quinta semana de tratamiento fue evidente que los sujetos presentaron un aumento en el consumo de agua con azúcar donde tomaron aprox. 60 ml más de agua al día que el grupo control. Esto podría tomarse como un signo para decir que las ratas se volvieron adictas a la sacarosa; sin embargo, se puede deber a otros factores como dependencia hepática a la sacarosa o bien, retomando el índice de consumo de agua, que lo hacen debido a que son más grandes y requieren de mayores cantidades de agua. Para determinar que se debe a una adicción serían necesarias otras características, así como otras pruebas conductuales por ejemplo, la prueba preferencia de lugar o el *craving*.

Aun con la regulación homeostática de estas ratas, la composición corporal se vio afectada finalmente, tras consumir la dieta hipercalórica. Este resultado concuerda con otros estudios donde encontraron que la cantidad de grasa total en el cuerpo de los sujetos que recibieron una dieta alta en sacarosa es mayor que la del grupo control, a

estos se les ha llamado “sujetos con obesidad abdominal y peso normal” (Cao, 2012; Rutter, 1998).

También, se observó un incremento en los niveles de triglicéridos ocasionado por la dieta alta en sacarosa. Esto se ha descrito en diversos trabajos, en humanos y con roedores, donde observan que la dieta hipercalórica (especialmente alta en sacarosa) induce hipertrigliceridemia (Carvalho, 2012; Soares et al., 2013). Se piensa que la dieta provoca un defecto en la acción de la lipoproteinlipasa pero el mecanismo por el que esta dieta aumenta los triglicéridos aún no ha sido descrito (Kanazawa, 2003).

Así mismo, los sujetos con SM tienen disminuida la capacidad de metabolizar la glucosa, esto se ve reflejado en un nivel de glucemia más alto y un aclaramiento de la curva de tolerancia a la glucosa más lento; por esta razón a los sujetos con SM les lleva más tiempo llegar a los niveles basales después de la carga de glucosa (Larqué, 2011; Grundy, 2004). La alteración en la curva de glucosa del grupo con SM concuerda con otros datos reportados donde indican que ésta dieta induce intolerancia a la glucosa, sin que necesariamente se llegue a los niveles de DM2 (Larqué, 2011; Soares et al., 2013).

La hiperinsulinemia está descrita en numerosos estudios con roedores, ésta se refiere a niveles de insulina en la sangre más elevados de lo normal y se debe a un problema subyacente que causa que las células beta del páncreas produzcan mucha insulina, además está establecido que dietas altas en sacarosa promueven el desarrollo de RI (Ribeiro et al., 2005; Soares et al., 2013; Sumiyoshi et al., 2011). El grupo que recibió la dieta alta en sacarosa presentó un aumento en los niveles de insulina, lo que representó un resultado importante para este estudio, porque el SM se ha caracterizado fundamentalmente con la RI y la hiperinsulinemia.

La hipertensión como efecto del consumo de azúcar en estudios con roedores ha sido poco reportada. En la mayoría de las investigaciones la presión arterial de las ratas se eleva con dietas altas en grasa o bien con incremento de sal en la dieta (Kang et al., 2004; Sharma et al., 2008). Por otro lado, los trabajos que fueron revisaron reportan únicamente incremento de la presión sistólica por dieta alta en sacarosa (Larqué, 2011; Sharma et al., 2008); la presión diastólica no ha sido registrada en otros trabajos. Probablemente porque el *software* que se utilizó en otros estudios no arrojó dicha medición. La presión diastólica es determinante de hipertensión en el humano, indica el grado de resistencia periférica, por lo tanto, que los sujetos SM presenten un incremento en ésta, sugiere que su corazón requiere de mayor esfuerzo en cada latido.

En resumen, el grupo con dieta alta en sacarosa dio positivo a todos los parámetros metabólicos necesarios para diagnosticar SM, por lo tanto la dieta de sacarosa al 20% condujo al desarrollo de SM. Para futuras investigaciones se sugiere medir la ingesta de agua y alimento a los grupos a los que se les administró WIN y AM-251, ya que en este trabajo no fueron evaluados.

Los cannabinoides naturales como el THC, en humanos y en ratas, aumentan el apetito y el consumo de alimentos, principalmente de los dulces (De Luca et al., 2012). Por otro lado los antagonistas como el Rimonabant y el AM-251, reducen la ingesta de alimentos o soluciones dulces (De Luca et al., 2012; Cruz et al., 2010). Esos hallazgos mantenido la hipótesis de que el SeC participa en la regulación del apetito y la ingestión de comida, además este sistema está implicado en procesos de recompensa, en el valor positivo o hedónico de los alimentos (Méndez-Díaz et al., 2010; De Luca et al., 2012).

Del mismo modo, se ha mostrado que el THC incrementa la actividad dopaminérgica en circuitos de recompensa en la vía mesolímbica que proyecta al área *tegmental* ventral y al núcleo *acumbens* (De Luca et al., 2012). También, la ingestión de alimentos que son apetitosos también estimulan la transmisión de dopamina en el núcleo *acumbens* y en la corteza prefrontal (De Luca et al., 2012; Earls-Albertsson, 2005). Esto se puede interpretar como un refuerzo positivo que debilita la respuesta de las señales de saciedad y activa el circuito de recompensa. Esto sugiere que por ello las ratas consumían cada vez más sacarosa (sumado a la expresión de receptores en el hipotálamo que se describe más adelante).

Es relevante mencionar que hay receptores CB1 presentes en células neuronales del hipotálamo que tienen hormonas reguladoras de la digestión como: la leptina, el péptido de tiroxina PYY, orexinas A y B y colecistoquina CCK (Fride, 2007; Di Marzo, 2001). Está descrito que los cannabinoides excitan y, con ello, mejoran la actividad de neuronas de la hormona concentradora de melanina e inhiben a las de orexinas en el hipotálamo (Huang et al., 2007), lo que orienta a algunas de las acciones orexigénicas reportadas de los cannabinoides. Otra relación que está descrita sobre la modulación de la alimentación mediante cannabinoides, es con la inhibición de la proopiomelanocortina que éstos causan en el núcleo arqueado (Huang et al., 2007).

Es importante mencionar que está reportado que los receptores de orexinas pertenecen al grupo de GPCR. Estos interactúan con otros receptores de este tipo, como son los CB1, ambos forman complejos heteroméricos y oligoméricos. La interacción entre los dos receptores provoca liberación de 2-AG que forma una señal importante de la regulación de la transmisión sináptica mediada por orexinas. Por esta razón, proponen como

tratamiento para la obesidad, una aplicación de orexina A combinada con agonistas a CB1 o la aplicación de antagonistas al receptor de orexina 1 combinada con antagonistas CB1 (Xu et al., 2013).

