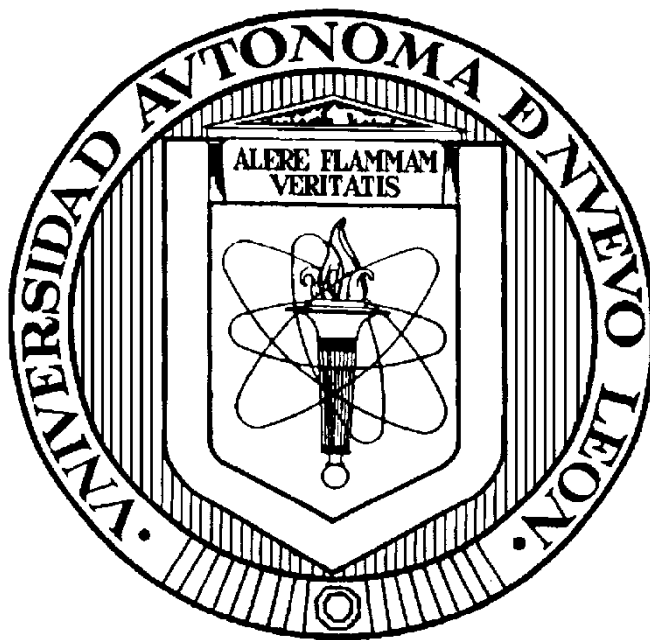


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO DEL CBD EN CÉLULAS DE TIPO DOPAMINÉRGICO Y EN ÓRGANOS
IMPLICADOS EN SU METABOLISMO**

POR

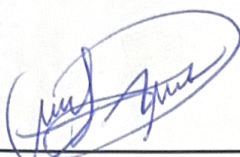
DANIELA RODRÍGUEZ CASIR

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

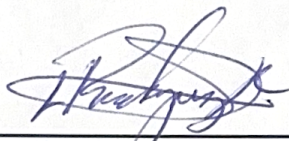
Agosto, 2025

**EFFECTO DEL CBD EN CÉLULAS DE TIPO DOPAMINÉRGICO Y EN ÓRGANOS
IMPLICADOS EN SU METABOLISMO**

Aprobación de la tesis:



Dra. C. Aracely García García
Director de Tesis



Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha
Codirector de Tesis



Dra. C. Sheila A. Villa Cedillo
Comisión de Tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no habría sido posible sin el apoyo, la guía y el cariño de muchas personas a lo largo de este proceso.

A la Dra. Aracely, gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de este gran equipo. Gracias por sus palabras de aliento, su paciencia infinita y sus valiosas enseñanzas, por impulsarme siempre a pensar más allá. Al Dr. Humberto, por guiarme con firmeza y claridad, y por todo el conocimiento compartido a lo largo de este camino.

A mis maestros y miembros de la comisión, por su apoyo y asesoría durante estos dos años.

A mis amigos de la maestría. Juan Carlos, gracias por siempre estar, por tus palabras, tus abrazos y tu presencia constante.

A mis compañeros del laboratorio. Paulina, gracias por ser esa luz en medio del caos, por compartir la carga, por tus consejos y tu presencia. Diego, gracias por ser el gran maestro que fuiste, por tu paciencia, tu tiempo, y por ser un buen amigo. Esto no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

A mi mejor amiga, Ana Karen. Gracias por recordarme quién soy cuando más lo necesitaba y no dejarme caer, por escucharme con paciencia, sin juzgar ni pedir nada a cambio, por estar ahí en cada paso y por simplemente ser tú. Tu amistad me ha enseñado que los lazos verdaderos trascienden las circunstancias, el tiempo y la distancia.

A mi bolita de forzados: mi Mau, Caty, Mauro, Pato, Chapa, Néstor y Justin. Gracias por convertirse en familia, por acompañarme con apoyo y cariño sincero, por sus consejos y porras, por las risas, las desveladas y las charlas interminables, por recordarme con sus palabras y presencia que nunca estoy sola, y por hacerme ver siempre que la vida se vive mejor acompañada de personas como ustedes. No podría haber hecho este camino sin ustedes.

A mi familia, que aunque lejos, siempre ha estado cerca en cariño y orgullo; gracias por celebrar cada paso conmigo, incluso en la distancia.

Y, el más importante de todos... A las personas que son mi raíz y mi fuerza: mis papás, Yazmín y Juan Manuel. Mamá, gracias por siempre tomar mi mano cuando los momentos eran difíciles, por enseñarme a mirar siempre hacia adelante sin perder el rumbo, por ser mi auxilio cuando corría a ti, por acompañarme los fines de semana, aunque fuera por llamada, solo para que nunca me sintiera sola, y por presumirme con orgullo, incluso cuando no entendías del todo lo que hacía. Papá, gracias por sentarte en la mesa conmigo incluso cuando estaba muy cansada para platicar, por siempre tener las palabras correctas, por llenarme de fuerza con cada abrazo, por hacerme sentir capaz de lograrlo todo y por siempre hacerme sentir que estabas ahí para mí. A mi hermano mayor Jorge, eres el regalo más bonito y sincero que la vida me ha dado, tenerte en mi vida es una de mis mayores suertes. A mi compañera de vida, mi mejor amiga, mi motivo, mi lugar seguro, mi todo, Vale: eres mi más grande inspiración. Espero algún día llegar a ser, aunque sea un poco, de la increíble mujer que eres. Hoy soy lo que soy porque mi mejor parte eres tú.

Nunca existirá un amor más grande que el que siento por ustedes.

