



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Carrera de Biología

**Efectos intra y extra pancreáticos del antagonista
canabinoide BAR-1 en ratones bajo un modelo de síndrome
metabólico simulado con dieta hipercalórica**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Biólogo

PRESENTA

Héctor Iván Ramos Tovar

Asesor: Dr. Alonso Antonio Vilches Flores.

Apoyo PAPIIT-UNAM IA203414



Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla de Baz, Estado de México 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis tuvo el apoyo de la DGAPA-UNAM con el proyecto PAPIIT IA203414, se agradece al Dr. Rafael Villalobos Molina por facilitar las instalaciones del laboratorio 7 de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.



AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Agradezco a Dios y a la vida que me han permitido llegar justo hasta donde estoy ahora.

También a mi familia que siempre me ha apoyado con todas mis decisiones, en los días alegres y también en los más difíciles. Que me han sabido llevar por el buen camino con cada uno de sus consejos, pero sobre todo con su ejemplo.

Le agradezco también al Dr. Alonso Vilches Flores que con su paciencia, recursos y trabajo apoyo mis últimos pasos por la hermosa carrera de biología. Sin duda su trabajo y su vocación por la investigación y enseñanza es y será inspiración para muchos jóvenes que quieran dedicarse al mundo de la ciencia.

A mis amigos, los que tengo desde que tengo memoria, los de jufra y los biólogos, porque estado justo cuando se necesita, a cada uno con sus rarezas y distinguidos modos de ser les agradezco por estar en mi vida y dejarme ser parte de la suya.

Y a todas esas personas que han estado conmigo y han sido pilar de mi vida, las que están ahora y las que vienen, gracias por todo 😊.



ÍNDICE

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
Síndrome Metabólico (SM) y Diabetes	7
El Páncreas	10
El sistema endocanabinoide	12
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y MÉTODO.	21
Síntesis y purificación de BAR-1	21
Dieta y tratamiento	21
Parámetros clínicos.	21
Aislamiento de islotes pancreáticos	22
Procesamiento histológico del páncreas.	22
Análisis de datos	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS	39



RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es considerado como uno de los problemas de salud más graves del siglo XXI. Actualmente se han propuesto nuevos tratamientos para combatir el síndrome metabólico inhibiendo el sistema endocanabinoide (SEC). Dentro del SEC, los endocannabinoides (EC) regulan las señales de saciedad a nivel gastrointestinal e hipotalámico, promueven la sobrealimentación y estimulan la biosíntesis de lípidos, el bloqueo de estos receptores con Rimonabant reduce significativamente la circunferencia de la cintura, mejora los niveles plasmáticos de la lipoproteína de alta densidad (HDL), disminuye la resistencia a la insulina, retarda el desarrollo del síndrome metabólico, reduce significativamente el apetito, y mejora los procesos metabólicos, sin embargo presenta efectos secundarios, por lo que es necesario buscar una alternativa para el tratamiento del SM. Nuestro grupo de trabajo sintetizó un análogo del rimonabant, el BAR-1, el cual, en una evaluación preliminar realizada en islotes pancreáticos aislados de rata, a 1 μM de BAR-1/hr en concentraciones de glucosa a 3 mM, bloquea parcialmente los efectos de la anandamida sobre los niveles de mRNA para CB1r e insulina, potenciando la secreción de insulina en respuesta a glucosa, *in vitro*. Por lo que en este trabajo se evaluará los efectos de la administración farmacológica del antagonista canabinoide BAR-1 en ratones bajo un modelo simulado de SM. En este estudio se utilizaron 60 ratones machos de cuatro semanas de edad, separados en 6 grupos con dos tratamientos y un control a 4 y 8 semanas con una dieta hipercalórica. Al final de los tratamientos se registraron los parámetros clínicos de los ratones. Posterior al sacrificio de los ratones se realizó la extracción total del páncreas y este fue fijado en reactivo de Bouin para analizar la estructura y posibles modificaciones de los islotes al ser tratados farmacológicamente con BAR-1.

Los resultados mostraron que el BAR-1 se comportó como un antagonista parcial de los receptores CB1 por sus efectos preventivos sobre la hiperplasia y degradación del islote, sin que estos tengan repercusión en el control de peso de los ratones.





INTRODUCCIÓN

1. SÍNDROME METABÓLICO (SM) Y DIABETES

El SM se ha constituido como uno de los problemas de salud más graves del siglo XXI. Se trata de una entidad clínica definida por un conjunto de alteraciones metabólicas y vasculares incluyendo distintos grados de obesidad central, hipertensión, dislipidemia, hiperglucemia, resistencia insulínica y estado protrombótico, que, agrupados en un mismo individuo, aumentan considerablemente el riesgo de padecer enfermedades cardiovascular o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Álvarez-Hernández, 2010). El origen fisiopatológico del SM aún está en discusión. Se ha sugerido que la fisiopatología está basada principalmente en la resistencia a la insulina, como origen del conjunto de anormalidades que conforman el SM (Lizarzaburu, 2013). Sin embargo, el diagnóstico de esta entidad ha resultado inconstante debido a que los criterios de diagnóstico han cambiado a lo largo de la última década. En 1999, la OMS estableció que se necesitaba la presencia de resistencia a la insulina y dos componentes adicionales como obesidad abdominal, hipertensión arterial, dislipidemia, hipertrigliceridemia, niveles bajos de colesterol HDL, DM2 o microalbuminuria para considerar que una persona presentaba SM. En 2001, el National Cholesterol Education Program: Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII), conservó tres de los criterios anteriores, desglosando la dislipidemia en sus dos componentes, cambió la DM2 por la intolerancia a la glucosa, y eliminó la microalbuminuria; y por último estableció que se requeriría la presencia de al menos tres de los cinco componentes para establecer el SM. En el año 2003, la American Association of Clinical Endocrinology (AACE) unificó y publicó una serie de criterios para el diagnóstico del SM. Otros grupos que han publicado propuestas de diagnóstico son la IDF (International Diabetes Federation) y el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a Insulina (EGIR) (Lumbreras, 2012)

Según la definición de la IDF los pacientes con SM tienen dos veces más riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular en los 5 o 10 años siguientes frente a los pacientes que no lo tienen. Igualmente, el SM confiere un aumento del riesgo de padecer DM2 cinco veces mayor.



En la tabla 1 se enlistan los principales criterios de definición del grado de avance del SM, según varios organismos.

Para el desarrollo del SM intervienen varios factores de riesgo, tales como, la obesidad, la edad, los antecedentes familiares, el sedentarismo o el pertenecer a un grupo étnico de alto riesgo (IMSS, 2013). Sin duda alguna, los estilos de vida son el principal factor de riesgo para el desarrollo de DM2 y se estima que el 90 % de los casos pueden atribuírsele a esta causa (Narayan et al., 2003).

Tanto el SM, como el desarrollo de DM2 se caracterizan por alteraciones en el metabolismo de carbohidratos lípidos y proteínas que pueden ser el resultado de defectos en la secreción, acción de insulina o ambos (ADA, 2016). La resistencia a la insulina y la disfunción de las células β pancreáticas representa el defecto primario en la patogénesis de estos síndromes (Pretkin y Nolan, 2006).

Entre los primeros eventos que conducen a estos síndromes metabólicos esta la disfunción de las células β pancreáticas y la resistencia insulínica en tejidos extrapancreáticos, que lleva a un incremento de la síntesis y secreción (hiperinsulinismo compensatorio), capaz de mantener la homeostasia metabólica por años. Sin embargo, esta situación deteriora crónicamente al islote pancreático conduciendo a un 50% de eficiencia y posteriormente a la manifestación clínica de DM2 (Briceño y Silva, 2007; Pretkin y Nolan, 2006).

La resistencia a la insulina es un estado patológico donde hay una respuesta biológica subnormal a la insulina secretada y se determina a través de la hiperinsulinemia (Kahn, 1986), inicia con euglucemia como mecanismo compensador para llegar a una nueva condición de equilibrio normoglucémico (Briseño y Silva, 2007), posteriormente se desarrolla hiperinsulinemia con hiperglucemia. La insulino-resistencia puede inferirse por la presencia de concentraciones elevadas de insulina en ayunas, sin hipoglucemia concomitante (Hollenbeck y Raven, 1987).



Criterios de definición de síndrome metabólico según distintas organizaciones internacionales				
OMS	NCEP- ATP III	AACE	IDF	EGIR
Obesidad abdominal Índice de masa corporal ≥ 30 Kg/m ² Relación cintura cadera: Hombres (H) ≥ 0.90 Mujeres (M) ≥ 0.85	Obesidad abdominal Circunferencia de cintura H >102 cm M >88 cm	Índice de masa corporal ≥ 25 Circunferencia de cintura H >102 cm M >88 cm	Circunferencia abdominal H > 94 cm M <80 cm	Circunferencia abdominal H > 94 cm M <80 cm IMC ≥ 30 Kg/m ²
Resistencia a la insulina DM2 definida por HOMA-IR (Modelo homeostático para valorar resistencia a insulina)	Intolerancia a la glucosa (≥ 110 mg/dL)	Glucosa plasmática en ayuno 110 – 125 mg/dL o > 140 mg/dL 2h después de una carga de glucosa de 75g	Glucosa plasmática en ayuno >100 mg/dL o previo diagnóstico de DM2	Resistencia a insulina o hiperinsulinemia en ayuno > p75
Hipertensión arterial bajo tratamiento hipertensivo y/o $\geq 140/90$ mmHg	Presión sanguínea $\geq 130/85$ mm Hg	Presión sanguínea $\geq 130/85$ mm Hg	Presión arterial >130/85 mm Hg o	Hipertensión arterial bajo tratamiento hipertensivo y/o $\geq 140/90$ mmHg
Colesterol HDL: H <35mg/dL M < 39mg/dL	Colesterol HDL H <40 mg/dL M <50mg/dL	Colesterol HDL H <40 mg/dL M <50mg/ dL	Colesterol HDL H <40mg/dL M <50 mg/dL ó fármaco específico	Colesterol HDL <40mg/dL
Triglicéridos ≥ 150 mg/dL (≥ 1.7 mmol/L)	Triglicéridos >150 mg/dL	Triglicéridos >150 mg/dL	Triglicéridos en ayuno >150 mg/dL	Triglicéridos ≥ 180 mg/ dL
Microalbuminuria ≥ 20 μ g/min			Diagnóstico de enfermedad cardiovascular, hipertensión, síndrome de ovarios poliquísticos, o acantosis nigricans	

OMS: Organización Mundial de la Salud
NCEP- ATP III: National Cholesterol Education Program: Adult Treatment Panel III
AACE: American Association of Clinical Endocrinology
IDF: International Diabetes Federation
EGIR: Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a Insulina

Tabla 1: Criterios de definición de síndrome metabólico según distintas organizaciones internacionales (Lumbreras, 2012).

Para el estudio y entendimiento de estos eventos es importante comprender el papel que desarrolla el islote pancreático de manera directa.



2. EL PÁNCREAS

El páncreas es un órgano único, constituido por dos tipos de tejidos secretores, ambos relacionados con el manejo de nutrientes. El 98% del páncreas está constituido por el tejido exocrino, formado por numerosos conductos y acinos lobulares conectados por el tejido conjuntivo, cuya función es sintetizar, almacenar y secretar al duodeno las enzimas necesarias para la digestión de los alimentos. El páncreas endocrino representa el 2% restante, está constituido por los islotes de Langerhans, en los que las diferentes células se organizan en una estructura tridimensional que permite la regulación paracrina de sus secreciones, con una enorme vascularización que facilita el intercambio rápido de metabolitos y hormonas entre el espacio intracelular y la sangre. Todo ello tiene como acción fundamental la homeostasis de la glucosa (Kim *et al.*, 2010).