Sin duda, la relación que existe entre la señalización de los receptores a orexinas y los receptores CB1 provee información relevante para futuros trabajos relacionados con problemas de balance energético como la obesidad y el SM.

La amplia distribución tanto de ligandos como de receptores a cannabinoides ha relacionado al SeC con diversos sistemas fisiológicos. Los estudios que se han realizado con antagonistas como el Rimonabant y el AM-251 aportan información relevante acerca de su participación en la regulación de diferentes mecanismos metabólicos (Merroun et al., 2012; Chen, 2013). En este trabajo se propone que el desarrollo del SM ocurrió como consecuencia de la dieta alta en sacarosa y por acción de los mecanismos antes mencionados. De esta forma, la desregulación del SeC podría estar también involucrada en las alteraciones metabólicas que provocan SM.

El SM daña la salud de diferentes maneras y ahora forma parte de uno de los factores que predisponen a padecer déficit de memoria y que pueden llevar a desarrollar Alzheimer. Por esta razón, resultó de gran importancia investigar los mecanismos que están implicados, con el objetivo de encontrar estrategias para el tratamiento de la obesidad, el SM y los daños en la memoria que estos puedan traer.

Distintos grupos de investigación reportan que dietas hipercalóricas, ya sean altas en grasa o altas en sacarosa, inducen déficit cognitivo que causa alteraciones en la ejecución de tareas que involucran aprendizaje y MVE (Farr, 2008; Molteni, 2002; Pistell, 2010; Ross, 2009; Soares et al., 2013; Kosari, 2012). En este trabajo se encontró que los

sujetos con SM, mostraron cambios mínimos en la ejecución del laberinto de Barnes que aunque no son significativos, permiten proponer que los sujetos que desarrollan este síndrome pueden mostrar alteraciones cognitivas reflejadas en la ejecución de tareas que evalúan MVE. El tiempo de tratamiento al que estuvieron expuestos estos sujetos (12 semanas) puede ser una causa por la que las diferencias que se muestran no son significativas; ya que está reportado que el SM se desarrolla después de 8 semanas con esta dieta (Larqué et al., 2011). En este caso los sujetos tenían alrededor de 4 semanas con SM instalado.

Las investigaciones que estudian las alteraciones en la MVE proponen que los daños que ocasionan la obesidad y el SM sobre los procesos cognitivos están relacionados con la neuroinflamación, el aumento de citocinas (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF-  $\alpha$  y CRP) y la disminución de BDNF en hipocampo (Dinel, 2011; Van der Kommer et al., 2012; Molteni, 2002; Yaffe, 2004; Pistell, 2010); sin embargo, este estudio se enfocó en investigar en el SeC, otro sistema que está estrechamente relacionado con ambos procesos.

Esta descrito que los sujetos que padecen obesidad presentan una desregulación del SeC ya que este se encuentra hiperactivo (Bellocchio, 2006; Bermúdez et al., 2009), así mismo, sujetos expuestos a dietas hipercalórica tienden a padecer déficit cognitivo y presentan un mayor número de errores en tareas donde se evalúa MVE (Farr, 2008; Valladolid-Acebes et al., 2010). La administración de agonistas a cannabinoides deterioran la memoria (Abush, 2010, Robinson, 2008), incrementando la incidencia de errores en estas tareas (Wegener, 2008). Por esta razón se utilizó un agonista de los receptores CB1 (WIN) para sobreactivar al sistema y observar los cambios que producía en la memoria.

Se observó que la hiperactivación del SeC, con la administración de un agonista en el hipocampo, provocó un incremento en el número de errores durante de ejecución del laberinto similar al de ratas con SM. Lo que sugiere que los sujetos con SM puede estar alterado el SeC de manera similar a cuando se sobreactiva por un agonista sintético, representando un deterioro en la adquisición de la tarea. Esto último está relacionado con alteraciones en tareas de aprendizaje visuoespacial (Lichtman, 1995; Robinson, 2010).

El resultado que se mostró en este trabajo no había sido descrito antes. A pesar de que existe una amplia literatura que reporta los efectos de los cannabinoides sobre el aprendizaje y la memoria (Lichtman, 1999; Abush, 2010; Robinson, 2008; De Oliveira, 2008; Davies, 2002; Rueda-Orozco, 2008), y la relación que tienen también en alteraciones metabólicas (Chen, 2013; Nunn, 2010; Di Marzo, 2001; Bermúdez et al., 2009; Pagotto, 2006; Méndez-Díaz et al., 2010; Fride, 2007; Engeli, 2008) ninguno de estos trabajos relaciona al SeC con el déficit cognitivo que se ve en el SM.

También, se reportó que la inhibición del SeC con el antagonista AM-251 en ratas que ya tenían SM ayudó a mejorar la ejecución del laberinto de Barnes, revirtiendo el deterioro en la memoria que se vio en las ratas con SM. Por lo tanto confirma que el SM altera al SeC y a su vez ambos interfieren con la MVE.

En otros trabajos se ha visto que el AM-251 facilita la memoria en tareas de reconocimiento de objetos en sujetos controles (Bialuk, 2011; Clarke et al., 2011). Asimismo, reportan que este antagonista se ha usado en tareas conductuales para inhibir el efecto de los agonistas a cannabinoides (Bialuk, 2011; Rueda-Orozco, 2008) y también para bloquear algunos problemas con la ingesta ocasionados por cannabinoides; además, puede revertir diversas alteraciones metabólicas producidas por la administración de

dietas hipercalóricas (Cruz et al., 2010; Méndez-Díaz, 2010). Una de las primeras observaciones que están descritas es la disminución de ingesta y de la motivación positiva que se tiene por el alimento después de la administración de AM-251 (Cruz et al., 2010; Díaz-Méndez et al., 2010). Este trabajo por primera vez describe el efecto de este antagonista relacionando ambos procesos (memoria e ingestión).

Tomando en cuenta lo anterior, un punto importante a discutir, es si la activación del SeC mimetiza u ocluye las alteraciones cognitivas que se producen en el cuadro clínico del SM. En la curva de aprendizaje lo que se observó es que la activación sintética con el agonista WIN (en un grupo con dieta control) produjo un resultado similar al del grupo que tenía SM, con base en ese resultado se puede interpretar que la activación del SeC mimetiza la exacerbación fisiológica que produce el SM; sin embargo, una prueba que se propone para futuros trabajos es la activación del SeC con un agonista sintético en sujetos con SM, ya que no se sabe si el efecto del agonista en este caso puede ocluir la activación producida por el SM.

Recientemente han descrito que la prevalencia de la obesidad es, paradójicamente, menor en los consumidores de marihuana comparado con quienes no la consumen (Le Foll et al., 2013). Le Foll y colaboradores proponen que el THC puede actuar como un antagonista funcional en situaciones donde existen niveles altos de endocannabinoides, tal como es el caso de la obesidad. De manera que surge una nueva hipótesis, donde es probable que el uso de un agonista del SeC, entonces, ocluya la hiperactividad que se presenta cuando se tiene SM.