Esto es por y para ustedes. Los amo hoy, mañana y en todas mis vidas.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
3. JUSTTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo general	15
5.2 Objetivos específicos	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1 Estrategia general	16
6.2 Modelo <i>in vitro</i>	16
6.2.1 Análisis del estrés oxidativo	17
6.2.1.1 Detección de especies reactivas de oxígeno	17
6.2.2 Análisis de la muerte celular	17
6.2.2.1 Evaluación de la función mitocondrial	18
6.2.2.2 Análisis de la viabilidad celular	18
6.3 Modelo <i>in vivo</i>	19
6.3.1 Evaluación del peso corporal y la sobrevivencia	19
6.3.2 Evaluación de la función motora y cognitiva	20
6.3.2.1 Prueba de la madriguera	20
6.3.2.2 Prueba de la construcción del nido	21
6.3.2.3 Prueba de la marcha	21
6.3.2.4 Prueba de campo abierto	22
6.3.2.5 Prueba de transición luz / oscuridad.....	23
6.3.3 Evaluación del efecto histopatológico	24

Capítulo	Página
6.3.3.1 Técnica histológica	24
6.3.3.2 Tinción de Hemtoxilina & Eosina	25
6.3.3.3 Tinción de Ácido Peryódico de Schiff (PAS)	25
6.3.3.4 Tinción Tricrómico de Masson	26
6.3.3.5 Tinción Violeta de cresilo	27
6.3.3.6 Inmunofluorescencia	28
6.3.4 Análisis morfométricos	29
7. RESULTADOS	31
7.1 Modelo <i>in vitro</i>	31
7.1.1 El CBD disminuye el estrés oxidativo citoplasmático inducido por PQ.	31
7.1.2 El CBD no previene la muerte celular inducida por PQ	35
7.2 Modelo <i>in vivo</i>	37
7.2.1 Evaluación del peso corporal y la supervivencia	37
7.2.2 Evaluación de la función motora y cognitiva	38
7.2.2.1 El CBD no afecta el bienestar general	38
7.2.2.2 La administración oral de CBD no causa deterioro cognitivo	39
7.2.2.3 La administración oral de CBD no causa disfunción motora	40
7.2.2.4 La exposición oral crónica de CBD no afecta el comportamiento exploratorio y disminuye el comportamiento tipo ansioso	41
7.2.3 Evaluación del efecto histopatológico	43
7.2.3.1 La administración oral de CBD no causa alteraciones morfológicas en la mucosa del intestino delgado	43
7.2.3.2 La administración oral de CBD induce hipertrofia en las células musculares lisas de la muscular externa	45

Capítulo	Página
7.2.3.3 La administración oral de CBD induce cambios morfológicos en el plexo mientérico	46
7.2.3.4 El CBD no modifica la deposición de colágeno en el intestino delgado	49
7.2.3.5 La administración oral de CBD aumenta el número de células caliciformes en el intestino delgado	50
7.2.3.6 La administración oral de CBD no causa alteraciones morfológicas en el hígado	51
7.2.3.7 La administración oral de CBD no causa alteraciones morfológicas en el riñón	53
8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIÓN.....	62
REFERENCIAS	64

TABLA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Metabolismo del CBD	9
2. Esquema de los receptores del CBD	10
3. Modelo Experimental	16
4. Prueba de la madriguera	20
5. Prueba del nido	21
6. Prueba de la marcha	22
7. Prueba del campo abierto	23
8. Prueba de la transición luz y oscuridad	24
9. El pretratamiento con CBD durante 1 hora disminuye los niveles de ROS inducidos por PQ a las 24 horas.	31
10. El pretratamiento con CBD durante 1 hora no disminuye los niveles de ROS inducidos por PQ a las 48 horas.	32
11. El pretratamiento con CBD durante 24 horas disminuye los niveles de ROS inducidos por PQ a las 48 horas.	34
12. El pretratamiento con CBD durante 24 horas no previene la muerte celular inducida por PQ a las 48 horas.	36
13. La administración oral de CBD no afecta el peso de los ratones	37
14. La administración oral de CBD no afecta el bienestar general.	38
15. La administración prolongada de CBD no afecta el desempeño cognitivo.	39
16. El CBD no compromete el desempeño motor su tras administración crónica.	40

17. La administración de CBD diaria modifica la preferencia espacial sin alterar el comportamiento exploratorio.	41
18. El CBD aumenta la disposición de los sujetos a explorar áreas iluminadas y expuestas.	42
19. El CBD no causa alteraciones en la mucosa del intestino delgado.	44
20. La administración oral de CBD influye en la distribución espacial de las vellosidades en la mucosa del intestino delgado.	45
21. La administración oral de CBD induce hipertrofia en las células musculares lisas de la muscular externa del intestino delgado	46
22. El CBD induce hipertrofia en las células del plexo mientérico.	47
23. El CBD no modifica la población neuronal del plexo mientérico.	48
24. El CBD no modifica la deposición de colágeno en el intestino delgado	49
25. El CBD aumenta la cantidad de células caliciformes en las vellosidades del intestino delgado.	50
26. El CBD no modifica la morfología del hígado.	51
27. El CBD no modifica el depósito de colágeno en el hígado.	52
28. La administración oral de CBD no causa alteraciones morfológicas en riñón.	54
29. La administración oral de CBD no causa alteraciones morfológicas en riñón.	55
30. La administración oral de CBD no altera la membrana basal glomerular.	55

ABREVIATURAS

μM	Micromolar
μL	Microlitros
mM	Milimolar
AMPK	Del inglés AMP-activated protein kinase
ATP	Adenosín trifosfato
Ctrl	Control
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
M	Molar
m-TOR	Del inglés mammalian target of rapamycin
PBS	Del inglés phosphate buffered saline
PQ	Paraquat
CBD	Cannabidiol
THC	Δ ⁹ -Tetrahidrocannabinol
MPP ⁺	1-Metil-4-fenilpiridinio
BAX	Del inglés Bcl-2-associated X protein
MB	Maneb
CB1	Del inglés Cannabinoid receptor type 1
CB2	Del inglés Cannabinoid receptor type 2
TRPV1	Del inglés Transient Receptor Potential Vanilloid 1
GPR55	Del inglés G protein-coupled receptor 55
PPAR _γ	Del inglés Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
5-HT1A	Del inglés 5-Hydroxytryptamine receptor 1A