En humanos, el páncreas tiene alrededor de 1 millón de islotes de Langerhans que contienen cinco tipos de células principales y dos secundarias que se distinguen por sus características estructurales y su contenido hormonal.

Los cinco tipos de células principales son:

- Células α : Secretan glucagón que produce hiperglucemia por su actividad glucogenolítica en el hígado.
- Células β : Producen insulina, principal hormona hipoglucemiante.
- Células δ : Contienen somatostatina que regula la liberación de insulina y de glucagón.
- Células PP o F: Contienen un polipéptido pancreático exclusivo con diversas acciones digestivas, como estimular la secreción de enzimas gástricas e intestinales e inhibir la motilidad intestinal.
- Células ϵ : Secretan grelina que estimula el apetito y está implicada en el balance energético y peso corporal (Brandan *et al.*, 2011; Tucci, 2008).



Los dos tipos de células secundarias son:

- Células D1: sintetizan polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), una hormona que produce glucogenólisis e hiperglucemia, aunque también estimulan la secreción de fluidos digestivos.
- Células enterocromafines: sintetizan serotonina (Brandan *et al.*, 2011).

El proceso de secreción de insulina está regulado mediante estímulos y señales generadas por nutrientes, neurotransmisores y hormonas. Entre los nutrientes, la glucosa es el principal regulador fisiológico de la secreción de insulina. La glucosa entra en la célula β mediante un transportador GLUT2, que permite la entrada rápida de la misma a concentraciones fisiológicas. En el interior de la célula se fosforila a glucosa-6-fosfato por la glucocinasa; esta enzima se considera el verdadero sensor de glucosa de la célula β ; ya que su actividad es esencial para la estimulación de la secreción de insulina mediada por glucosa. El metabolismo de la glucosa se continúa por glucólisis y ciclo de Krebs hasta la generación de ATP. El incremento en la relación ATP/ADP cierra los canales de potasio dependientes de ATP, de forma que el potasio se acumula en el interior de la célula. Esto conduce a la despolarización de la membrana celular, al cambio de la corriente iónica y a la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje. Al aumentar la concentración intracelular de este catión, se activan varias proteínas asociadas al citoesqueleto que movilizan los gránulos de secreción de insulina hacia la membrana. Ciertos aminoácidos también pueden estimular la secreción de insulina, o bien potenciar la respuesta a glucosa. Muchas hormonas tienen un efecto regulador de la secreción de insulina, entre ellas las otras hormonas secretadas por el islote mediante un efecto paracrino y el efecto estimulador mediado por las hormonas gastrointestinales, denominado efecto incretina (Brandan *et al.*, 2011). En años recientes se ha descrito una novedosa modulación de la función del islote por el sistema endocanabinoide.



3. EL SISTEMA ENDOCANABINOIDE

El sistema endocanabinoide (SEC) es un complejo de señalización lipídica altamente preservado en la evolución, que se ha identificado en mamíferos, pájaros, anfibios, peces, erizos de mar, moluscos y sanguijuelas (Grotenhermen, 2006). Está constituido por lípidos N-araquidoniletanolamida, también denominado como anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG), sintetizados por las enzimas N-araquidonil-fosfatiletanolamida (NAPE) y diacil-glicerol lipasa (DAGL), y degradados por las enzimas intracelulares amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL), respectivamente. La activación de los dos receptores de cannabinoides denominados CB1 y CB2, está ligada con la producción de AMPc y la actividad de canales iónicos (Netzahualcoyotzi-Piedra *et al.*, 2009). Los EC modulan procesos fisiológicos tales como la transmisión sináptica, la neuroprotección, la función inmune, la ingesta de alimentos y el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Bermudez-Silva *et al.*, 2009).

Dentro de los cannabinoides endógenos se destaca la anandamida o N-araquidoniletanolamina, identificada a partir de extractos lipídicos cerebrales (Hillard, 2000). La AEA es un derivado del ácido araquidónico que se sintetiza en dos pasos enzimáticos realizados en la membrana postsináptica: en el primero de ellos, se realiza la activación de la N-acetiltransferasa, una enzima dependiente de AMPc que se encarga de catalizar la transferencia del ácido araquidónico de la fosfatidilcolina al grupo fosfato de la fosfatidiletanolamida, formando de esta manera la N-araquidonil-fosfatiletanolamida (NAPE) que, posteriormente, se hidroliza por acción de una fosfolipasa tipo D (PLD) y forma AEA. Una vez sintetizada se libera al medio extracelular (aunque aún no se sabe si esta liberación es dependiente de Ca^{2+} o si se realiza por difusión simple) y ejerce su acción uniéndose al receptor presináptico CB1. El complejo AEA-CB1 es internalizado por acción de una proteína transportadora de endocannabinoides donde se hidroliza por la FAAH formando ácido araquidónico y etanolamida, los cuales pueden volver a formar parte de los fosfolípidos de membrana. La AEA se sintetiza y se libera por neuronas GABAérgicas o glutamatérgicas, se une y activa a receptores específicos de membrana y, una vez terminada



su acción, se inactiva por recaptación y la posterior degradación enzimática (Netzahualcoyotzi-Piedra *et al.*, 2009).

Otro compuesto endógeno importante es el 2-AG que es agonista del receptor CB2 y con menor afinidad sobre CB1. Este compuesto se encuentra en el cerebro en mayor concentración que la anandamida, pero tiene menor vida media ya que se degrada rápidamente a través de esterasas de difícil inhibición (Di Marzo *et al.*, 2004).

La anandamida es degradada por la ácido graso amidohidrolasa (FAAH) y genera ácido graso y etanolamida, sustancias cuantificables en plasma. El 2-AG es degradado por la acción de la monoacilglicerolipasa (MAGL) y de la FAAH, y genera glicerol y ácido araquidónico (Di Marzo *et al.*, 2004)

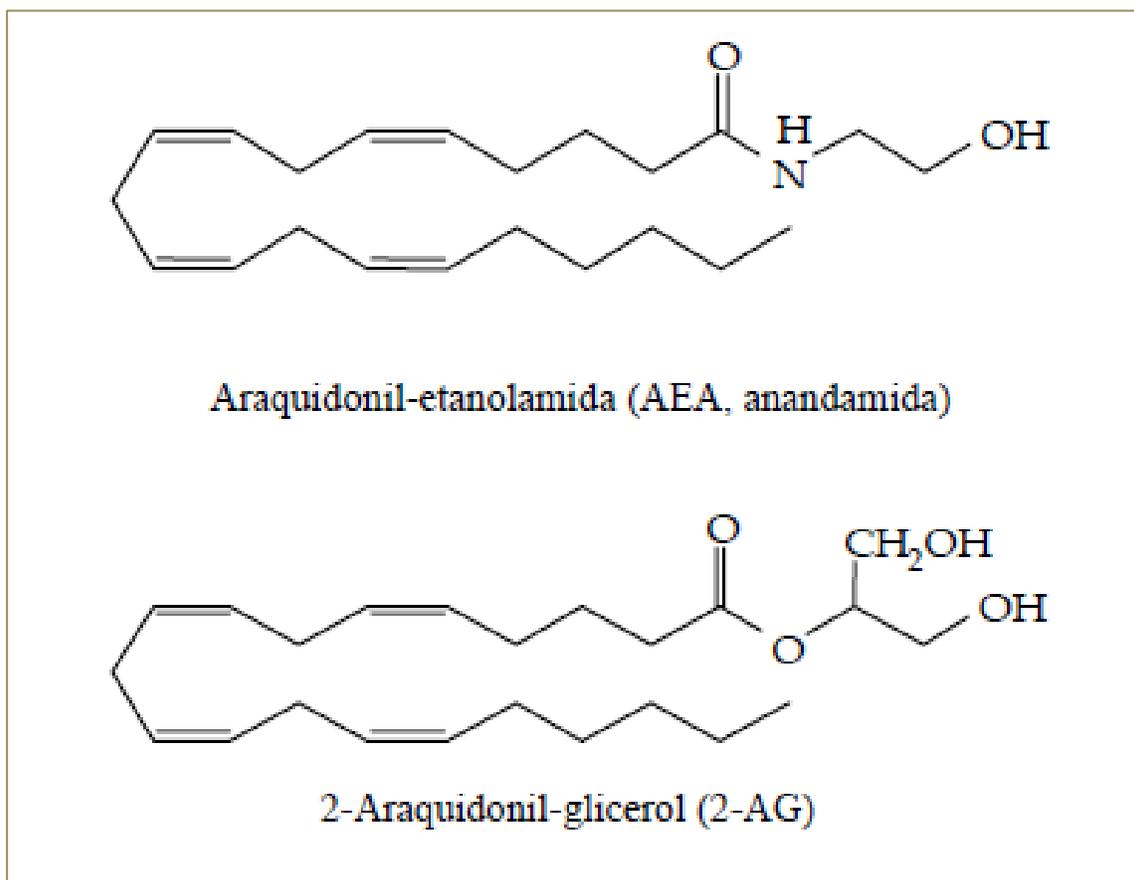


Figura 1. Estructura química de los endocannabinoides



Una particularidad que caracteriza a los endocannabinoides es la incapacidad de ser almacenados en las terminales nerviosas, por lo que no se consideran neurotransmisores propiamente dichos, sino que su producción y liberación ocurren «a necesidad», generando un estado tónico en sus niveles. Lo anterior, unido al hecho de su acción a distancia, determina que los endocannabinoides sean considerados más como sustancias con comportamiento hormonal que como neurotransmisores (Di Marzo *et al.*, 2004; López-Jaramillo *et al.*, 2005). En estado basal, el sistema endocanabinoide es silente, pero se activa frente a situaciones como el estrés y el ayuno (López-Jaramillo *et al.*, 2005).

Hasta la fecha se han caracterizado dos tipos de receptores canabinoides, los CB1 y los CB2. Se diferencian en el modo de transmitir la señal y en su distribución en los diferentes tejidos. La activación de los receptores canabinoides da lugar a una inhibición de la adenil ciclasa, lo que impide la conversión del ATP a AMP cíclico (AMPc). El CB1 y el CB2, pertenecen a la extensa familia de receptores acoplados a una proteína G (G-protein coupled receptors, GPCR). Los receptores canabinoides CB1 son los GPCR más abundantes y extensamente distribuidos del cerebro. La activación de los receptores CB1 da lugar a los típicos efectos sobre la circulación y la psique conocidos tras el consumo de *Cannabis sativa*, mientras que la activación de los CB2 no los produce. Los CB1 se encuentran principalmente en las neuronas del cerebro, la médula espinal y el sistema nervioso periférico, aunque también están presentes en ciertos órganos y tejidos periféricos, como glándulas endocrinas, glándulas salivales, leucocitos, bazo y corazón.

La activación de los receptores CB1 protege al sistema nervioso contra la sobre-activación o la sobre-inhibición provocada por los neurotransmisores. Los receptores CB1 se hallan en abundancia en las regiones del cerebro responsables del movimiento (ganglios basales, cerebelo), del procesamiento de la memoria (hipocampo, corteza cerebral) y de la modulación del dolor (ciertas partes de la médula espinal, sustancia gris periacueductal), mientras que su presencia en el tronco cerebral es baja, lo que puede explicar la falta de adversidades agudas relacionadas con el consumo de *Cannabis*.