Por otro lado, está reportado que el uso crónico de THC produce hiperfagia pero no provoca un incremento de ni de peso ni de grasa (Le Foll et al., 2013). Además, el uso



repetido de este provocaría regulación a la baja o desensibilización de los receptores ocasionando un efecto paralelo al que se observa con un antagonista. Con lo anterior, la pregunta que surge es ¿qué efecto tendría sobre la memoria el uso continuo de THC?

Retomando los resultados, los trabajos que relacionan la obesidad con el SeC describen que este está hiperactivado, tal como ocurre cuando se consume marihuana. Entonces, esto sugiere, siguiendo el mecanismo de los cannabinoides, que su activación inhibe la AC y disminuye el AMPc. Esto inhibe la fosforilación de PKA en el hipocampo y se ve reflejado como una interferencia de la LTP que a su vez se muestra como un deterioro en la MVE (Fig 16). Así pues, el uso crónico de un agonista a cannabinoides probablemente actuaría en contra del SM pero provocaría déficit en la memoria, como el que se observó en el desempeño de las ratas a las que se les administró WIN.

Como se describió en los antecedentes, existen resultados discordantes respecto a si los cannabinoides afectan o mejoran el aprendizaje y la MVE. En su mayoría se concluye que dosis altas y el uso crónico de cannabinoides dañan la memoria (Abush, 2010; Ameri, 1999). Así se puede explicar el resultado que mostramos con el grupo que recibió el WIN.

El SeC se ha propuesto como un sistema modulador, puesto que no sería natural ni adaptativo que tuviéramos un sistema que ocasione déficit. Existe la probabilidad de que el SeC module de alguna forma la hiperactivación en el hipocampo, de manera que al desarrollar SM logre mantener la memoria sin un daño grave en etapas tempranas. Es decir, que los cannabinoides puedan actuar como neuroprotectores en un principio y en un estado fisiopatológico, intentando mantener la homeostasis del sistema; sin embargo, a largo plazo el sistema ya no es capaz de mantener el equilibrio y termine por causar el déficit tal como se ve en el grupo con WIN.

Con el efecto del AM-251 que se observó en la memoria de las ratas que tenían SM, se probó que existe una relación entre el déficit cognitivo ocasionado por el síndrome y alteraciones en el SeC. Para confirmar estos resultados, además de estudiarse en un nivel conductual, con el laberinto de Barnes, se extrapoló al nivel molecular y se midió el RNAm y la expresión del CB1 en el hipocampo.

Se encontró que el RNAm del CB1 en el hipocampo no muestra cambios significativos; sin embargo, se observó un incremento en el de las ratas con SM, esto mismo ocurrió con las ratas del grupo WIN. Por otro lado las ratas con SM a las que se les suministró el antagonista tenían una disminución del RNAm. Estos datos sugieren que el SM puede estar ocasionando un cambio en el SeC, aumentando el RNAm de los CB1, de la misma forma que lo hace un aumento en la cantidad de canabinoides con el agonista WIN. En un estudio previo se había reportado que una dieta alta en grasa incrementa ligera pero significativamente el RNAm de receptores CB1 en CA1 y CA3 (Massa et al., 2010), las diferencias entre las dietas utilizadas, en ese trabajo y esta tesis, para producir obesidad puede ser una razón por la cual en este estudio no se observaron diferencias significativas.

Con respecto a la expresión de la proteína, se mostró que hay una sincronización de la codificación de RNAm a proteína en hipocampo ya que, los receptores CB1 también aumentaron en los grupos con SM y con WIN y disminuyeron en el grupo que tenía SM+AM tal como ocurrió con el RNAm. Dichos resultados contrastan con un estudio que reveló que una dieta que induce obesidad, se asoció con una menor densidad de receptores CB1 en varias regiones extrahipotalámicas, por ejemplo el hipocampo y la capa VII de la corteza. Los autores sugerían que la regulación a la baja de los receptores

CB1 se debía a un incremento en las cantidades de endocannabinoides los cuales no midieron (Harrold, 2002); sin embargo, en ese trabajo existen varias diferencias con el realizado por nuestro grupo de investigación en cuanto a la dieta, el tiempo que se administró y las técnicas que se utilizaron para medir el RNAm y la proteína.

Por otro lado, un estudio con el que los resultados que se obtuvieron concuerdan, es el de Massa y colaboradores (2010). En este reportaron que la dieta que induce obesidad efectivamente incrementa las cantidades de 2-AG y anandamida en el hipocampo, sin embargo, ellos encontraron que hay una regulación en ascenso tanto en el RNAm como en la expresión de receptores CB1 utilizando las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

Tomando en cuenta los datos que se obtuvieron, la literatura ha reportado que como consecuencia del aumento o la disminución en la cantidad de ligando o moléculas, los receptores de membrana pueden originar una respuesta celular. Si la activación es frecuente y continua es posible que se produzca la desensibilización conocida como *down regulation* (regulación en descenso o hacia la baja), en cambio ante la utilización continua o frecuente de antagonistas o en la ausencia de agonistas ocurre lo contrario, el fenómeno de súper sensibilidad llamado *up regulation* (regulación hacia arriba o hacia la alta) (Malgor-Valsecia, 2000). Siguiendo este mecanismo se esperaba encontrar una disminución en los CB1 del hipocampo; sin embargo, aunque ya se encuentra reportado que la obesidad y el SM se relaciona con la presencia de abundante cantidad de cannabinoides, en este estudio no se realizó una medición de estos, por lo tanto, no se puede confirmar si en realidad existía una mayor cantidad cannabinoides en los sujetos

tratados con la dieta o si la cantidad que presentaban era suficiente para provocar *down regulation*.

Además, es posible que la regulación que se observó en la proteína CB1 este dada por el tiempo que recibieron el tratamiento los sujetos, es decir, que era necesario que consumieran la dieta durante un tiempo más prolongado para ocasionar los cambios de desensibilización del receptor. Con esto mismo puede estar relacionado que el cambio conductual que se mostró no sea significativamente diferente con respecto del control, y estas diferencias se manifiesten hasta que el receptor CB1 presente *down regulation*. Tampoco se descarta que exista una disminución de la actividad del receptor que causa un defecto en la captación de ligando, que haya ocurrido internalización del receptor o bien, se encuentre involucrada alguna alteración en la enzima FAAH que provoque que haya un aumento en la degradación del endocanabinoide.