ABSTRACT

Cannabidiol (CBD) is a non-psychoactive phytocannabinoid, mainly extracted from the *Cannabis sativa* plant. Recently, the use of CBD has increased significantly due to its diverse therapeutic properties, particularly its anxiolytic and antioxidant effects. Despite its widespread consumption, CBD remains unregulated, and the long-term effects on its metabolizing organs remain unknown. This study aimed to evaluate the antioxidant effect of CBD in dopaminergic-like cells and assess the consequences of chronic CBD administration on cognitive and motor behavior, as well as tissue morphology in a murine model. SH-SY5Y neuroblastoma cells were exposed to various concentrations of CBD to analyze its antioxidant and neuroprotective potential using assays for reactive oxygen species (DHE), mitochondrial activity (MTT), and cell viability (Trypan Blue). In parallel, male C57BL/6J mice received a daily oral dose of CBD (5.6 mg/kg) for six months. Behavioral, cognitive, and motor assessments were conducted, followed by histological analysis of the small intestine, liver, and kidney using hematoxylin and eosin (H&E), periodic acid–Schiff (PAS), Masson's trichrome, and cresyl violet staining. Results showed that cells treated with 10 μ M CBD showed partial protection against oxidative stress induced by paraquat; however, this concentration was not sufficient to prevent mitochondrial dysfunction and cell death. No significant morphological alterations were observed in hepatic or renal tissues between the CBD-treated and control groups. However, intestinal analysis revealed significant changes, including hypertrophy of the muscularis externa, an increased area of the myenteric plexus, and enteric neurons displaying enlarged cytoplasmic regions without modifications in nuclear size. Additionally, intestinal villi exhibited greater spacing and a mild trend toward increased

thickness, with an increase of goblet cell count. These findings suggest that prolonged CBD administration induces structural remodeling in the enteric nervous system and intestinal architecture while preserving hepatic and renal morphology. Further research is required to elucidate the functional implications of these histological modifications.

RESUMEN

El cannabidiol (CBD) es un fitocannabinoide no psicoactivo, extraído principalmente de la planta *Cannabis sativa*. En los últimos años, su uso ha aumentado considerablemente debido a sus múltiples propiedades terapéuticas, destacando entre ellas sus efectos ansiolíticos y antioxidantes. No obstante, a pesar de su amplio consumo, el CBD aún carece de regulación específica, y sus efectos a largo plazo sobre los órganos implicados en su metabolismo permanecen poco comprendidos.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto antioxidante del CBD en células de tipo dopaminérgico, así como el impacto de su administración crónica sobre el comportamiento cognitivo y motor, y la morfología tisular en un modelo murino. Para ello, se analizó el potencial antioxidante y neuroprotector del CBD *in vitro*, mediante la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS), actividad mitocondrial y viabilidad celular. El CBD logró atenuar parcialmente el estrés oxidativo inducido por paraquat, aunque no evitó la disfunción mitocondrial ni la muerte celular. En ratones machos C57BL/6J que recibieron una dosis oral diaria de CBD durante seis meses, se observó una modificación del sesgo espacial, con mayor exploración de zonas iluminadas y conservación de la actividad locomotora general, lo cual sugiere un efecto ansiolítico específico.

El análisis histológico del intestino delgado, hígado y riñón se realizó mediante tinciones de hematoxilina y eosina (H&E), ácido periódico de Schiff (PAS), tricrómica de Masson y violeta de cresilo. No se encontraron alteraciones hepáticas ni renales, pero sí se identificaron cambios intestinales, incluyendo hipertrofia de la muscular externa, aumento del área del plexo mientérico, citoplasma neuronal entérico agrandado, mayor número de

células GFAP positivas, mayor separación entre vellosidades e incremento en el número de células caliciformes.

Estos hallazgos sugieren que la administración prolongada de CBD induce un remodelamiento estructural del sistema nervioso entérico y de la arquitectura intestinal, al tiempo que preserva la morfología hepática y renal. Se requieren estudios adicionales para dilucidar las implicaciones funcionales de estas alteraciones histológicas y su relevancia en el contexto clínico.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En el organismo humano, existe un sistema conocido como sistema endocannabinoide (SEC), implicado en la regulación de diversos procesos fisiológicos, como la liberación de neurotransmisores, la percepción del dolor y funciones gastrointestinales, hepáticas, inmunológicas y metabólicas ¹. Está compuesto principalmente por dos endocannabinoides, la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG), los cuales actúan como ligandos para los receptores cannabinoides tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2), distribuidos en numerosos tejidos del cuerpo ². Tras cumplir su función, estos endocannabinoides son degradados principalmente por las enzimas amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD) ³. Debido a su amplia distribución y relevancia funcional, la alteración del SEC se ha asociado con diversas patologías (trastornos neurológicos, gastrointestinales y metabólicos, entre otros), lo que ha llevado al estudio de compuestos exógenos capaces de modular esta vía de señalización ⁴.

Entre estos compuestos se encuentran los fitocannabinoides, que son sustancias naturales derivadas de plantas como *Cannabis sativa*, con capacidad para interactuar con el sistema endocannabinoide y modular sus efectos. El uso terapéutico de *C. sativa* se remonta a la antigüedad, existen indicios de que esta planta ha sido empleada durante siglos como remedio para diversas afecciones físicas y mentales ⁵. Hasta la fecha, se han identificado aproximadamente 113 fitocannabinoides en *C. sativa*. Estas sustancias químicas comparten una estructura terpenofenólica característica que les permite interactuar con los

receptores cannabinoides. Entre ellos, destacan dos compuestos neutros de especial relevancia farmacológica: el tetrahidrocannabinol (THC) y el cannabidiol (CBD) ⁶.

Aunque el CBD y el THC comparten la misma fórmula química, sus estructuras moleculares difieren. El THC contiene un anillo cíclico, mientras que el CBD presenta un grupo hidroxilo abierto. Esta distinción estructural, impide su conversión en THC bajo condiciones fisiológicas ⁷. Esta característica hace que el CBD carezca de los efectos psicoactivos del THC, por lo cual se ha incrementado el interés por este fitocannabinoide por su potencial como agente terapéutico en diversas condiciones.