Los receptores CB2 se encuentran principalmente en las células inmunitarias, entre ellas los leucocitos, el bazo y las amígdalas. Una de las funciones de los receptores CB en el sistema inmunitario es la modulación de la liberación de las citoquinas, responsables de la inflamación y la regulación del sistema inmunológico. Puesto que los compuestos que activan selectivamente los receptores CB2 no causan efectos psicológicos, son actualmente un blanco de investigación en las aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides, como por ejemplo como analgésico, antiinflamatorio y antineoplásico (Bermudez-Silva *et al.*, 2009; Di Marzo *et al.*, 2008). Por otro lado, aumenta la evidencia sobre la existencia de más subtipos de receptores cannabinoides en el cerebro y la periferia. Uno de estos puede ser el GPR55 (Baker *et al.*, 2006). Otros receptores pueden relacionarse sólo funcionalmente con los conocidos receptores canabinoide, con una estructura similar.

Los endocannabinoides muestran distinto grado de afinidad por los receptores CB1 y CB2. Se han desarrollado cannabinoides sintéticos que actúan como agonistas o antagonistas selectivos a uno u otro receptor. Por ejemplo, el Δ^9 -THC tiene aproximadamente igual afinidad tanto para el receptor CB1 como para el CB2, mientras que la anandamida tiene muy poca selectividad para los CB2 (Grotenhermen, 2006).

Se han identificado elementos del sistema endocanabinoide en las células α , β y δ en islotes pancreáticos de humano, ratón y ratas (Li, *et al.* 2010, 2011; Vilches-Flores, *et al.* 2013, 2016). Se ha reportado que agonistas del receptor CB1, tales como el Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) y sus análogos, promueven la liberación basal de insulina e incrementan el estímulo inducido por la glucosa (Bermúdez-Silva *et al.*, 2009a). A pesar de que existen controversias sobre el efecto en la secreción de hormonas, son claras las evidencias que indican el papel fisiológico del sistema endocanabinoide en el islote pancreático (Li *et al.*, 2011).

En estudios clínicos y farmacológicos se ha demostrado que el bloqueo de los receptores cannabinoides produce una reducción significativa en la circunferencia de la cintura, mejora los niveles plasmáticos de la HDL, disminuye la resistencia a la insulina, y retarda el desarrollo del síndrome metabólico, según se observó en un estudio clínico con



pacientes obesos tratados con el antagonista del receptor CB1 denominado rimonabant (Scheen *et al.*, 2006; Van Gaal *et al.*, 2005).

Los antagonistas al receptor CB1 conocidos hasta el momento son derivados 1,5-diarilpirazoles, aminoalquilindoles o triazoles (Scheen *et al.*, 2007) El rimonabant (figura 2) fue el primer antagonista al receptor CB1 reportado y extensamente investigado por Sanofi-Aventis quien lo comercializó en varios países; desde entonces el antagonismo para el receptor CB1 ha sido considerado como una estrategia para el tratamiento de la obesidad (Hee *et al.*, 2010). Debido a sus efectos secundarios, tales como ansiedad y depresión, el rimonabant fue retirado del mercado farmacéutico (McLaughlin, 2012).

A mediados de la década pasada, el antagonista del receptor CB1 denominado rimonabant (SR141716A) fue propuesto como tratamiento para el sobrepeso y la obesidad, en pacientes con síndrome metabólico y DMT2, observándose una reducción significativa del apetito, de la lipogénesis y un mejoramiento metabólico (Bermudez-Silva *et al.*, 2007). Existen evidencias de los efectos farmacológicos del rimonabant sobre la secreción de insulina, sin embargo, son pocos los estudios que lo demuestran directamente sobre el tejido pancreático endocrino. En islotes aislados de ratas Zucker delgadas el rimonabant a concentración de 1 μ M causó disminución aproximadamente de 50% la secreción de insulina estimulada por glucosa, mientras que en ratas obesas se incrementó un 30% (Getty-Kaushik *et al.*, 2009). En otro estudio donde se administró 10 mg/kg/día de rimonabant durante 15 días y 3 meses, no se observaron cambios en los niveles de insulina sérica tras una curva de tolerancia a la glucosa, sin embargo, se observó una disminución significativa en la superficie correspondiente a los islotes, y una menor desorganización de éstas estructuras con respecto al control diabético (Duvivier *et al.*, 2009).

Tras estas observaciones se han desarrollado nuevos compuestos sintéticos que interactúan con algunos componentes del SEC, tales como agonistas y antagonistas para el receptor CB1, fármacos que bloquean el transporte de EC, otros que inhiben la actividad de las enzimas de degradación de los cannabinoides e inhibidores selectivos de las enzimas DAGL α y DAGL β las cuales catalizan la síntesis de 2AG (Bermudez-Silva *et al.*, 2009; Vilches-Flores *et al.*, 2010).

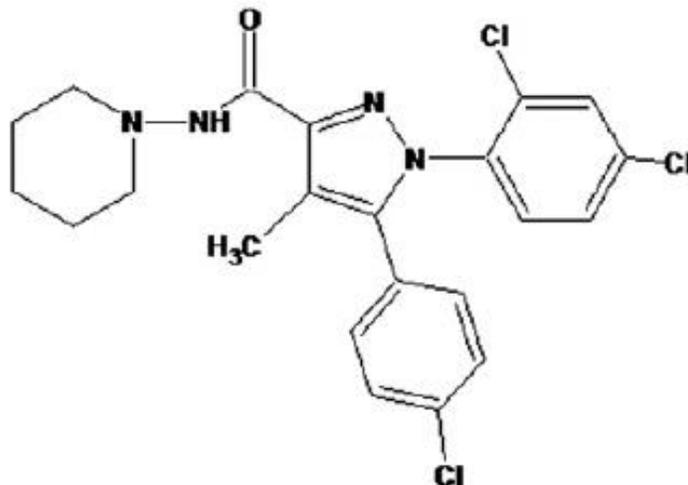


Figura 2. Estructura química de rimonabant.

Buscando una alternativa para bloquear a los receptores del sistema endocanabinoide, en nuestro grupo de investigación, se sintetizó un análogo del rimonabant denominado “BAR-1” (1-(4-cloropfenil) -2- (2, 4-diclorofenil) -N- (1-piperidinil) -1H-benzimidazole -5-carboxamida), cuya fórmula se da en la figura 3. En una evaluación preliminar realizada en islotes pancreáticos de rata se observó que el tratamiento por 1 hora con 1 μM de BAR-1 a 3 mM de glucosa, bloquea parcialmente los efectos de anandamida sobre la abundancia de mRNA de insulina, además de potenciar la secreción de insulina en respuesta a 16 mM de glucosa (Vilches-Flores *et al.*, 2010). Estos resultados plantean la posibilidad de extender los estudios a otros modelos experimentales.

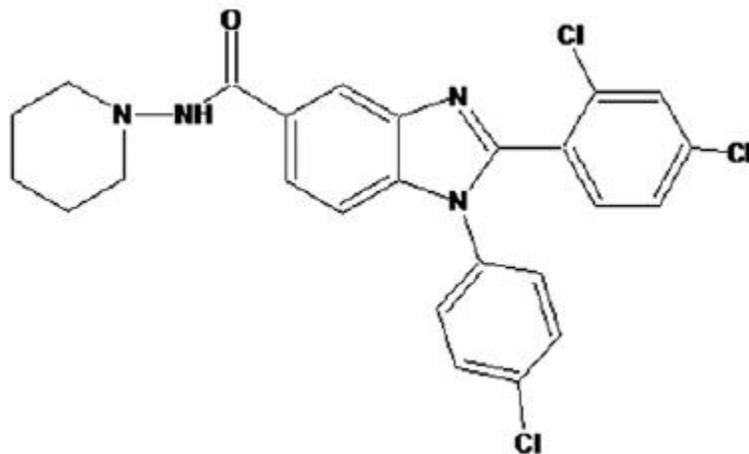


Figura 3. Estructura química del BAR-1
1-(4-cloropfenil)-2-(2,4-dicloropfenil)-N-(1-piperidinil)-1H-benzimidazol-5-carboxamida



JUSTIFICACIÓN

El SM, la obesidad y la DM2 son padecimientos considerados epidemias del siglo XXI particularmente, en América Latina la obesidad ha aumentado a niveles alarmantes, llegando a convertirse en un problema de salud pública en casi todos los países de la región. El sobrepeso y la obesidad son problemas de malnutrición generados por el consumo excesivo de calorías, o por un inadecuado proceso metabólico de los alimentos por parte del organismo (García-Rodríguez *et al.*, 2010). Por ello es necesario crear estrategias diferentes a las convencionales y nuevos mecanismos que ayuden a combatir este mal, como en su momento lo hizo el rimonabant actuando sobre el sistema endocanabinoide, pero sin causar los efectos secundarios vistos con este tratamiento

El estudio preliminar sugiere el uso potencial de BAR-1, como una terapia farmacológica que ayude en el tratamiento del SM, obesidad y DM2, sin embargo, no existen investigaciones *in vivo* que confirmen el efecto terapéutico de este compuesto en modelos animales con estos síndromes.



HIPÓTESIS

Dado que el bloqueador BAR-1 modifica *in vitro* las funciones del islote pancreático, al administrar farmacológicamente en animales con SM inducido, se espera observar mejoras en los parámetros clínicos y posiblemente adaptaciones en la estructura y función del páncreas endocrino.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los efectos de la administración farmacológica del antagonista canabinoide BAR-1 en ratones bajo un modelo simulado de SM

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar los efectos del antagonista canabinoide BAR-1 sobre la función y estructura del islote pancreático
- Analizar los parámetros asociados al SM (peso, triglicéridos, glicemia e insulinemia) en ratones tratados farmacológicamente con BAR-1.
- Comparar las diferencias estructurales del tejido pancreático de ratones sanos, con los ratones con síndrome metabólico inducido y los tratados con BAR-1.



MATERIALES Y MÉTODO.

SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE BAR-1

Este compuesto fue sintetizado y purificado en la Facultad de Farmacia, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo los procedimientos establecidos previamente por el Dr. Gabriel Navarrete (Vilches-Flores *et al.*, 2010).

DIETA Y TRATAMIENTO

Se utilizaron 60 ratones machos, cepa CD-1, de cuatro semanas de edad, proporcionados por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, los cuales fueron separados al azar en 6 grupos. Dos de éstos fueron tratados vía oral con DMSO al 20% como vehículo y una dieta hipercalórica (alta en lípidos y carbohidratos, pellets de alimento embebidos en manteca animal y agua con azúcar al 20%); Otros dos grupos fueron tratados con la misma dieta más la administración oral de BAR-1 (10 mg/kg de peso) y los últimos dos grupos fueron el grupo control sano que fue alimentado *ad libitum* en condiciones de bioterio. de cada dos grupos, uno fue sometido al tratamiento por cuatro semanas y el otro por ocho semanas.

El manejo de desechos y residuos biológico-infeccioso de animales fue dispuesto de acuerdo a las especificaciones de las Comisiones de Ética y Bioseguridad, y del Bioterio, de la FES Iztacala de la UNAM.

PARÁMETROS CLÍNICOS.

Cada semana se registró el peso de los ratones para documentar el crecimiento que estos tenían con respecto al tiempo y la alimentación. Al término de la semana cuatro y ocho se realizó una curva de tolerancia a la glucosa por administración vía oral de azúcar disuelto en agua (2 g/ kg de peso). Se obtuvo una muestra de sangre de cada ratón, a la cual, se le cuantifico la glucosa y triglicéridos mediante un glucómetro One-Touch UltraMini (LifeScan Johnson & Johnson). Se determinó la concentración de triglicéridos en sangre con el monitor sanguíneo Accutrend GCT (Roche) y se tomaron muestras sanguíneas de tres ratones de cada grupo para medir insulina sérica, la cual fue cuantificada por medio de un kit de ELISA, ALPCO.