Por otro lado, en este estudio se siguió un protocolo de laberinto de Barnes que abarcaba un periodo de reversión en el cual no se realizó suministro de ningún fármaco, ya que, se administró únicamente durante el periodo de aprendizaje, por lo que se sugiere para estudios futuros y con el objetivo de evitar factores como la degradación del fármaco, que la extracción de la estructura se realice posterior al último día de aprendizaje, el cual coincide con la última inyección de los fármacos. Puesto que, en este trabajo la extracción se realizó hasta que los sujetos terminaron el protocolo completo del laberinto de Barnes, aproximadamente 10 días después de la última administración del fármaco y puede considerarse un factor por el cual los datos no resultan significativos.

Adicionalmente a los resultados ya descritos, se midió con Western blot la cantidad de receptores CB1 en el hipotálamo. Se mostró que en esta estructura la expresión de los

receptores difiere entre los grupos SM y WIN. En el grupo que desarrolló SM hubo una alta expresión de CB1 en el hipotálamo, mientras que en el grupo WIN se vio disminuida. Se ha descrito que en el NPH la expresión de los CB1 tienen un papel inhibitorio de la saciedad (Cruz et al., 2010). Esto sugiere que la alta expresión de CB1 en hipotálamo que se mostró, aunada a otros factores, está relacionada con que los sujetos aumentaran el consumo de la dieta hipercalórica. Aquí también se observó que el efecto del agonista aumenta la expresión del CB1 y la administración del antagonista la disminuye. Cabe señalar que el número de sujetos que se presentaron para este dato es reducido y puede no ser representativo para hacer las comparaciones necesarias.

Aunque este trabajo se interesó en estudiar los cambios que ocurren en los CB1 en el hipocampo por la relación que tiene con el aprendizaje y la memoria, se tomó en cuenta que el hipotálamo es una estructura relacionada a la conducta de ingesta, por esta razón también se midió la cantidad de proteína en este lugar. Los resultados que se obtuvieron permiten interpretar, y sugerir, por un lado que no es igual la respuesta y la expresión fisiológica que la respuesta en un modelo con una manipulación experimental. Por otro lado, que el WIN fue suministrado en el hipocampo y no se puede precisar qué cantidad se difundió por todo el cerebro y cuanto llegó específicamente al hipotálamo. Con este resultado se puede inferir que la regulación del SeC difiere entre estructuras de SNC así como sucede en órganos periféricos.

Finalmente, se considera importante en este trabajo, que la explicación de los resultados se abordó desde distintos niveles. Por un lado se realizó una evaluación conductual con el laberinto de Barnes y por otro lado los resultados de la tarea conductual se correlacionaron a nivel molecular con las técnicas de PCR-TR y el Western blot. Este

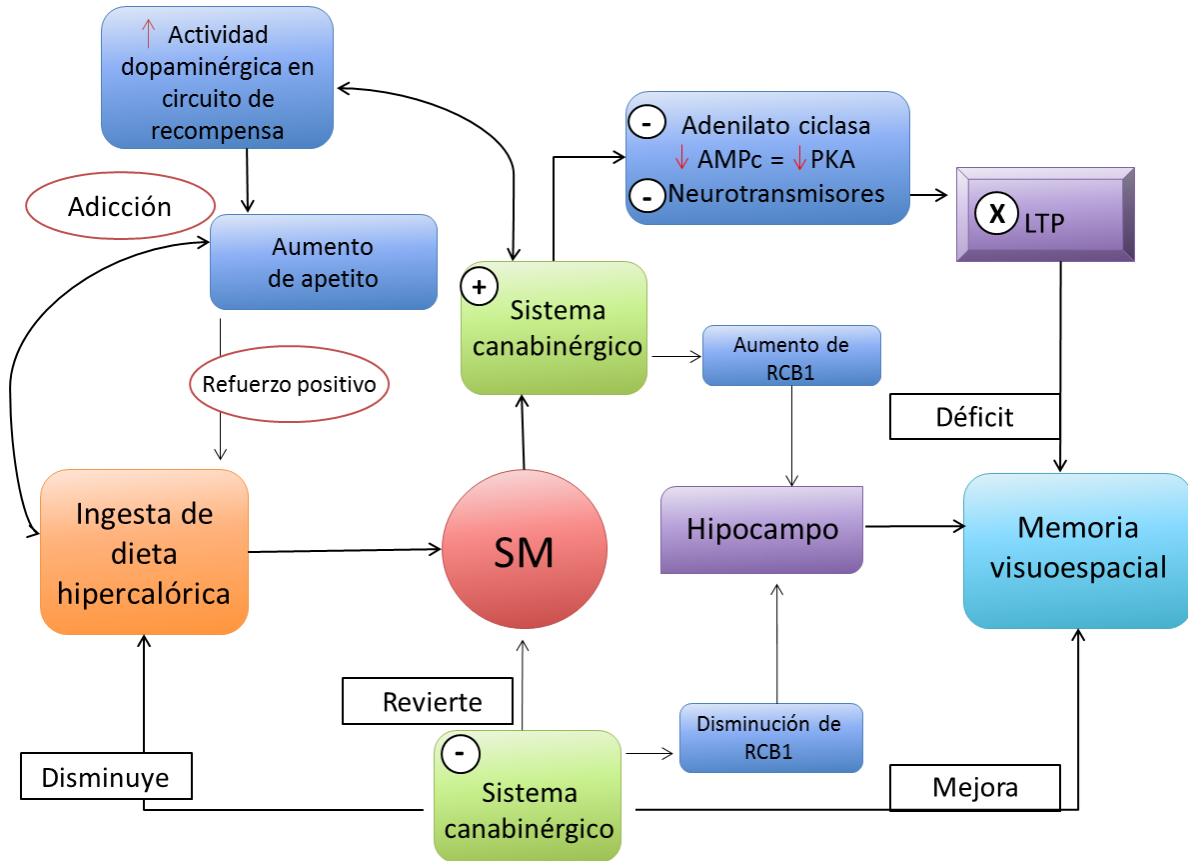
estudio describe por primera vez las modificaciones de CB1 en hipocampo ocasionadas por el SM y se relacionan con una tarea conductual para evaluar aprendizaje y MVE.

Los resultados de la correlación entre los cambios en la MVE y la densidad de receptores CB1, muestran que no hay una correlación entre ambas variables y esto puede deberse a la variabilidad de resultados que se obtuvieron en la cantidad de receptores. Se toma en cuenta el tiempo que transcurrió desde la última aplicación del fármaco, hasta la extracción de la estructura. Se sugiere, como perspectivas incrementar la n y usar un protocolo de memoria más corto, o que la aplicación del fármaco sea muy cercana a la extracción de la estructura.