A diferencia de otros fitocannabinoides, el CBD no solo interactúa con los receptores cannabinoides CB1 y CB2, sino que también actúa sobre otros receptores distribuidos en diversos órganos, como el receptor potencial transitorio vaniloide tipo 1 (TRPV1), el receptor GPR55, el receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ) y el receptor de serotonina 5-HT1A ⁸. La capacidad de unirse a diferentes receptores le confiere al CBD propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, neuroprotectoras, ansiolíticas y anticonvulsivas, lo que lo convierte en un compuesto con alto potencial terapéutico ⁹.

Debido a sus múltiples propiedades, el interés por los productos derivados de *C. sativa* ha crecido de forma significativa en los últimos años, lo que refleja un aumento notable de su consumo a nivel mundial. Se estima que aproximadamente 219 millones de personas utilizan compuestos derivados de esta planta, de las cuales cerca de 2 millones residen en México ¹⁰. Esto representa alrededor del 2 % de la población mexicana que recurre a estos

productos, principalmente con fines como la reducción del estrés, el alivio del dolor o la mejora del sueño.

Sin embargo, el uso de estos compuestos impacta en la salud pública, sobre todo debido a la falta de regulación de su uso y de evidencia científica sobre sus efectos a largo plazo. Específicamente, existe un conocimiento limitado de su efecto en los órganos involucrados en su absorción, metabolismo y excreción (intestino, el hígado y riñón respectivamente). Por lo tanto, es imprescindible estudiar el efecto de la exposición crónica al CBD, así como sus posibles beneficios o riesgos en condiciones normales.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC) está ampliamente distribuido en el organismo y desempeña un papel clave en procesos fisiológicos, como lo son la percepción del dolor, la neuroprotección, la regulación de la apoptosis, la respuesta inflamatoria, el control del apetito y la función reproductiva ¹¹. Este sistema constituye una red de señalización intracelular compuesta por receptores transmembrana acoplados a proteínas G, entre los que destacan CB1, CB2 y GPR55. Estos receptores son activados por los principales endocannabinoides, la anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG), así como regulados por enzimas clave en su metabolismo, la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD), respectivamente ¹².

La anandamida ejerce una de sus acciones principales modulando la liberación de otros neurotransmisores, lo que le confiere un efecto ansiolítico al favorecer un estado de relajación ¹³. Estudios en modelos murinos, utilizando la prueba de transición luz-oscuridad, que consiste en colocar al animal en una caja dividida en dos compartimentos (uno iluminado y otro oscuro), demostraron que, en condiciones basales, los ratones tienden a distribuir su tiempo de manera equitativa entre ambas zonas. Sin embargo, ante situaciones de estrés, manifiestan un comportamiento tipo ansioso, permaneciendo más tiempo en la zona oscura³⁸. Este patrón se interpreta como una conducta de autoprotección, asociada a una disminución en los niveles de anandamida.

En este contexto, se ha observado que la inhibición farmacológica de la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), responsable de la degradación de la anandamida, prolonga su vida media y favorece una mayor acumulación de este endocannabinoides en el sistema. Como resultado, los niveles basales de ansiedad disminuyen significativamente en ratones sometidos a estrés ¹⁴. Este efecto se reflejó en una mayor permanencia en la zona iluminada, un aumento en la distancia recorrida y la exploración de ese entorno, lo que indica una mejora en la conducta tipo ansiosa.

Además, el endocannabinoides 2-AG está implicado en la modulación de síntomas motores como los temblores, la rigidez muscular y la distonía, característicos de diversas condiciones neurológicas. En un estudio reciente, se demostró que pacientes con mutaciones en el gen DAGLB, el cual está involucrado en la biosíntesis de 2-AG, presentaban síntomas neuromotores similares a los observados en la enfermedad de Parkinson ¹⁵. Esta relación se atribuye a una disminución en los niveles de 2-AG, lo que sugiere un papel fundamental de este endocannabinoides en la regulación de la función motora.

Dado que el SEC participa en numerosos procesos fisiológicos, incluyendo funciones del sistema nervioso, metabolismo, actividad gastrointestinal, sistema inmunológico y salud cardiovascular, su desregulación puede generar una amplia gama de alteraciones funcionales. Debido a la corta vida media de los endocannabinoides, y por lo tanto, a la brevedad de sus efectos, a lo largo de los años se han buscado alternativas exógenas

químicamente similares, como los fitocannabinoides, con el fin de modular este sistema de manera más sostenida.

2.2 Fitocannabinoides

Los fitocannabinoides son compuestos bioactivos de origen vegetal, derivados principalmente de la planta *Cannabis sativa*. Estos compuestos han demostrado un considerable potencial terapéutico en diversas patologías. Si bien, uno de sus principales mecanismos de acción ocurre a través de su interacción con el sistema endocannabinoide, mediante la activación o modulación de los receptores CB1 y CB2, también se ha evidenciado que estos compuestos pueden influir sobre canales iónicos, receptores de neurotransmisores y rutas antioxidantes, lo que amplía su espectro de acción.

Hasta la fecha, se han identificado más de 120 fitocannabinoides con posibles propiedades beneficiosas ¹⁶. Entre ellos, los más estudiados son el cannabidiol (CBD) y el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC). El CBD es un compuesto no psicoactivo asociado con efectos antiinflamatorios, neuroprotectores, ansiolíticos e incluso anticonvulsivos. Por otro lado, el Δ^9 -THC, principal responsable de los efectos psicoactivos de *C. sativa*, ha demostrado importantes propiedades analgésicas ¹⁷.

Estas sustancias químicas comparten una estructura terpenofenólica de 21 átomos de carbono, lo que les permite interactuar con los receptores cannabinoides. Aunque el CBD y el THC tienen la misma fórmula química, difieren en su estructura molecular: el THC posee un anillo cíclico, mientras que el CBD presenta un grupo hidroxilo abierto. Esta

diferencia, en particular la presencia de un enlace C–C exocíclico saturado en el CBD, impide su conversión en THC en condiciones fisiológicas, lo que explica su falta de efectos psicoactivos y su creciente interés terapéutico.