Al término de los tratamientos, los ratones fueron sacrificados y los grupos experimentales fueron subdivididos para realizar los diferentes experimentos. De cada grupo, a cuatro ratones se les realizó extracción total de páncreas y éste fue fijado en reactivo de Bouin para el análisis histológico. De los 6 ratones restantes se aislaron los islotes pancreáticos para comparar al microscopio su tamaño y morfología.

AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS

Una vez sacrificado el ratón, se inyectaron 3 mL de solución de colagenasa tipo IV, 1mg/mL, a través del conducto biliar-pancreático para la identificación y pre digestión del tejido pancreático. El tejido fue digerido a 37°C durante 10 minutos y los islotes fueron separados con el uso de un gradiente discontinuo de Histopaque-1077. Después los islotes fueron aislados por selección manual para ser observados al microscopio y posteriormente mantenerlos en medio de cultivo DMEM con 5 mM glucosa, suplementado con suero bobino fetal al 10 % y antibióticos al 3%, en una incubadora a 37°C con 5% CO₂ durante 24 horas.

PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DEL PÁNCREAS.

Los páncreas destinados para el análisis histológico fueron fijados con reactivo de Bouin y posteriormente sometidos a una deshidratación gradual, aclaramiento e imbibición, por último, se incluyeron en bloques de parafina para realizar las técnicas histológicas: se realizaron cortes en micrótopo manual marca Leica modelo RM2125 RTS con grosor de 7 a 10 μm para ser colocados y fijados en portaobjetos tratados con poli-L-lisina. Las tinciones de hematoxilina y eosina fueron realizadas por los protocolos establecidos. El tejido fue observado en un microscopio óptico confocal marca Carl Zeiss GmbH donde se fotografiaron y midieron los islotes pancreáticos con ayuda del software ScopelImage 9.0. Una vez medido cada islote, su área fue comparada contra un área preestablecida de 20,000 μm^2 , la cual fue considerada como un 100% para sacar el porcentaje de cobertura de cada tratamiento, a los datos obtenidos se les realizó el análisis ANOVA para verificar si existía diferencias significativas entre sus medias y diferenciar si existían posibles cambios estructurales en el tejido pancreático.



ANÁLISIS DE DATOS

Para determinar diferencias significativas entre las medias de los diferentes tratamientos, todos los resultados obtenidos fueron procesados estadísticamente con ayuda de software estadístico Minitab 16, en el que se realizaron análisis de varianza de uno y dos factores ($\alpha = 0.5$). La prueba de Tukey, se realizó cuando el ANOVA indicaba la existían diferencia significativa entre los resultados de los diferentes tratamientos.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las figuras 4 y 5 se observa el incremento de peso registrado en los ratones durante cuatro y ocho semanas respectivamente. El peso inicial se consideró como el 100 % para calcular el porcentaje de ganancia de peso para las siguientes semanas.

Para los ratones tratados durante cuatro semanas, se observó que el grupo bajo una dieta hipercalórica y el tratado con BAR-1 no presentaban diferencias significativas entre ellos, sin embargo, si cuando se comparaban con el grupo control.

En el caso de los ratones tratados durante ocho semanas se muestra una tendencia similar, sin embargo, el análisis estadístico indica que el grupo sometido a la Dieta hipercalórica no presenta diferencias significativas con el grupo tratado con BAR-1 ni con el grupo control, no obstante, el grupo tratado con BAR-1 presentó diferencias significativas al término de la semana ocho respecto al control.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Duvivier y colaboradores en el 2009, donde se observó que en ratas Zucker tratadas con el agonista rimonabant la ganancia de peso era menor respecto al grupo control. Starowicz y colaboradores en el 2008 obtuvieron resultados similares, observando el aumento significativo de peso en ratones alimentados con una dieta alta en grasa. Es importante señalar que los ratones utilizados en el presente estudio aún se encontraban en periodo de crecimiento y quizá esa es la causa de que no se apreciarán los cambios esperados en el control de peso.

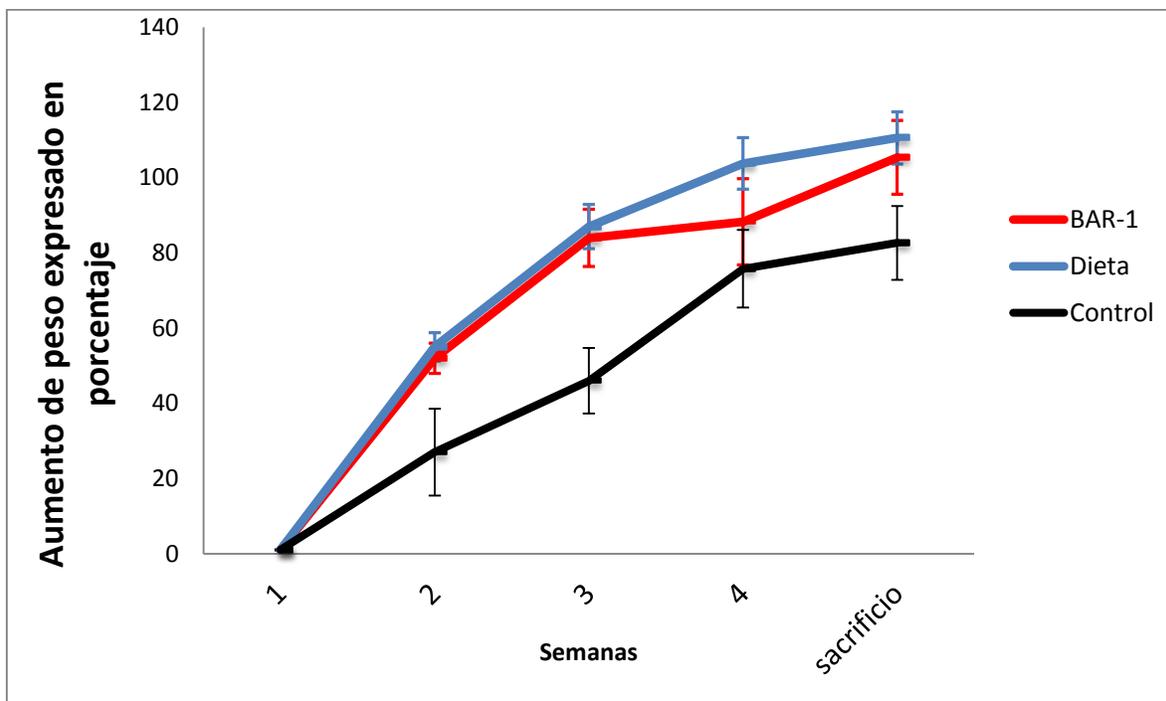


Figura 4: Incremento de peso en ratones tratados crónicamente con BAR-1 durante cuatro semanas (n=10.) Los datos son expresados en promedio con error estándar.

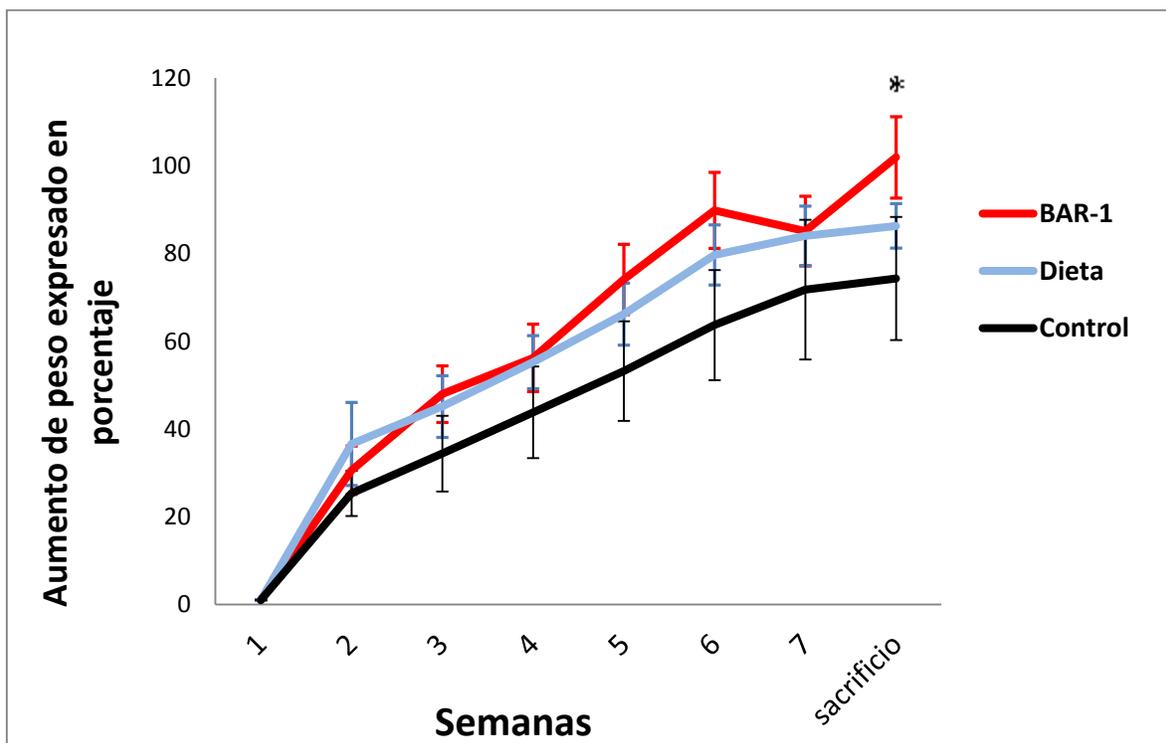


Figura 5: Incremento de peso en ratones tratados crónicamente con BAR-1 durante ocho semanas (n=10 *P < 0.05 en comparación al control). Los datos son expresados en promedio con error estándar.



En las figuras 6 y 7 se observan los niveles de triglicéridos en sangre de cada grupo experimental tratados durante cuatro y ocho semanas. Como puede observarse, los ratones tratados durante cuatro semanas no presentan diferencias entre los niveles de triglicéridos en sangre.

Por otra parte, los resultados de la ANOVA realizada para los ratones tratados durante ocho semanas demostraron la existencia de diferencias significativas entre los grupos, donde el grupo tratado con BAR-1 presentó diferencias significativas respecto al control; sin embargo, no las presento con el grupo alimentado con la dieta hipercalórica.