Evidencia creciente muestra que el SeC desempeña un papel importante en varias funciones cognitivas (Pattij, 2008). Por lo tanto, la relevancia de este estudio se encuentra en su participación con relación a los procesos de memoria incluyendo la codificación, la consolidación y la extinción. El SeC interviene en las funciones ejecutivas las cuales comprenden procesos cognitivos como la atención, flexibilidad conductual, toma de decisiones, control inhibitorio, planificación, estimación de tiempo y memoria de trabajo (Pattij, 2008). En este sentido, abordar el papel que juega este sistema dentro de patologías invita a continuar investigando en los mecanismos neurobiológicos que median los posibles efectos que ocasiona el uso de agonistas y antagonistas a cannabinoides.

Sería interesante que futuras investigaciones se enfocaran no solo en la inhibición o activación del receptor sino que se centraran en las enzimas como la FAAH y MAGL, donde se ha puesto menor atención y también podrían encontrarse respuestas relacionadas a los problemas del SM. Aun cuando en la actualidad se ha ampliado enormemente el conocimiento acerca de las funciones del SeC, continúa siendo un

sistema en donde falta seguir investigando sobre los beneficios, más que sobre los daños, que implica tener en nuestro cuerpo este sistema.



**Fig 16. Modelo explicativo.** La ingestión de una dieta hipercalórica induce SM, este provoca la activación del SeC. Cuando el SeC está activado incrementa la actividad dopaminérgica en el circuito de recompensa aumentando el apetito lo que lleva a consumir más la dieta hipercalórica. A su vez, el SM cuando activa el SeC inhibe la AC que disminuye el AMPc y la fosforilación de PKA, también inhibe neurotransmisores lo que ocasiona interferencia en la LTP y un déficit en la MVE. La inhibición del SeC revierte el SM, disminuye el consumo de dieta hipercalórica y mejora la MVE.

## VII. CONCLUSIONES

- El modelo de dieta hipercalórica con agua al 20% (p/v) sacarosa condiciona el desarrollo del SM.
- El SM tiene una relación con deterioro en la MVE, evaluados con el laberinto de Barnes, a las 12 semanas de tratamiento.
- El SM está relacionado con una tendencia en el incremento en RNAm y la expresión de los receptores CB1 en hipocampo e hipotálamo.
- Las alteraciones en la MVE tienen una correlación baja positiva, dependen 25% de las modificaciones que ocurren en la densidad de los receptores CB1 en el hipocampo.
- Los resultados indican que el SeC se ve alterado cuando se desarrolla SM, sin embargo, del mismo modo que en otros trabajos, en esta tesis se propone que SeC funciona como un regulador o modulador de la memoria, aun en presencia de cambios fisiopatológicos.
- La inhibición con el antagonista AM-251 y la modulación del SeC pueden representar una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento del SM y de daños en la memoria. Asimismo, un avance en la comprensión de la etiología y patogenia que subyace a los trastornos del sobrepeso y la obesidad.



## VIII. REFERENCIAS

- Abush, H. y Akirav, I. (2010). Cannabinoids Modulate Hippocampal Memory and Plasticity. *Hippocampus* 20:1126–1138.
- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology* 58:315-348.
- Atkinson, R., Shiffrin, R. (1971). The control processes of short-term memory. *Psychology series*, 173: 1-23.
- Avena, N. (2010). The study of food addiction using animal models of binge eating. *Appetite*, 55:734–737.
- Avena, N., Bocarsly, M., Rada., P., Kim, A., Hoebel, B. (2008). After daily bingeing on a sucrose solution, food deprivation induces anxiety and accumbens dopamine/acetylcholine imbalance. *Physiology & Behavior* 94: 309–315.
- Baddeley, A. (2003). Working memory: looking back and looking forward. *Nature reviews. Neuroscience*,4: 829-839.
- Bailey, C., Giustetto, M., Huang, Y., Hawkins, R., and Kandel, E. (2000). Is heterosynaptic modulation essential for estabilizing hebbian plasticity and memory? *Nature Reviews. Neuroscience*, 1:11-20.
- Barnes, C. (1979). Memory deficits associated with sescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Comp. Physiol. Psycho/.* 93, pag.
- Barnes, C.A. (1988). Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat. *TINS* 11:163-169.
- Bear, M., Connors, B. y Paradiso, M. (2001). *Neuroscience: Exploring the brain*. Williams and Wilkins Baltimore, EU.
- Bellocchio, L., Mancini, G., Vicennati, V., Pasquali, R. and Pagotto, U. (2006). Cannabinoid receptors as therapeutic targets for obesity and metabolic diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, 6:586–591.

- Bermúdez, F. y Prado, R. (2001). Memoria: dónde reside y cómo se forma. México. Trillas.
- Bermúdez, F., McPartland, J., Rodríguez, F., Paz, M. (2009). El sistema endocannabinoide, homeostasis energética y obesidad: ¿el final o un nuevo comienzo? *Revista Española de Obesidad*, 7:342-359.
- Bialuk, I. y Winnicka, M. (2010). AM251, cannabinoids receptors ligand, improves recognition memory in rats. *Pharmacological Reports*, 63:670-679.
- Bisogno, T., Ligresti, A., Di Marzo, V. (2005). The endocannabinoid signalling system: Biochemical aspects. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 81:224 – 238.
- Brattelid, T. y Levy, F. (2011). Quantification of GPCR mRNA Using Real-Time RT-PCR. *Receptor Signal Transduction Protocols: Third edition. Methods in molecular biology* 746:165-193.
- Burns, D., Laere, K., Sanabria-Bohórquez, S., et al., (2007). [<sup>18</sup>F]MK-9470, a positron emission tomography (PET) tracer for in vivo human PET brain imaging of the cannabinoid-1 receptor. *PNAS*, 104:9800-9805.
- Cao, L., Liu, X., Cao, H., Lv, Q. and Tong, N. (2012). Modified High-Sucrose Diet-Induced Abdominally Obese and Normal-Weight Rats Developed High Plasma Free Fatty Acid and Insulin Resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-9.
- Carrillo E, R. Sanchez, M. Elizondo, S. (2006). Síndrome metabólico. *Revista de la Facultad de Medicina*. (49):003.
- Carvalho, C., Cardoso, S., Correia, S., Santos, R., Santos, M., et al., (2012). Metabolic Alterations Induced by Sucrose Intake and Alzheimer's Disease Promote Similar Brain Mitochondrial Abnormalities. *Diabetes*, 61:1234–1242.
- Castro-Sierra, E., Chico Ponce de León, F., Gordillo, L., Portugal, A. (2007). neurotransmisores del sistema límbico. Hipocampo, GABA y memoria. Primera parte. *Salud Mental*, 30:7-15.