La compleja interacción entre los fitocannabinoides y los distintos sistemas del cuerpo humano ha abierto nuevos campos de investigación. Su capacidad para modular procesos neuroinflamatorios, oxidativos y de señalización neuronal sugiere un potencial de aplicación en una amplia gamma de trastornos neurológicos, psiquiátricos, inmunológicos y gastrointestinales, entre otros ¹⁸. Es por esto que la investigación en fitocannabinoides ha buscado desarrollar terapias más eficaces y con menos efectos adversos.

2.3 Cannabidiol

El CBD es el segundo compuesto químico con mayor presencia en *C. sativa*. Cuando este compuesto se administra vía intravenosa (IV), posee una biodisponibilidad relativamente baja y puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), Presenta un perfil de seguridad tolerable y aceptable para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central (SNC) ¹⁹.

Se le atribuyen importantes propiedades ansiolíticas, anticonvulsivas, antiinflamatorias y antirreumatoides. No obstante, la mayoría de los estudios clínicos realizados hasta ahora han involucrado a un número limitado de pacientes, durante periodos de tiempo relativamente cortos, y sin un análisis exhaustivo de los órganos implicados en su metabolismo. Por tanto, el impacto del uso prolongado de este fitocannabinoides en tejidos periféricos y en la salud a largo plazo continúa siendo incierto y requiere mayor investigación.

Recientemente se ha demostrado su acción neuroprotectora en estudios *in vitro* y en modelos animales. Se cree que su mecanismo de protección se debe principalmente a la inhibición de la liberación de glutamato en las sinapsis. La liberación excesiva de glutamato extracelular puede dañar neuronal, por lo que la capacidad del CBD para modularlo se considera fundamental para prevenir el daño neuronal en diferentes enfermedades neurológicas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Huntington (EH) ²⁰.

También, se ha reportado que la unión del CBD con el receptor GPR55 puede ser un tratamiento potencial para varias formas de epilepsia, especialmente en casos de epilepsia resistente a los tratamientos convencionales. Estudios han demostrado que el CBD puede reducir la frecuencia y la severidad de las convulsiones en ciertos tipos de epilepsia hasta un 58.3%, tanto en infantes como adultos, con dosis controladas, incluyendo trastornos epilépticos raros y severos ²¹.

Además, se ha observado que el CBD influye en la activación de enzimas antioxidantes. Un estudio determinó que al inducir estrés oxidativo en células de neuroblastoma usando la molécula MPP⁺, se reduce la cantidad del factor de transcripción Nrf2 y de las enzimas protectoras SOD-1 y GSH. Sin embargo, el tratamiento con CBD en células expuestas al mismo agente permite restaurar los niveles de estas enzimas, reactivando así la defensa antioxidante ²².

2.3.1 Metabolismo

El cannabidiol (CBD) puede administrarse por diversas vías, siendo la vía oral una de las más empleadas. Debido a que es un compuesto lipofílico, el CBD se absorbe principalmente por difusión pasiva a través de la bicapa fosfolipídica de las células epiteliales intestinales (Fig. 1), interactúa con las sales biliares y forma micelas, lo que facilita su absorción en el intestino delgado ²³.

Una vez absorbido, el CBD, al ser una molécula hidrófoba, se une a proteínas transportadoras plasmáticas, principalmente lipoproteínas y albúmina, lo que permite su distribución sistémica. El CBD es transportado principalmente al hígado a través del sistema porta hepático ²⁴, donde experimenta un metabolismo extenso de primer paso. En este órgano, el CBD es metabolizado de manera rápida por las enzimas del citocromo P450, generando como producto primario el 7-hidroxycannabidiol (7-OH-CBD), considerado un metabolito farmacológicamente activo. Posteriormente, este compuesto es convertido en ácido 7-carboxicannabidiol (7-COOH-CBD), un metabolito mayoritario considerado inactivo, debido a su escasa solubilidad lipídica y a su limitada capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que se le reconoce como el principal metabolito de excreción ²⁵.

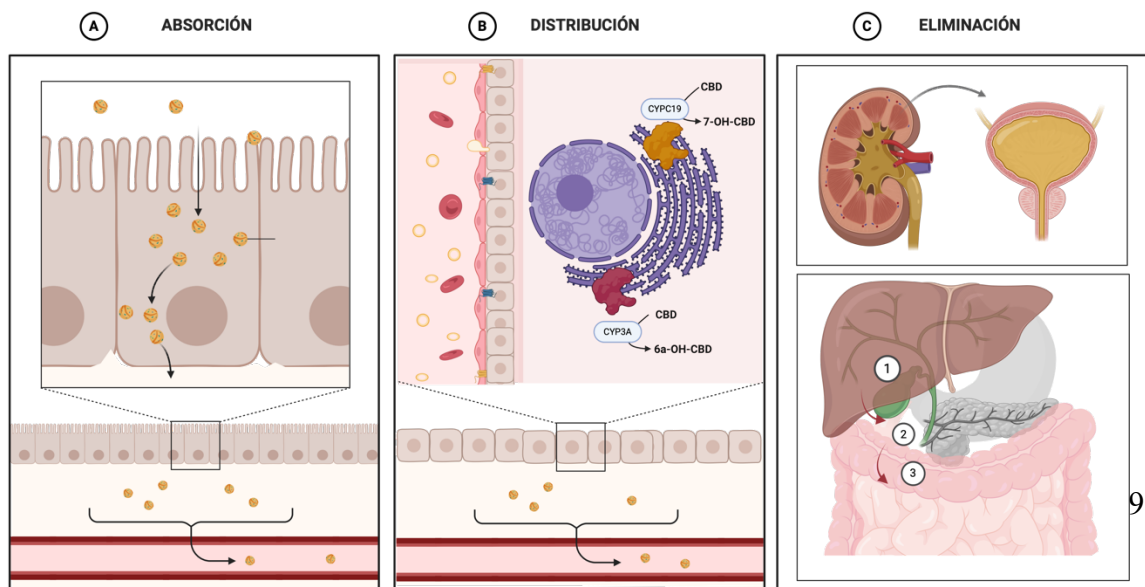


Fig. 1. Metabolismo del CBD. A. Absorción intestinal, B. distribución al hígado a través del sistema porta hepático y C. eliminación del CBD a través de la vía urinaria e intestinal tras la administración oral.