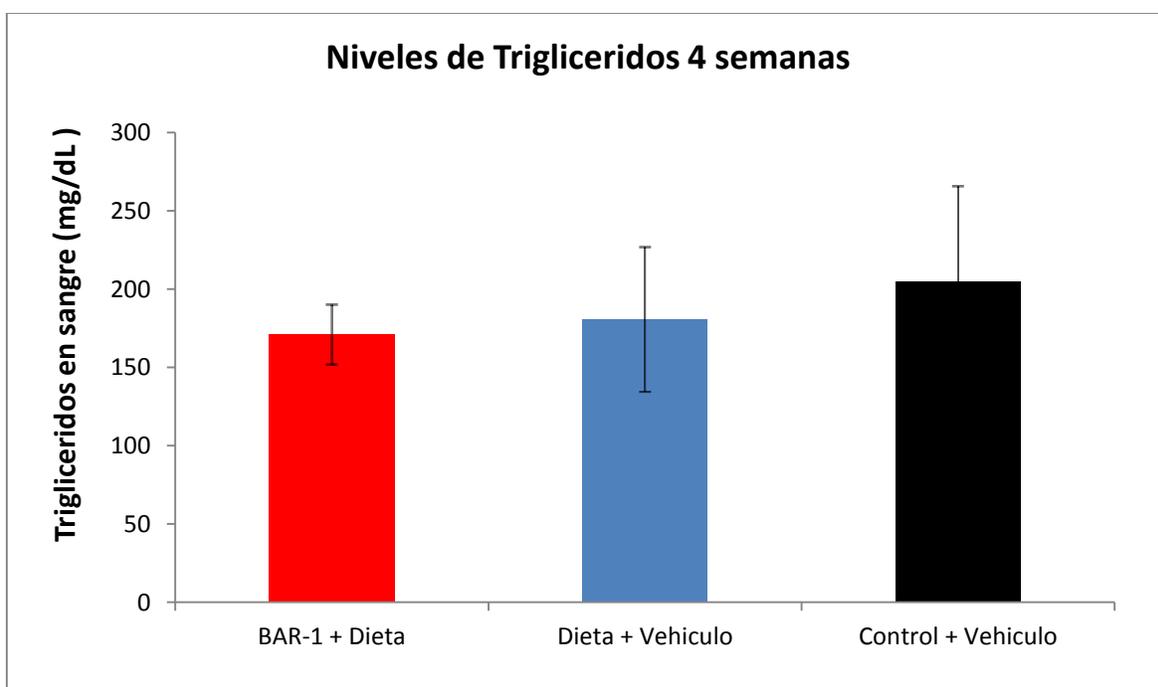


Figura 6: Niveles de triglicéridos en sangre de ratones tratados durante cuatro semanas con BAR-1 (n=3). Los datos son expresados en promedio con error estándar.

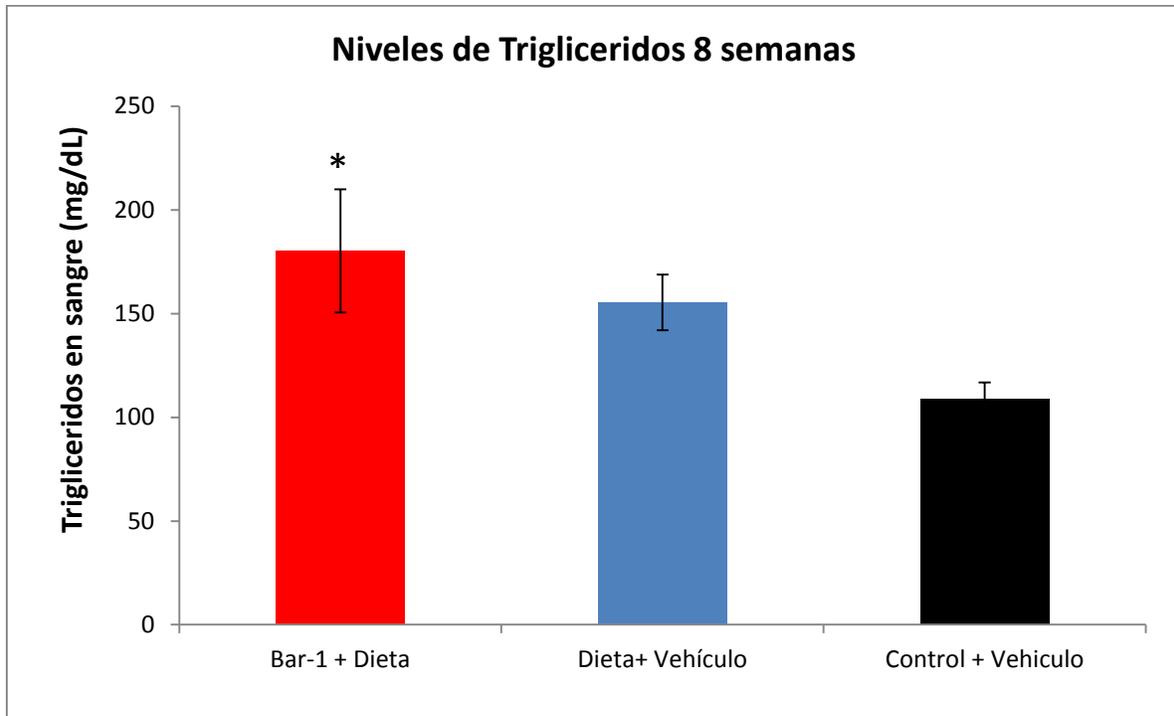


Figura 7: Niveles de triglicéridos en sangre de ratone tratados durante ocho semanas con BAR-1 (n=3 *P < 0.05 en comparación al control). Los datos son expresados en promedio con error estándar.

En la figura 8 se observa la curva de tolerancia a la glucosa de los ratones tratados por cuatro semanas, en el grupo con BAR-1 se observa una elevación significativa de la glucosa con respecto al control al minuto 60, esto nos indica un posible retraso en la secreción de insulina, ya que en el minuto 90 los niveles de glucosa se igualan con los otros dos grupos.

En la figura 9, se observa que los ratones tratados por ocho semanas con dieta hipercalórica tuvieron una alteración en la fase sostenida de la curva glucosa (minuto 60) por lo que se puede sugerir un problema en la secreción de insulina; en el caso del grupo BAR-1 también se observa un incremento acelerado de glucosa en sangre al minuto 30.

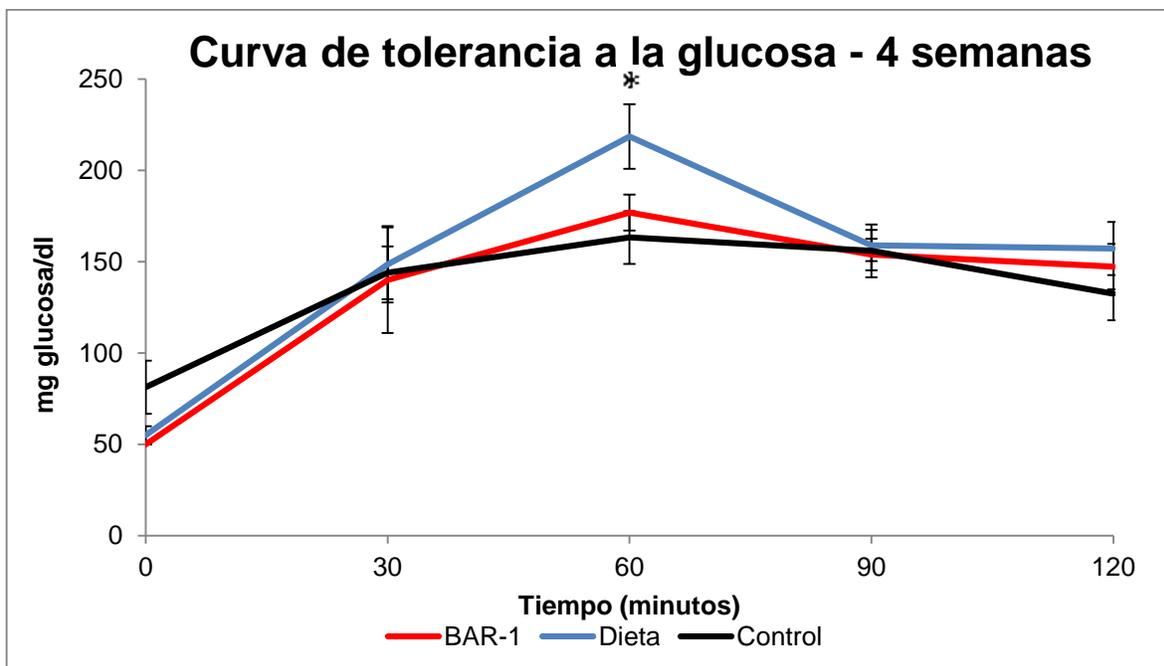


Figura 8: Curva de tolerancia a la glucosa de ratones tratados con BAR-1 durante cuatro semanas (n= 3 *P < 0.05 en comparación al control). Los datos son expresados en promedio con desviación estándar.

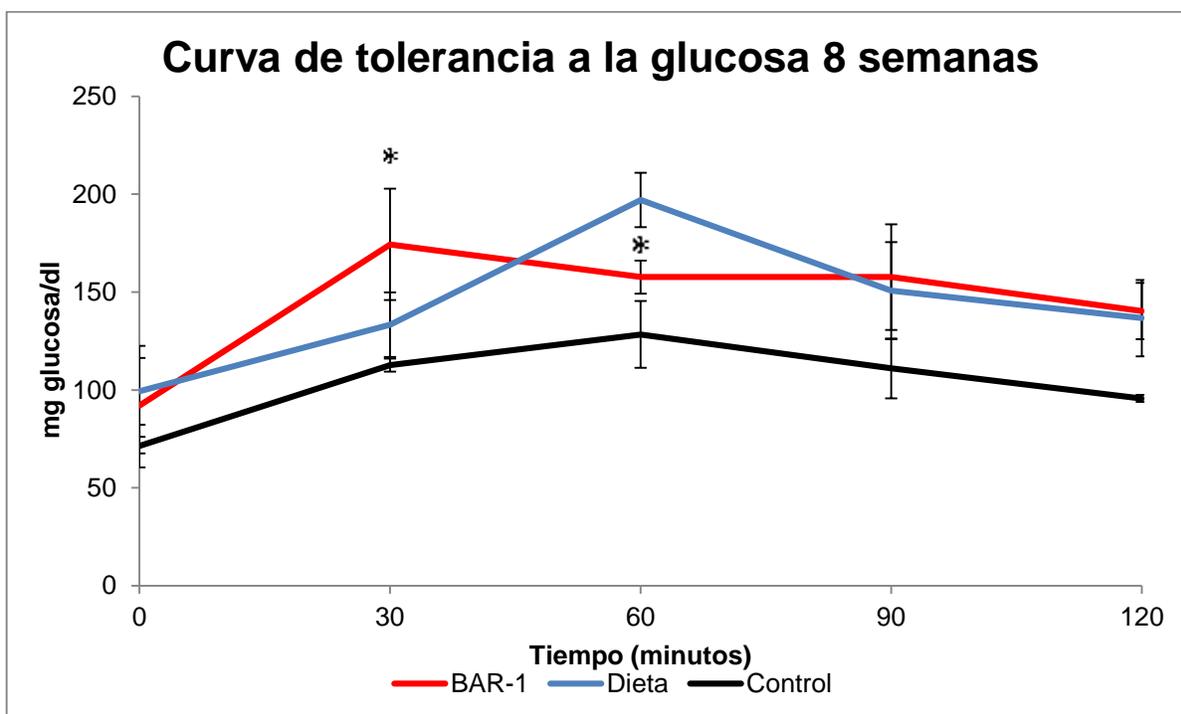


Figura 9: Curva de tolerancia a la glucosa de ratones tratados con BAR-1 durante ocho semanas (n= 3 *P < 0.05 en comparación al control) Los datos son expresados en promedio con desviación estándar.



En la figura 10 se observan los valores obtenidos al calcular el índice HOMA (homoeostasis model assessment). después de ocho semanas de tratamiento, considerando el valor de glucosa inicial con la cantidad de insulina en suero. Se puede observar que el tratamiento con BAR-1 presenta la tendencia a disminuir los valores de este índice, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas durante el análisis estadístico.