- Castro-Sierra, E., Chico Ponce de León, F., Gordillo, L., Portugal, A. (2007). neurotransmisores del sistema límbico. Hipocampo, GABA y memoria. Segunda parte. *Salud Mental*, 30:47-57.
- Chambers, A., Sharkey, K., Koopmans, H. (2004). Cannabinoid (CB1) receptor antagonist, AM 251, causes a sustained reduction of daily food intake in the rat. *Physiology & Behavior*, 82:863–869.
- Chen, G., Pang, Z., (2013). Endocannabinoids and Obesity. *Vitamins & Hormones*, 91:331-351.
- Cheveleyre, V., Heifets, B., Kaeser, P., Südhof, T. y Castillo, P. (2007). Endocannabinoid-Mediated Long-Term Plasticity Requires cAMP/PKA Signaling and RIM1 $\alpha$ . *Neuron* 54:801–812.
- Console-Bram, L., Marcu, J., y Abood, E. (2012). Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 38:4-15.
- Cravatt, B., Prospéro-García, O., Siuzdak, G., Gilula, N., Henriksen, S., Boger, D., Lerner, R. (1995). Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science*, 268:1506-1509.
- Cruz, A., González, B., Cendejas, N., Mancilla, J., Garduño, B., Escartín, R. (2010). Inhibición de la saciedad alimentaria inducida por activación de receptores CB1 hipotalámicos. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 36:39-51.
- D'Eon, T., Pierce, K., Roix, J., Tyler, A., Chen, H. and Teixeira. S. (2008). The Role of Adipocyte Insulin Resistance in the Pathogenesis of Obesity-Related Elevations in Endocannabinoids. *Diabetes*, 57:1262-1268.
- Davies, S.N., Pertwee, R. y Riedel, G. (2002). Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. *Neuropharmacology* 42:993–1007.

- De Luca, M., Solinas, M., Bimpisidis, Z., Goldberg, S. and Di Chiara, G. (2012). Cannabinoid facilitation of behavioral and biochemical hedonic taste responses. *Neuropharmacology*, 63:161–168.
- De oliveira, L., Pasquilini, B., Diehl, F., Molina, V. and Quillfeld, J. (2008). Opposite action of hippocampal cb1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience*, 154:1648–1655.
- DeFronzo, R., Ferrannini, E. (1991). Insulin Resistance A Multifaceted Syndrome Responsible for NIDDM, Obesity, Hypertension, Dyslipidemia, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Diabetes Care*, 14:173-94.
- Di Marzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?. *Nature Publishing Group*, 7:438-455.
- Di Marzo, V., Goparaju, S., Wang, L., Liu, J., Bátkai, S., Járαι, Z., Fezza, F., et al., (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, 410:822-825.
- Dinel, A.L., André, C., Aubert, A., Ferreira, G., Layé, S., Castanon, N. (2011). Cognitive and Emotional Alterations Are Related to Hippocampal Inflammation in a Mouse Model of Metabolic Syndrome. *Plos One* 6:1-10.
- Engeli, S. (2008). Dysregulation of the Endocannabinoid System in Obesity. *Journal of Neuroendocrinology* 20:110-115.
- Erlanson-Albertsson, c. (2005). How Palatable Food Disrupts Appetite Regulation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 97:61–73.
- Farr, S., Yamada, K., Butterfield, A., Abdul, M., Xu, L., Miller, N., Banks, W., Morley, J. (2008). Obesity and Hypertriglyceridemia Produce Cognitive Impairment. *Endocrinology* 149:2628–2636.
- Fornari, R., Wichmann, R., Atsak, P., Atucha, E., Barsegyan, A., Beldjoud, H et al., (2012). Rodent Stereotaxic Surgery and Animal Welfare Outcome Improvements for Behavioral Neuroscience. *J. Vis. Exp* (59).

- Fride, E. (2007). El sistema cannabinoide endógeno: un nuevo componente en el eje cerebro-tracto digestivo-tejido adiposo. *Cannabinoids* 2:5-12 [Versión española].
- Frisardi V., Imbimbo B. (2012). Metabolic-cognitive syndrome: metabolic approach for the management of Alzheimer's disease risk. *J Alzheimers Dis.* 30:1-4.
- Frisardi, V., Solfrizzi, V., Seripab, D., Capursoc, C., Santamatod, A., et al., (2010). Metabolic-cognitive syndrome: A cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews* 9: 399–417.
- Ganong, W. (2006). *Fisiología médica*. México D.F- Santafé de Bogotá: El Manual moderno. 511-638 pp.
- García, D.E., Brown, S., Hille, B. y Mackie, K. (1998). Protein Kinase C Disrupts Cannabinoid Actions by Phosphorylation of the CB1 Cannabinoid Receptor. *The Journal of Neuroscience*, 18:2834–2841.
- González, S. Fernandez, G. Fernandez, M. Hinojosa, M y Jabary, N. (2009). Resistencia a la insulina, síndrome metabólico y metabolismo de la glucosa en pacientes con hipertensión arterial esencial. *Hipertens riesgo vasc.* 26:145-150.
- Grundy, S., Brewer, B., Cleeman, J., Smith, S., Lenfant, C. (2004). Definition of Metabolic Syndrome. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation* 109:433-438.
- Guerra, P., Mello, C., Vargas, G., Martini, A., Fachinetto, R., Dutra, R., Batista, J., y Antonello, M. (2011). Hipocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96:324-332.
- Harrison, F., Hosseini, A. and McDonald, M. (2009). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res.* 198:247–251.

- Harrold, J., Elliott, J., Kinga, P., Widdowson, P., Williams, G. (2002). Down-regulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? *Brain Research*, 952:232–238.
- Howlett, AC., Fleming, RM. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 26:532–538.
- Huang, H., Acuna-Goycolea, C., Li, Y., Cheng, H., Obrietan, K. and Van den Pol, A. (2007). Cannabinoids Excite Hypothalamic Melanin-Concentrating Hormone But Inhibit Hypocretin/Orexin Neurons: Implications for Cannabinoid Actions on Food Intake and Cognitive Arousal. *The Journal of Neuroscience*, 27:4870–4881.
- Huestis, M.A. (2005). Pharmacokinetics and Metabolism of the plant Cannabinoids,  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, Canabidiol and Cannabinol. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 168:657-690.
- Ievglevskiy, O., Palygin, O., Kondratskaya, E., Grebenyuk, S., y Krishtal, O. (2012). Modulation of ATP-induced LTP by cannabinoid receptors in rat hippocampus. *Purinergic Signaling*, DOI 10.1007/s11302-012-9296-5
- Instituto Nacional de Salud Pública. Recuperado de <http://insp.mx/noticias/nutrici%C3%B3n-y-salud/1681>
- International Federation Diabetes (IDF) 2012. Recuperado de <http://www.idf.org/metabolic-syndrome/faqs> y <http://www.idf.org/metabolic-syndrome/children>
- Kahn, B. and Flier, J. (2000). Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106: 473-481.
- Kanazawa, M., Xue, C., Kageyama, H., Suzuki, E., Ito, R., Namba, Y. (2003). Effects of a High-sucrose Diet on Body Weight, Plasma Triglycerides, and Stress Tolerance. *Nutrition Reviews* , 61:S27-S33.