Finalmente, los metabolitos no reabsorbidos son eliminados del organismo, predominantemente a través de la orina. Una fracción menor es excretada por la vía biliar hacia el intestino y eliminada en las heces ²⁶.

2.3.2 Receptores

Las propiedades del CBD en el organismo dependen de su capacidad de unión a receptores específicos, esto debido a que, a diferencia de otros fitocannabinoides, el CBD no solo tiene afinidad por los receptores CB1 y CB2, sino que también se puede unir a otros receptores que se encuentran en el intestino, hígado, riñones y cerebro (Fig. 2).

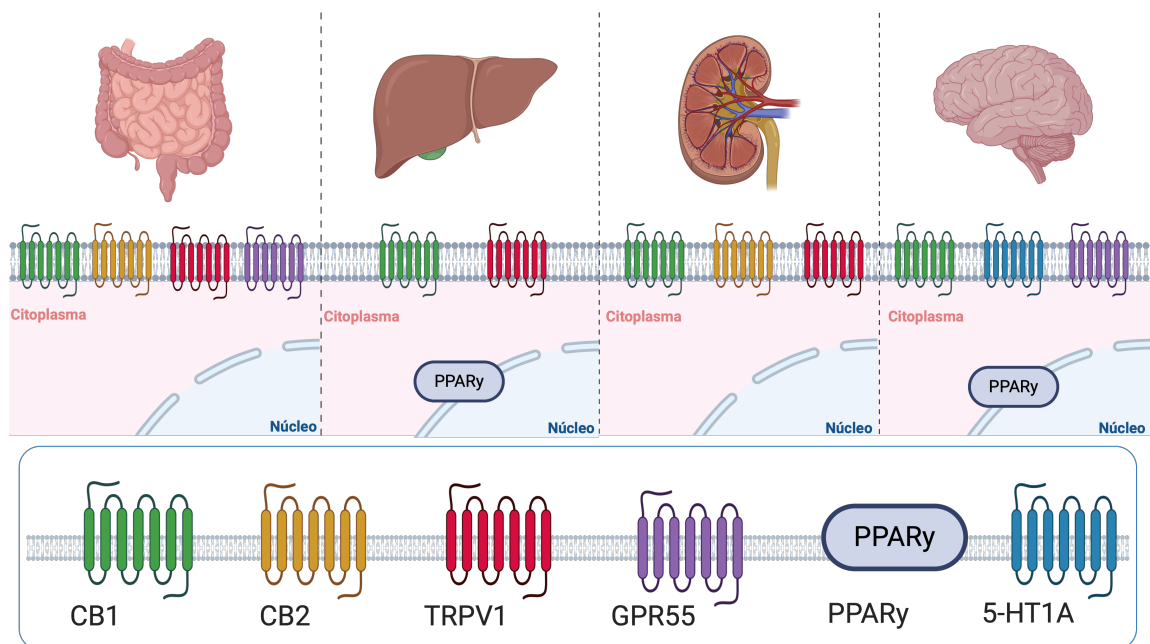


Fig. 2. Receptores del CBD. Principales receptores con los que interactúa el CBD, localizados en sus órganos diana, incluidos el intestino, hígado, riñón y cerebro.

Entre los receptores a los que se une el CBD se encuentran los receptores acoplados a proteína G (GPR55, GPR18, GPR3, GPR6, GPR12); canales de receptores potenciales transitorios (vanilloides TRP TRPV1 a TRPV4, anquirina TRP TRPA1, miembro M de TRP TRPM8); receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR2, PPAR γ); transportadores de monoamina (receptor de norepinefrina, dopamina, serotonina 1A); enzimas como la amida hidrolasa de ácidos grasos y la monoacilglicerol lipasa; proteínas transportadoras de unión a ácidos grasos; transportadores de nucleósidos equilibrantes de adenosina; y receptores de glicina $\alpha 1$ y $\alpha 3$ ²⁶.

Al unirse el CBD al receptor TRPV1 en el intestino, se ha reportado que auxilia en la reducción de la inflamación del tejido, mediante la liberación de péptidos inflamatorios y analgésicos. Además, influye en la liberación de neurotransmisores que regulan la contracción y relajación de los músculos lisos intestinales, propiciando así la peristalsis ²⁷.

PPAR γ es un factor de transcripción clave en la regulación de la diferenciación de adipositos y la homeostasis de lípidos. En el hígado, al unirse el CBD con este receptor, activa la expresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos y el almacenamiento de lípidos, por lo que puede mejorar el perfil lipídico y reducir el riesgo a sufrir dislipidemia ⁶.

El receptor de serotonina 1A (5-HT1A) desempeña un papel fundamental en la fisiopatología de la depresión, la agresión y la ansiedad, al unirse a este, el CBD puede

aumentar la liberación de serotonina, conocida como la “hormona de la felicidad”. Este mecanismo se ha visto asociado con sus efectos ansiolíticos y antidepresivos ²⁸.

A pesar del creciente interés por las múltiples propiedades terapéuticas del CBD anteriormente mencionadas, aún persisten importantes limitantes en el conocimiento sobre su seguridad, mecanismos de acción y efectos a largo plazo. Diversos estudios han mostrado resultados inconsistentes debido a factores como el tamaño reducido de las muestras, la ausencia de seguimiento prolongado, y la falta de evaluación de sus efectos sobre órganos involucrados en su metabolismo, como el hígado, riñón e intestino ⁵⁰. Además, su potencial antioxidante y neuroprotector no se ha dilucidado completamente, debido a la variabilidad en las dosis utilizadas y la falta de rangos de administración seguros y efectivos.

Es por esto por lo que, el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de CBD a nivel *in vitro*, así como su efecto *in vivo* en los órganos involucrados en su metabolismo, Este enfoque busca aportar evidencia que respalde su uso potencial como una alternativa terapéutica en condiciones asociadas a daño oxidativo y neurodegeneración.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

El CBD es uno de los más de 100 fitocannabinoides identificados en *Cannabis sativa* y constituye el 40% del extracto de la planta, siendo el segundo componente más abundante. Además, el CBD no presenta actividad psicoactiva y exhibe un amplio espectro de propiedades terapéuticas, entre las que destacan los efectos antioxidantes y antiinflamatorios, los cuales lo convierten en un potencial agente terapéutico.