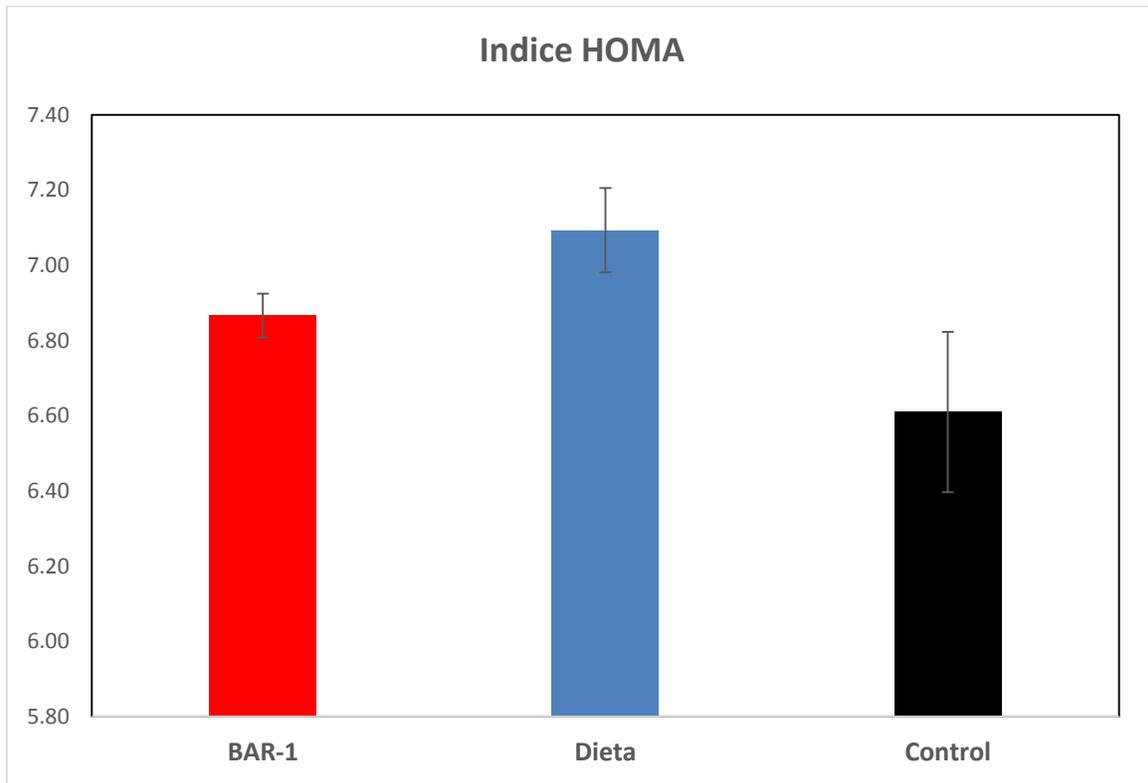


Figura 10: Índice HOMA de ratones tratados farmacológicamente con BAR-1 (n= 3. P < 0.05). Los datos son expresados en promedio con desviación estándar.

El sistema endocanabinoide tiene relación directa con el metabolismo de ácidos grasos y glucosa, actuando principalmente en los receptores presentes en el cerebro, sin embargo, también se ha demostrado interacciones en el tejido adiposo, músculo, hígado y páncreas endocrino (Bermúdez-Silva *et al.*, 2009a). La unión de agonistas con los receptores



CB1 o su inhibición parcial activa cadenas de señalización que juegan un papel importante en la regulación de los ácidos grasos y la glucosa (Nogueiras *et al.*, 2009).

Vilches-Flores y col. en 2010, realizaron un estudio *in vitro* para evaluar el efecto que tiene BAR-1 (análogo del antagonista rimonabant) sobre los receptores CB1 presentes en islotes pancreáticos, demostrando que BAR-1 tiene efectos antagonistas sobre CB1, sin embargo, en el presente trabajo, no se observaron diferencias significativas respecto al aumento o disminución de peso entre los grupos BAR-1 y Dieta; por otra parte, estos dos grupos son diferentes que el control, por lo tanto, es posible que el efecto de BAR-1 sea parcial sobre los receptores de CB1 del organismo.

El aumento de peso en los ratones tratados con BAR-1 se puede deber a una acumulación indirecta de ácido araquidónico, elemento precursor de 2-AG y anandamida. Al tener un aumento de estos, se propicia la conversión de preadipocitos a células adiposas para el almacenaje de los ácidos grasos, los cuales estaban presentes en la dieta hipercalórica aplicada a los tratamientos. Al aumentar la concentración de adipocitos en el organismo, se debería de sintetizar una mayor cantidad de leptina, la cual controlaría el apetito. Sin embargo, las figuras 4 y 5, no demuestran un control en la ingesta de alimento en el grupo Dieta y BAR-1, lo que nos puede indicar que la unión de BAR-1, se hace como antagonista parcial, en los receptores CB1 y esto modifica la concentración de leptina (Cavuto y Wittert, 2009; Di Marzo *et al.*, 2001). Por lo cual, para proyectos futuros es recomendable hacer una cuantificación de leptina y analizar la fisiología del tejido adiposo, para elucidar si los niveles de esta proteína se modifican cuando los ratones son tratados farmacológicamente con BAR-1.

Por otro lado, el receptor CB1 está ligado a proteínas G, las cuales están relacionadas directamente con la ruta de adenilato ciclasa. Posiblemente, al unirse el BAR-1 con el receptor CB1 se inhibe la reacción de la adenilato ciclasa, causando la disminución de AMPc, esta disminución afecta la síntesis de proteína cinasa A, la cual está directamente relacionada con la activación de las lipasas por fosforilación que actúan en la lipólisis. Al no haber lipólisis y al aumentar la adipogénesis, el almacenamiento de ácidos grasos aumentará con la dieta hipercalórica (Bermúdez-Silva *et al.*, 2009 b). Sería interesante para



futuras investigaciones determinar el efecto de antagonistas canabinoides sobre tejido adiposo periférico.

El aumento de los triglicéridos, puede deberse al bloqueo parcial del CB1 por parte de BAR-1. Al tener una cantidad mayor de adipocitos, aumentará la actividad de la lipoproteína lipasa, lo que aumenta el flujo de ácidos grasos libres para la síntesis de triglicéridos (Sánchez, 2006). Por otro lado, Cavuoto y Wittert (2009), mencionan que al inhibir el receptor CB1 con un antagonista, aumentará la adsorción de glucosa, y una reducción de la ingesta calórica en la dieta, disminuyendo la masa corporal, lo cual no concuerda con lo reportado; ya que no hay diferencia significativa al final de las curvas de tolerancia a la glucosa. Di Marzo *et al.* (2008) mencionan que los agonistas endocannabinoides reducen la liberación de insulina de las células β , lo que deja disponible gran parte de la glucosa que es ingerida; los adipocitos utilizan esta glucosa para la biosíntesis de *novo* de triglicéridos, cuando se bloquea el receptor CB-1 con BAR-1, se esperaría que la liberación de insulina fuera mayor y no se presentara el almacenamiento de esta energía en los adipocitos generando la biosíntesis de triglicéridos, sin embargo, nuestros resultados sugieren que BAR-1 no funciona como un antagonista completo, si no de forma parcial.

En la figura 11, se muestran los grupos experimentales del presente estudio. En la parte superior de la imagen, se observan individuos de cada tratamiento y en la parte inferior se pueden observar los islotes aislado de cada grupo vistos desde un microscopio óptico con un aumento de 40 X. Se observa diferencias en la forma de los islotes de cada grupo experimental, siendo el de la dieta el que muestra mayor irregularidad en la superficie mientras que el grupo tratado con BAR-1 se observan de mayor tamaño y con una cápsula bien definida.

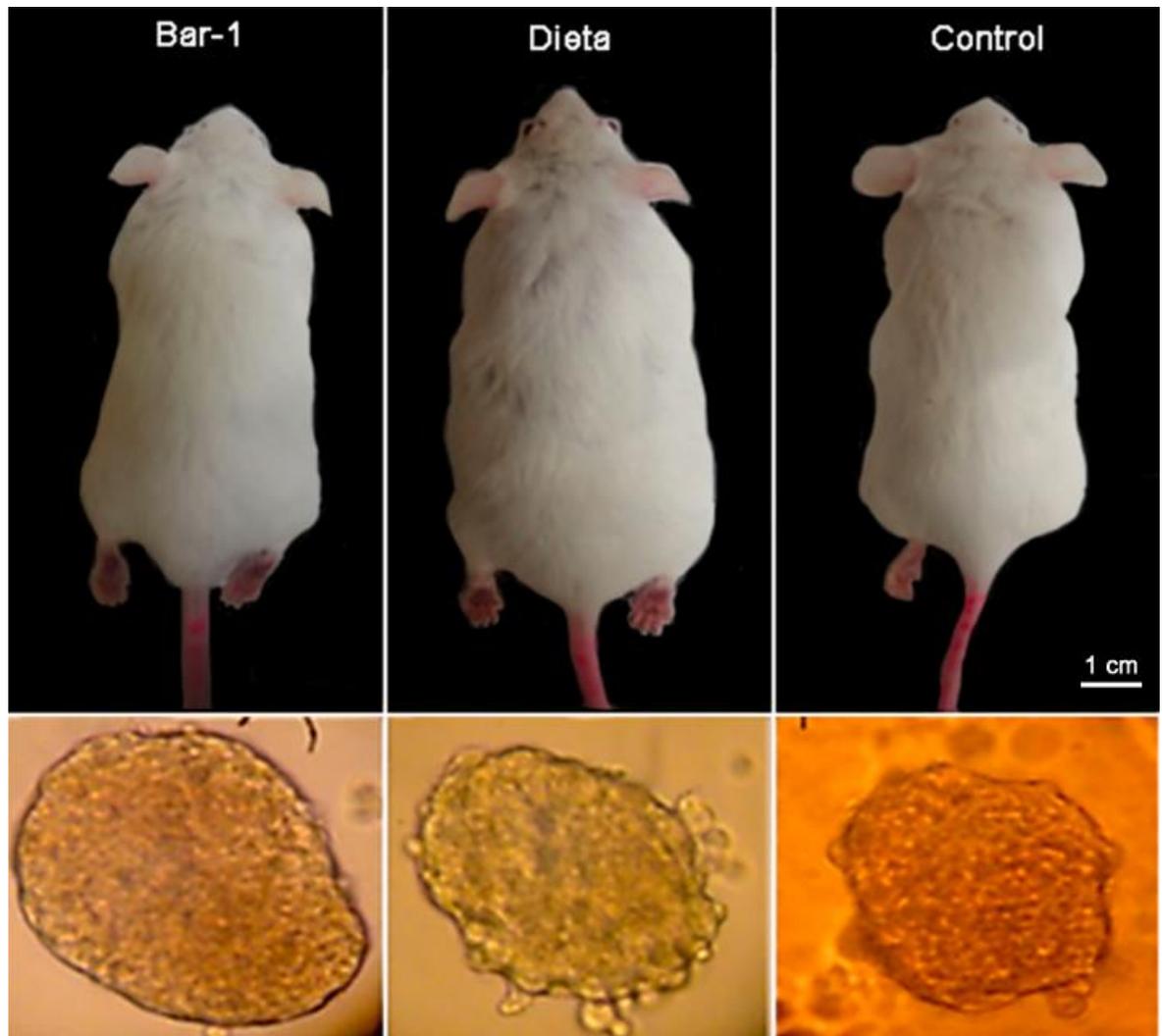


Figura 11: Comparación morfológica de los grupos experimentales e islotes

Estos resultados se pueden comparar a los obtenidos por Duvivier en el 2009, quien observó que los islotes de ratas Zucker obesas eran más grandes y con una estructura desorganizada, caracterizados principalmente por límites irregulares e infiltraciones de colágeno dentro de los islotes, en contraste, estas mismas ratas obesas tratadas con rimonabant presentaban una forma redonda y con menor número de infiltraciones. Por lo anterior, estas observaciones podrían sugerir que el BAR-1 podrían tener las mismas cualidades del rimonabant de reducir la degradación de los islotes. Para confirmar dichas observaciones preliminares, se realizaron cortes histológicos para observar la estructura y organización de los islotes pancreáticos.