- Kandel, E. (2001). The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038.
- Kandel, E. (2007). En busca de la memoria. Nacimiento de una nueva ciencia de la mente. Buenos Aires: Katz. 143-207 pp.
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell (2001). *Neurociencia y Conducta*. Madrid: Prentice Hall.
- Kang, P., Yue, P., Liu, Z., Tarnavski, O., Bodyak, N. and Izumo, S. (2004). Alterations in apoptosis regulatory factors during hypertrophy and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H72–H80.
- Klur, S., Muller, C., Pereira de Vasconcelos, A., Ballard, T., Lopez, J., et al., (2009). Hippocampal-Dependent Spatial Memory Functions Might be Lateralized in Rats: An Approach Combining Gene Expression Profiling and Reversible Inactivation. *Hippocampus*, 19:800–816.
- Konishi, K. and Bohbot, V. (2013). Spatial navigational strategies correlate with gray matter in the hippocampus of healthy older adults tested in a virtual maze. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5:1-8.
- Kosari, S., Badoer, E., Nguyen, J., Killcross, S., Jenkins, T. (2012). Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. *Behavioural Brain Research*, 235:98– 103.
- Larqu e, C., Velasco, M., Navarro-Tableros, V., Duhne, M., Aguirre, J., Guti errez-Reyes, G., Moreno, J., Robles-Diaz, G., Hong, E., y Hiriart, M. (2011). Early endocrine and molecular changes in metabolic syndrome models. *IUBMB Life* 63:831–839.
- Le Foll, B., Trigo, J., Sharkey, K., Le Strat, Y. (2013). Cannabis and D9-tetrahydrocannabinol (THC) for weight loss? *Medical Hypotheses*, 80:564–567.
- Lichtman, A., Dimen, K., Martin, B. (1995). Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology*, 119:282-290.
- Lichtman, A. y Martin, B. (1996).  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology*, 126:125-131.

- Lynch, M., (2004). Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews*. 84:87-136.
- Mackie, K. (2005). Distribution of Cannabinoid Receptors in the Central and Peripheral Nervous System. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 168:299–325.
- Mackie, K. (2006). Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. Nature Publishing Group. *International Journal of Obesity*, 30:S19–S23.
- Mackie, K. (2008). Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 286S: S60–S65.
- Martin, W., Coffin, P., Attias, E., Balinsky, M., Tsou, K., Walker, M. (1999). Anatomical basis for cannabinoid-induced antinociception as revealed by intracerebral microinjections. *Brain Research*, 822:237–242.
- Martínez de Morentin, B., Rodríguez M. y Martínez, J. (2003). Síndrome metabólico, resistencia a la insulina y metabolismo tisular. *Endocrinología y Nutrición.*, 50:324-33.
- Martínez, A., (2011). Síndrome metabólico, su reversibilidad y características en un modelo animal. Programa de Maestría y Doctorado. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
- Martínez, A., Machedaa, T., Grazia, M., Trabacec, L., Giuffrida, A. (2012). The cannabinoid agonist WIN55212-2 decreases I-DOPA-induced PKA activation and dyskinetic behavior in 6-OHDA-treated rats. *Neuroscience Research*, 72: 236–242.
- Martínez-Vargas, M., Murillo-Rodríguez, E., González-Rivera, R., Landa, A., Méndez-Díaz, M., Prospéro-García, O. y Navarro, L. (2003). Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience*, 117:197–201.
- Massa, F., Mancini, G., Schmidt, H., Steindel, F., Mackie, K., Angioni, C., Oliet, S., Geisslinger, G. and Lutz, B. (2010). Alterations in the Hippocampal



- Endocannabinoid System in Diet-Induced Obese Mice. *The Journal of Neuroscience*, 30:6273– 6281.
- McKinney, MK., Cravatt, BF. (2005). Structure-based design of a FAAH variant that discriminates between the N-acyl ethanolamine and taurine families of signaling lipids. *Biochemistry*, 45(30):9016-22.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemistry Pharmacology* 50:83–90.
- Méndez-Díaz, M., Herrera-Solís, A., Soria-Gómez, E., Rueda-Orozco, P. y Prospéro-García, O. (2008). Mighty cannabinoids: A potential pharmacological tool in medicine. *Research Signpost*, pp.137:157.
- Méndez-Díaz, M., Rueda-Orozco, P., Ruiz-Contreras, A. & Prospéro-García, O. (2010). The endocannabinoid system modulates the valence of the emotion associated to food ingestion. *Addiction Biology*, 17:725–735.
- Merrouna, I., Sánchez-González, C., Martínez, R., López-Chaves, C., Porres, J., Aranda, P., et al., (2013). Novel effects of the cannabinoid inverse agonist AM 251 on parameters related to metabolic syndrome in obese Zucker rats. *Metabolism*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2013.06.011>
- Milner, B., Squire, L. y Kandel, E. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20:445-468.
- Molteni, R., Barnard, R., Ying, Z., Roberts, K. and Gómez-Pinilla. (2002). A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience*, 4:803-814.
- Murillo-Rodríguez, E. y Drucker-Colín, R. (2006). Endocannabinoides y su modulación en el sueño. *Arch Neurocién (Mex)*, 11:185-193.

- Murillo-Rodríguez, E., Sánchez-Alavez, M., Navarro, L., Martínez-González, D., Drucker-Colín, R., Prospéro-García, O. (1998). Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Research*, 812:270–274.
- Navarro, L., Martínez-Vargas, M. Murillo-Rodríguez, E., Landa, A., Méndez-Díaz, M., and Prospéro-García, O. (2003). Potential role of the cannabinoid receptor cb1 in rapid eye movement sleep rebound. *Neuroscience*, 120:855–859.
- Nunn, A., Guy, G., Bell, J. (2010). Endocannabinoids, FOXO and the metabolic syndrome: redox, function and tipping point the view from two systems. *Immunobiology* 215:617–628.
- O’Leary, T., y Brown, R. (2011). The effects of apparatus design and test procedure on learning and memory performance of C57BL/6J mice on the Barnes maze. *Journal of Neuroscience Methods* 203:315–324.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) 2012. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B. and Pasquali, R. (2006). The Emerging Role of the Endocannabinoid System in Endocrine Regulation and Energy Balance. *Endocrine Reviews*, 27:73–100.
- Patil, S., Sunyer, B., Högerb, H., Lubec, G. (2009). Evaluation of spatial memory of C57BL/6J and CD1 mice in the Barnes maze, the Multiple T-maze and in the Morris water maze. *Behavioural Brain Research*, 198:58–68.
- Pattij, T., Wiskerke, J., Schoffelmeer, A. (2008). Cannabinoid modulation of executive functions. *European Journal of Pharmacology*, 585:458-463.
- Paxinos, G., Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th ed. Academic, San Diego, CA.
- Per, A., Bliss, T. and Skrede, K. (1971). Lamellar Organization of Hippocampal Excitatory Pathways. *Experimental Brain Research*, 13:222-238.