Sin embargo, no existe evidencia de su efecto a largo plazo, por lo que los hallazgos encontrados en este estudio ayudarán a determinar si los órganos involucrados en su metabolismo desarrollan alguna alteración en respuesta al CBD.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

Ha: La exposición crónica al CBD induce alteraciones morfológicas en intestino delgado, hígado y riñón.

Ho: La exposición crónica al CBD no induce alteraciones morfológicas en intestino delgado, hígado y riñón.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición crónica al CBD a nivel celular y sobre el intestino delgado, hígado y riñón.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto del CBD sobre el estrés oxidativo.
2. Evaluar el efecto del CBD sobre la muerte celular.
3. Analizar el efecto de la exposición crónica al CBD sobre el comportamiento murino.
4. Evaluar el efecto de la exposición crónica al CBD a nivel histopatológico.

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia general

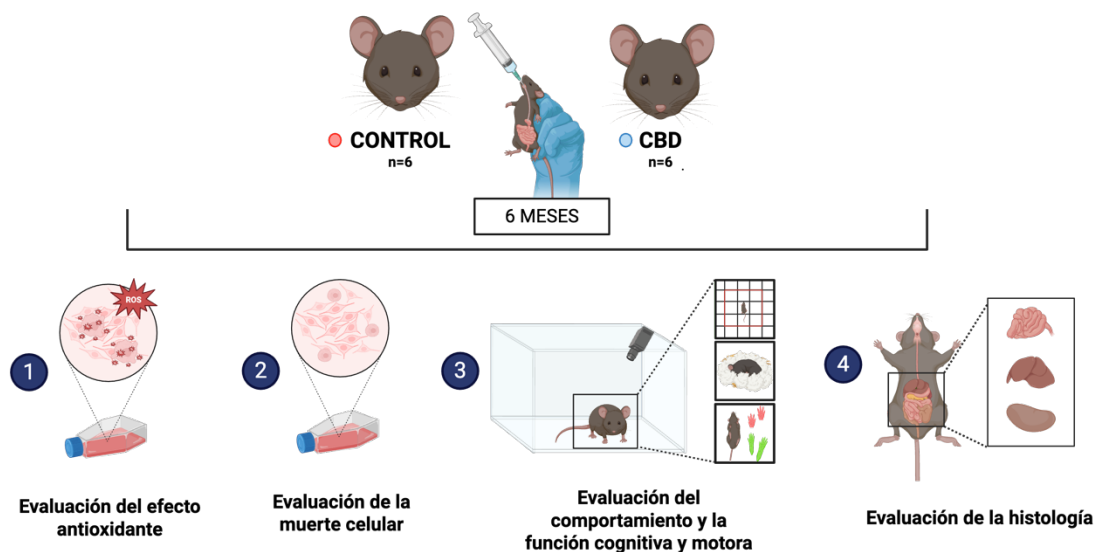


Fig. 3. Modelo experimental. Evaluación del efecto del CBD sobre el estrés oxidativo inducido por PQ en células dopaminérgicas y la muerte celular a nivel *in vitro* en células de tipo dopaminérgico. Análisis del impacto del cannabinoide sobre el comportamiento y la función cognitiva y motora de los murinos, y en la morfología de los órganos involucrados en su metabolismo.

6.2 Modelo *in vitro*

Para la realización del modelo *in vitro*, se empleó la línea celular SH-SY5Y (ATCC™ CRL-2266), debido a su fenotipo dopaminérgico característico. Esta línea celular es una sublínea clonada de la línea SK-N-SH (ATCC HTB-11), que fue establecida en 1970 a partir de un tumor óseo metastásico. Las células se utilizaron entre los pasajes 10 y 20, cultivándolas en medio DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's F-12 50/50 Mix) (10-092-CMR, Corning), suplementado con 10% de suero fetal bovino (35-010-CV, Corning), 1% de L-glutamina (25030081, Gibco) y 1% de penicilina-estreptomicina (15240062, Gibco). El cultivo se mantuvo en condiciones estándar, a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂.

Para los tratamientos celulares, se utilizó CBD liofilizado (Vitality, OBCBD. Pharma Labs, Miami, Florida), el cual fue disuelto en etanol absoluto a una concentración de 50 mM. Las células fueron pretratadas con el fitocannabinoide durante 1 y 24 horas, evaluando su efecto mediante una curva de concentraciones de 1, 5, 10 y 25 μ M. Posteriormente, se adicionó el herbicida paraquat (código 227320010, Acros Organics) a una concentración final de 0.5 mM, y las células fueron incubadas durante 24 o 48 horas adicionales con el fin de evaluar su respuesta frente al estrés oxidativo inducido por paraquat.

6.2.1 Análisis del estrés oxidativo

6.2.1.1 Detección de especies reactivas de oxígeno

Como se mencionó previamente, para inducir estrés oxidativo en las células, se utilizó el herbicida paraquat, un potente generador de especies reactivas de oxígeno. Para su detección, se empleó la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE), ya que, al ser oxidada y convertida en etidina, emite fluorescencia, lo que permite su detección.

Las células fueron tratadas como se describió anteriormente y se les añadió la sonda DHE a una concentración de 0.5 μ M durante 15 minutos. Tras este tiempo de incubación, las células fueron cosechadas y centrifugadas a 300 g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se realizó el conteo de células positivas para DHE mediante citometría de flujo utilizando el equipo Muse™ Cell Analyzer (Millipore).

6.2.2 Análisis de la muerte celular

6.2.2.1 Evaluación de la función mitocondrial

Para evaluar el efecto citotóxico de las concentraciones seleccionadas de CBD, se llevó a cabo la prueba de MTT, la cual se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa para reducir el compuesto tetrazolio (MTT) en formazán, un compuesto insoluble en agua de color púrpura oscuro. Este proceso de reducción ocurre exclusivamente en células vivas y metabólicamente activas.