En las figuras de la 12 a la 17 se observan cortes histológicos de 7 μm de grosor de los páncreas de ratón de los tres grupos experimentales con los tratamientos a cuatro y ocho semanas. La tinción de hematoxilina y eosina tiñe en tonos azul y púrpura las estructuras ácidas, como por ejemplo los núcleos celulares y tejido acinar mientras que los componentes básicos como el citoplasma y los islotes se tiñen en tonos de color rosado.

Una vez teñidos los cortes fueron observados y fotografiados en un microscopio óptico confocal, cuando los islotes fueron identificados, se delimitó su perímetro y se calculó el área y porcentaje de distribución del islote respecto a un área determinada.

Cortes histológicos de páncreas teñidos con Hematoxilina y Eosina

4 Semanas

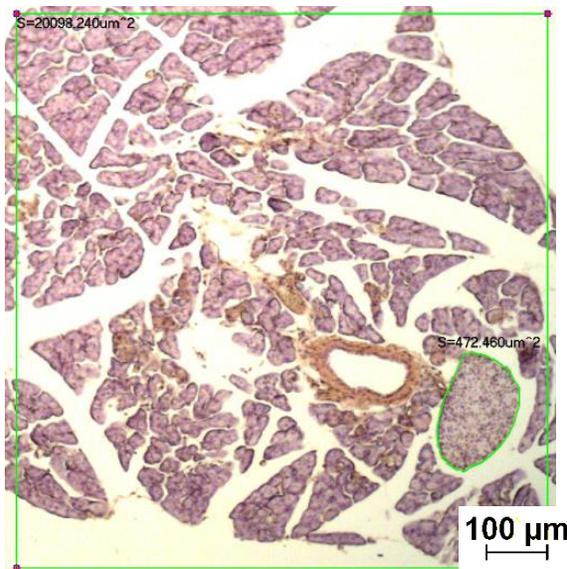


Figura 12: Islote de ratón tratado con BAR-1 durante cuatro semanas.

8 Semanas

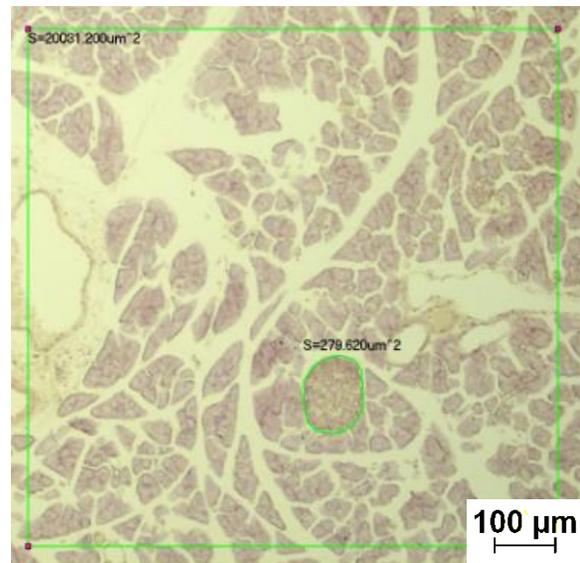


Figura 13: Islote de ratón tratado con BAR-1 durante ocho semanas.

Cortes histológicos de páncreas teñidos con Hematoxilina y Eosina

4 Semanas

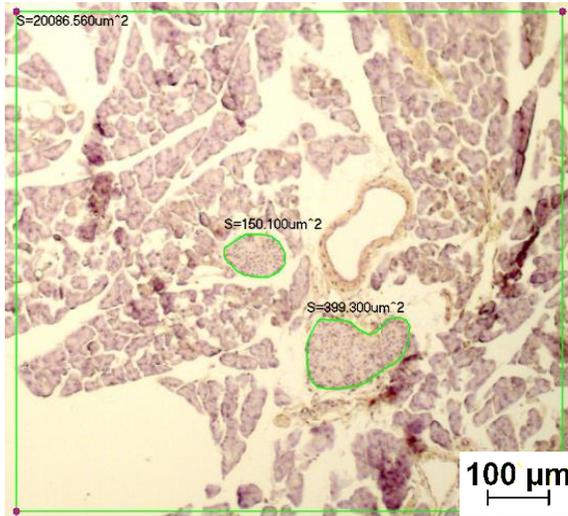


Figura 14: Islotes de ratón del grupo Dieta hipercalórica. Cuatro semanas.

8 Semanas

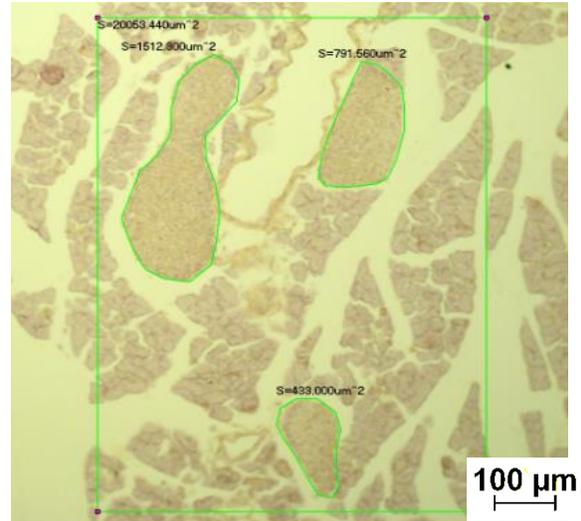


Figura 15: Islotes de ratón del grupo Dieta. Ocho semanas.

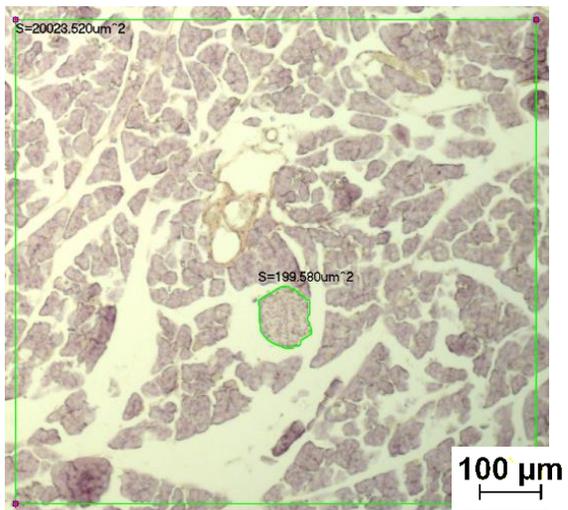


Figura 16: Islote de ratón del grupo Control. Cuatro semanas.

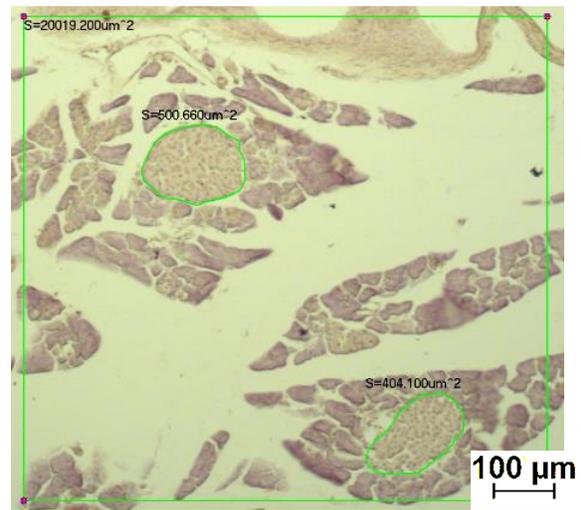


Figura 17: Islotes de ratón del grupo Control. Ocho semanas



En la figura 18 se observan los porcentajes de cobertura de los islotes de los tres grupos experimentales cuando fueron tratados durante cuatro y ocho semanas.

Se observa que aparentemente a medida que aumenta el periodo de tratamiento la cobertura del islote tiende a ser mayor, sin embargo, esta diferencia se pudo haber presentado debido a la edad de los ratones, a medida que los ratones crecían, también los islotes del páncreas lo hacían. Cabe señalar que, en estudios paralelos al presente, al momento de realizar el aislamiento de islotes pancreáticos se puede observar una alta variabilidad de tamaño de los islotes del páncreas esto sin importar que los ratones sean del grupo control o de los tratados con BAR-1.

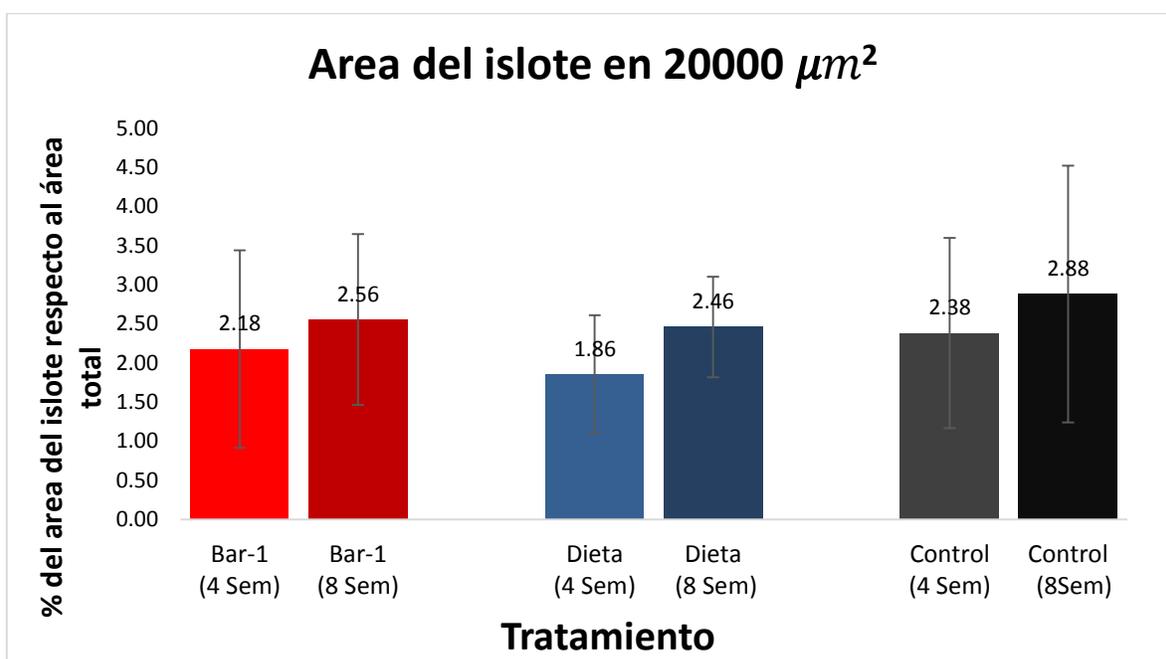


Figura 18: Porcentaje de cobertura del islote en $20000 \mu m^2$; Ratones tratados con BAR-1 durante cuatro y ocho semanas. Los datos son expresados en promedio con desviación estándar (n=5).