- Pertwee, R.G. (2005). Pharmacological Actions of cannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag, 168:1-51pp.
- Pineda, C. (2008). Síndrome Metabólico: definición, historia, criterios. *Colombia Médica*, 39:96-106.
- Pistell, P., Morrison, D., Gupta, S., Knight, A., Keller, J. et al., (2010). Cognitive Impairment Following High Fat Diet Consumption is Associated with Brain Inflammation. *J Neuroimmunol*, 219: 25–32.
- Prado-Alcalá, R., Solana-Figueroa, R., Galindo, L., Medina, A. y Quirarte, G. (2003). ¿Participa la serotonina cerebral en la memoria del aprendizaje incrementado? *Revista Mexicana de Analisis de la conducta*, 29:107-117.
- Prospéro-García, O., Méndez-Díaz, M., Ruiz-Contreras, A., Alvarado-Capuleño, I., Rosenthal, L. (2010). Insomnio, estrés y cannabinoides. *Salud Mental*, 34:211-218.
- Raber, J., Rola, R., LeFevour, A., Morhardt, D., Curley, J., Mizumatsu, S., VandenBerg, S.R., Fike, J.R. (2004). Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiation Research*, 162:39-47.
- Ramos, A., Fernández, J. (2005). Sistema cannabinoide endógeno: ligandos y receptores acoplados a mecanismos de transducción de señales. *Revista Adicciones*, 12:59-81.
- Razay, G., Vreugdenhil, A. Wilcock, G. (2007). The Metabolic Syndrome and Alzheimer Disease. *Arch Neurol*. 64:93-96.
- Riedel, G. y Davies, S. (2005). Cannabinoid Function in Learning, Memory and Plasticity. *Handbook of Experimental Pharmacology*HEP, 168:445–477.
- Robinson, L., Goonawardena, V., Pertwe, R., Hampson, E., Platt, B., Riedel, G. (2010). WIN55,212-2 induced deficits in spatial learning are mediated by cholinergic hypofunction. *Behavioural Brain Research*, 208:584–592.

- Robinson, L., McKillop-Smith, S., Ross, N.L., Pertwee, R., Hampson, R., Platt, B., Riedel, G. (2008). Hippocampal endocannabinoids inhibit spatial learning and limit spatial memory in rats. *Psychopharmacology* 198:551–563.
- Ross, A., Bartness, T., Mielke, J., Parent, M. (2009). A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92:410–416.
- Rueda-Orozco, P., Soria-Gómez, E., Montes-Rodríguez, C., Martínez-Vargas, M., Galicia, O., Navarro, L., Prospéro-García, O. (2008). A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology*, 198:565–576.
- Ruiz Contreras, A., Méndez Díaz, M., Prieto Gómez, B., Romano, A., Caynas, S., Prospéro García, O. (2010). El cerebro, las drogas y los genes. *Salud Mental*, 33:535-542.
- Rutter, K., Hennoste, I., Ward, I., Cornish, B. H., Thomas, B. (1998). Bioelectrical impedance analysis for the estimation of body composition in rats. *Laboratory Animals*, 32:65-71.
- Seely, K., Prather, P., James, L., Moran, J. (2011). Marijuana-based Drugs: innovative therapeutics or designer drugs of abuse? *Molecular interventions* 11:36-51.
- Sharma, P., Murthy, P., Bharath, S. (2012). Chemistry, Metabolism, and Toxicology of Cannabis: Clinical Implications. *Iran J Psychiatry*, 7:149-156.
- Sharma, S., Rakoczy, S. y Brown-Borg, H. (2010). Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences*, 87:521–536.
- Smith, E., Kosslyn, S. (2008). *Procesos cognitivos: modelos y bases neurales*. Madrid: Pearson educación, S.A. 151-273 pp.
- Soares, E., Prediger, R., Nunes, S., Castro, A., Viana, S., Lemos, C., et al., (2013). Spatial memory impairments in a prediabetic rat model. *Neuroscience*, 250:1-40.
- Squire, L. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82:171–177.

- Sumiyoshi, M., Sakanaka, M. and Kimura, Y. (2006). Chronic Intake of High-Fat and High-Sucrose Diets Differentially Affects Glucose Intolerance in Mice. *J. Nutr.* 136:582–587.
- Sunyer, B Patil, S Höger, H y Lubec, G (2011). Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice 349:1-14.
- Troncoso, J., Lamprea, M. y Cuestas, M.A. (2010). El estrés agudo interfiere con la evocación y promueve la extinción de la memoria espacial en el laberinto de Barnes. *Acta biol. Colomb.* 15:207-222.
- Tulving, E. (2002). Episodic Memory: From Mind to Brain. *Annual Review Psychology*, 53:1-25.
- Valladolid-Acebes, I., Stucchi, P., Cano, V., Fernández-Alfonso, S., Merino, B., et al., (2001). High-fat diets impair spatial learning in the radial-arm maze in mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 95:80–85.
- Van der Kommer, T., Dik, M., Comijs, H., Jonker, C., Deeg, D. (2012). The role of lipoproteins and inflammation in cognitive decline: Do they interact? *Neurobiology of Aging*. 33:196e1-196e12.
- Wegener, N., Kuhnert, S., Thüns, A., Roese, R., Koch, M. (2008). Effects of acute systemic and intra-cerebral stimulation of cannabinoid receptors on sensorimotor gating, locomotion and spatial memory in rats. *Psychopharmacology*, 198:375–385.
- Wilson, R y Nicoll, R (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296:678-682.
- Wu, M., Shanabrough, M., Leranth, C. and Alreja, M. Cholinergic Excitation of Septohipocampal GABA But Not Cholinergic Neurons: Implications for Learning and Memory. *The Journal of Neuroscience*, 20:3900-3908.
- Xu, T., Yang, Y., Ward, R., Gao, L., Liu, Y. (2013). Orexin receptors: Multi-functional therapeutic targets for sleeping disorders, eating disorders, drug addiction, cancers and other physiological disorders. *Cellular Signalling*, 25:2413–2423.

- Yaffe, K., Kanaya, A., Lindquist, K., Simonsick, E., Harris, T., Shorr, R., et al., (2004). The Metabolic Syndrome, Inflammation, and Risk of Cognitive Decline. *JAMA* 292:2237-2242.
- Yang, Z., Miyahara, H., Takeo, J. and Katayama, M. (2012). Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 4:32.