En las figuras de la 12 a 17 se muestran fotografías representativas de cada grupo. Al igual que en los islotes vistos directamente en el microscopio tras el aislamiento (figura 11), se puede observar una tendencia en el tejido pancreático de los ratones del grupo Dieta (figura 14 y 15) a tener un mayor número y volumen de islotes, estos se encontraban con superficie irregular y en algunos casos parecía que estos se encontraban degradados o en mal estado similares a los islotes observados por Starowicz en el 2008 y Duvivier en el 2009 en modelos murinos alimentados con dietas ricas en lípidos y carbohidratos. Por otra parte, los ratones que fueron tratados con BAR-1 (figura 12 y 13) presentaban una forma redonda con bordes definidos y con menor número de infiltraciones. Esta tendencia sugiere que el tratamiento con BAR-1 podría tener un efecto que previene la hiperplasia y degradación del islote semejante al que observó Duvivier en el 2009 quien obtuvo los mismos resultados en los islotes de ratas Zucker tratadas con rimonabant.

En nuestro modelo hay que considerar la edad de los ratones con las que se hizo el presente estudio; ya que los animales aún están en una etapa de crecimiento y quizá esto fue determinante para que los efectos esperados no fueran visualizados de manera contundente. Por otro lado, es posible que la solución de sacarosa administrada *ad libitum* de los grupos con dieta hipercalórica haya sido suficiente para satisfacer la demanda energética de los ratones, ya que se observó que la ingesta de pellets con grasa era aparentemente menor a los del grupo control. A pesar de que no se observó diferencia en la longitud cefalocaudal, se apreciaba un mayor tamaño hacia los costados en los ratones con la dieta hipercalórica. Otro punto a considerar es la dosis del tratamiento administrado, 10 mg/kg de peso; ya que el bloqueo de los receptores parece estar asociado a la dosis del tratamiento, como lo observo Van Gaal en el 2005 donde probó dos diferentes dosis de rimonabant en sus grupos experimentales, teniendo mejores resultados en el control de peso y parámetros clínicos de los grupos donde se administró el tratamiento con mayor concentración.

Por todo lo anterior se puede definir al SEC como uno de los principales blancos de estudio para el tratamiento de la obesidad, síndrome metabólico y obesidad, debido a la participación de sus componentes tanto en la ingesta de alimentos como en el control,



almacenamiento y gasto energético a nivel central y periférico. La posibilidad de encontrar antagonistas del SEC o de modular sus efectos es una alternativa para el tratamiento de la obesidad. Sin embargo, debido a la amplia distribución y funciones del receptor CB1 de endocannabinoides, la probabilidad de efectos adversos es elevada, lo que dificulta la obtención de un fármaco clínicamente relevante. El diseño de fármacos antagonistas del receptor CB1 que no atraviesen la barrera hematoencefálica parece ser un buen punto de partida para la obtención de nuevos fármacos destinados a la modulación del SEC, debido a las acciones que presentan sobre el mejoramiento en la sensibilidad a la insulina, disminución de la acumulación grasa y otros efectos metabólicos positivos a nivel periférico, evidencia prometedora para apoyar el bloqueo de los receptores CB1 periférico como un objetivo viable para el tratamiento del SM y otras patologías asociadas.



CONCLUSIONES

1. La administración farmacológica de BAR-1, no induce cambios significativos en los parámetros asociados al desarrollo de SM determinados en nuestro modelo experimental. Debido a la interacción sistémica y a los cambios adaptativos que ocurren, no se pueden descartar efectos discretos en diferentes órganos y tejidos. Sin embargo, los resultados sugieren un efecto directo sobre la estructura del islote pancreático.
2. BAR-1 como un antagonista parcial de los receptores de CB1 presenta pocos efectos preventivos sobre la hiperplasia y degradación del islote, sin que estos tengan repercusión en el control de peso de los ratones
3. Los resultados sugieren que el compuesto sintético BAR-1 podría presentar efectos extra-pancreáticos y aportan información al escaso conocimiento respecto al sistema endocanabinoide en el islote pancreático, sin embargo, la actividad del SEC en los islotes pancreáticos se encuentra asociada a múltiples variables, sin que se alterare su integridad histológica y fisiológica.



REFERENCIAS

- American Diabetes Association (ADA). 2016. Standards of Medical Care in Diabetes—2016 Abridged for Primary Care Providers. *Clinical Diabetes Journals*. 34 (1) 3-21
- Álvarez-Hernandez J. 2010. Síndrome metabólico. *Nutrición Hospitalaria Suplementos*. 3(1): 3-13
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. 2006. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*. 27(1):1-4
- Bermudez-Silva F, Sanchez-Vera I, Suárez J, Serrano A, Fuentes E, Juan-Pico P, Nadal A, Rodríguez de Fonseca F. 2007. Role of cannabinoid CB2 receptors in glucose homeostasis in rats. *European Journal of Pharmacology*. 565: 207–211.
- Bermúdez-Silva F, McPartland J, Rodríguez F, Paz V. 2009a. El sistema endocannabinoide, homeostasis energética y obesidad: ¿el final o un nuevo comienzo? *Revista Española de Obesidad*. 7(6): 342-359.
- Bermúdez-Silva F, Suárez J, Nadal A, Rodríguez F. 2009b. The role of the pancreatic endocannabinoid system in glucose metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 23: 87-102.
- Brandan N, Llanos I, Miño C, Rodríguez A. 2011. Hormonas pancreáticas. *Cátedra de Bioquímica Edición 2011*. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes Argentina.
- Briceño S, Silva E. 2007. Insulina, hipertensión y diabetes. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*. 2 (2): 65-69
- Cavuto P, Wittert G. 2009. The role the endocannabinoid system in the regulation of energy expenditure. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 23: 79-86.
- Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubertn M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortman S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst A, Pasquali R, Lutz B, Stalla G, Pagotto U. 2003. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 112 (3): 424-431



- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis. 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature Reviews Drug Discovery*. 3: 771-84.
- Duvivier V, Delafoy-Plasse L, Delion V, Lechevalier P, Le B, Guillot E, Pruniaux M, Galzin A. 2009. Beneficial effect of a chronic treatment with rimonabant on pancreatic function and beta-cell morphology in Zucker Fatty rats. *European Journal of Pharmacology*. 616: 314-320.
- García-Rodríguez J, García-Fariñas A, Rodríguez-León G, Gálvez-González A. 2010. Dimensión económica del sobrepeso y la obesidad como problemas de salud pública. *Salud en Tabasco*. 16 (1): 891-896
- Gomez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo J, Bilbao A, Del Arco I, Cippitelli A, Nava F, Piomelli D, Rodriguez F. 2002. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *Journal of Neuroscience*. 22: 9612 – 9617.
- Getty-Kaushik L, Richard A, Deeney J, Krawczyk S, Shirihai O, Corkey B. 2009. The CB1 antagonist rimonabant decreases insulin hypersecretion in rat pancreatic islets. *Obesity*. 17(10): 1856-1860.
- Grotenhermen F. 2006. Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids*. 1(1):10-14
- Hee J, Min J, Suk H, Sung-Han L, Myung E, Mi-Soon K, Kwangwoo A, Jeongmin K, Jinhwa L. 2010. Synthesis and structure– activity relationship of 1,2,4-triazole-containing diarylpyrazolyl carboxamide as CB1cannabinoid receptor–ligand. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18: 1149-1162.
- Hillard C. 2000. Endocannabinoids and vascular function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 294: 27-32.
- Hollenbeck C, Reaven G. 1987. Variations in insulin-stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 64: 1169–1173
- Kahn C. 1986. Insulin resistance a common feature of diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*. 315:252–254.



- Kim H, Toyofuku Y, Lynn F, Chak E, Uchida T., Mizukami H. 2010. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Journal of Natural Medicines* ; 16 (7): 804-808.
- Li C, Bowe J, Huang G, Amiel S, Jones P, Persaud S. 2011. Cannabinoid receptor agonists and antagonists stimulate insulin secretion from isolated human islets of Langerhans. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 13(10): 903-10.
- Li C, Bowe J, Jones P, Persaud S. 2010. Expression and function of cannabinoid receptors in mouse islets. *Islets* 2(5): 293-302.
- Li C, Jones M, Persaud J. 2011. Role of the endocannabinoid system in food intake, energy homeostasis and regulation of the endocrine pancreas. *Pharmacology and Therapeutics*. 129(3): 307–20.
- Lizarzaburu J. 2013. Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. *Anales de la Facultad de Medicina*. 74(4) 315-20
- López-Jaramillo P, Pradilla L, Bracho Y, Silva F. 2005. El sistema endocanabinoide y su relación con la obesidad abdominal y el síndrome metabólico: implicaciones terapéuticas. *Revista Colombiana de Cardiología*. 12 (3): 113-121
- Lumbreras N. 2012. Síntesis y preformulación de derivados del 1, 5-diarilpirazol como posibles agentes para el tratamiento del síndrome metabólico. Tesis Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química. UNAM. México. 112 p
- McLaughlin P. 2012. Reports of the death of CB1 antagonists have been greatly exaggerated: recent preclinical findings predict improved safety in the treatment of obesity. *Behavioural Pharmacology*. 23(5&6): 537-50
- Narayan K, Boyle J, Thompson T, Sorensen S, Williamson D. 2003. Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. *Journal of the American Medical Association*. 290:1884–1890.
- Netzahualcoyotzi-Piedra C, Muñoz-Arenas G, Martínez-García I, Florán-Garduño B, Limón-Pérez I. 2009. La marihuana y el sistema endocanabinoide: De sus efectos recreativos a la terapéutica. *Revista Biomedica*. 20:128-153.



- Nogueiras R, Diaz-Arteaga A, Lockie S, Velásquez D, Tschop J, López M, Cadwell C, Diéguez C, Tschöp M. 2009. The endocannabinoid system: Role in glucosa and energy metabolism. *Pharmacological Research*. 60: 93-98.
- Pretkin M, Nolan C. 2006. Islet β cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*. 116 (7): 1802-1812
- Sánchez B. 2006. Vías de señalización que participan en la regulación de la lipólisis en adipocitos. *Revista de Educación Bioquímica*. 25 (3). 80-84.
- Scheen A, Finer N, Hollander P, Jensen M, Van Gaal L. 2006. Efficient and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomized controlled study. *Lancet* 368: 1660-1672
- Scheen A. 2007. Cannabinoid-1 receptor antagonists in type-2 diabetes, *Best Practice and Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 21, 535-553.
- Starowicz K, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izzo A, Di Marzo V. 2008, Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity* 16(3): 553–65.
- Osei-Hyiaman D, De Petriello M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertaler L, Wang L, Kunos G. 2005. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *Journal of Clinical Investigation*. 115, 1298–1305.
- Tucci S. 2008. Grelina en regulación del apetito y papel en obesidad y trastornos alimentarios: Abordajes terapéuticos. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. 6 (2). 15-23.
- Van Gaal L, Rissanen A, Scheen A, Ziegler O, Rossner S. 2005. RIO- Europe Study Group. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 365, 1389–1397.
- Vilches-Flores A, Delgado-Buenrostro N, Navarrete-Vázquez G, Villalobos-Molina R. 2010. CB1 cannabinoid receptor expression is regulated by glucose and feeding in rat pancreatic islets. *Regulatory Peptides*. 163: 81–87.



Vilches-Flores A, Hauge-Evans A, Jones P, Persaud S. 2013. Chronic activation of cannabinoid receptors in vitro does not compromise mouse islet function. *Clinical Science (London)*. 124(7): 467-478.

Vilches-Flores A, Franklin Z, Hauge-Evans A, Liu B, Huang G, Choudhary P, Jones P, Persaud S. 2016. Prolonged activation of human islet cannabinoid receptors induces adaptation but not dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta Clinical*. 5: 143-50.