En este ensayo, las células fueron expuestas al tratamiento descrito previamente durante 48 horas. Tras este periodo, se añadió MTT (M2128, Sigma Aldrich) a una concentración de 5 mg/mL y las células fueron incubadas durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se añadió el solvente de MTT (HCl 4 mM, 0.1% de Nonidet P-40 [NP 40], disuelto en isopropanol). Las células fueron agitadas hasta que los cristales de formazán se disolvieron completamente. Finalmente, se cuantificó la cantidad de formazán producido por las mitocondrias mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 590 nm.

6.2.2.2 Análisis de la viabilidad celular

Para evaluar el efecto del CBD sobre la viabilidad celular, las células fueron tratadas según lo descrito previamente durante 48 horas, y se empleó el método de exclusión por captación utilizando azul tripano. Este colorante permite identificar células no viables, ya que no puede atravesar la membrana plasmática intacta de las células viables.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas con PBS y posteriormente recolectadas por centrifugación a 300 g a 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado, y las células fueron resuspendidas en PBS. Posteriormente, se realizó una dilución en una proporción 1:1 con azul tripano.

La viabilidad celular fue cuantificada utilizando un contador automático TC20™ (Bio rad) mediante el cual se determinó el porcentaje de células viables y no viables.

6.3 Modelo *in vivo*

Se utilizaron 12 ratones machos de la cepa C57BL/6J, de 20 semanas de edad, mantenidos en el bioterio del Departamento de Histología bajo condiciones controladas: ciclo luz/oscuridad de 12 horas, con acceso ad libitum a alimento y agua (LabDiet #5P14 y Prolab RMH 2500). El cambio de aserrín, así como la reposición de agua y alimento, se realizó cada tercer día, al igual que la limpieza de las jaulas y los bebederos.

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo conforme a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL). Asimismo, el protocolo fue autorizado por el Comité de Ética de la Universidad (número de registro P124-0186).

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos experimentales, con seis individuos por grupo: 1) grupo Control y 2) grupo tratado con CBD. El tratamiento se administró por vía oral de forma diaria durante seis meses. El CBD, disuelto en aceite de sésamo (Vitality, OBCBD. Pharma Labs, Miami, Florida), se administró a una dosis de 5.6 mg/kg.

6.3.1 Evaluación del peso corporal y la supervivencia

Al inicio de cada semana, se registró el peso corporal de cada ratón en gramos y se realizó un monitoreo continuo de la supervivencia a lo largo de los seis meses de tratamiento. Al concluir el estudio, los datos de peso corporal fueron sometidos a un análisis estadístico

mediante un ANOVA de dos colas para identificar posibles diferencias significativas entre los grupos experimentales. La supervivencia fue evaluada mediante la prueba de Log-Rank (Mantel-Cox), con el fin de determinar variaciones en la tasa de supervivencia entre las condiciones experimentales.

6.3.2 Evaluación de la función motora y cognitiva

6.3.2.1 Prueba de la madriguera

Con el fin de evaluar el bienestar general de los ratones, se analizó su comportamiento en términos de acopio y consumo de alimento, ya que se ha observado que estos parámetros se alteran bajo condiciones de estrés inducidas por los factores experimentales. Para ello, se colocaron 80 g de alimento dentro de un tubo con dimensiones de 10×5 cm, cerrado en uno de sus extremos. Posteriormente, el tubo se ubicó dentro de la jaula en la que los ratones se habían habituado previamente, dos horas antes del inicio del ciclo de oscuridad. Después de un periodo de 12 horas, se retiró el tubo y se procedió al pesaje del alimento restante en su interior, así como al registro del alimento desplazado fuera del tubo durante el periodo nocturno.

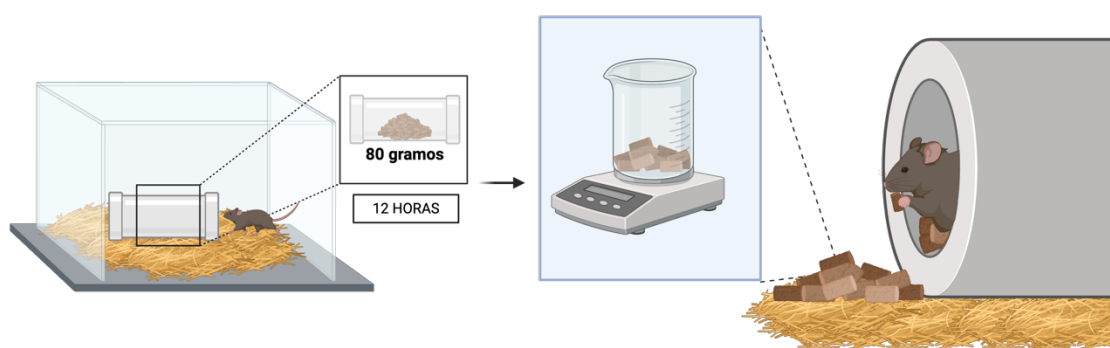


Fig. 4. Prueba de la madriguera. Evaluación del desplazamiento de alimento como indicador del comportamiento y estado general de los ratones en condiciones experimentales durante 12 horas.

6.3.2.2 Prueba de la construcción de nido

El objetivo de esta prueba en los ratones es evaluar la función cognitiva y motora a través de la capacidad de los animales para construir un nido, lo cual puede reflejar su capacidad de adaptación y su bienestar. Para realizar esta evaluación, se colocaron 5 g de algodón comprimido en una esquina de la jaula. Se evaluaron dos aspectos clave: la altura y el cierre de las paredes que rodean la entrada del nido. Cada nido obtuvo una puntuación en base a una escala del 1 al 5, donde una puntuación de 5 indica una construcción óptima (domo completo), y puntuaciones menores indican alteraciones en la construcción, lo que permite inferir la capacidad cognitiva y motora del animal en relación con el ambiente experimental (4 = domo incompleto, 3 = forma de copa, 2 = nido plano, 1 = material manipulado y 0 = material no manipulado).

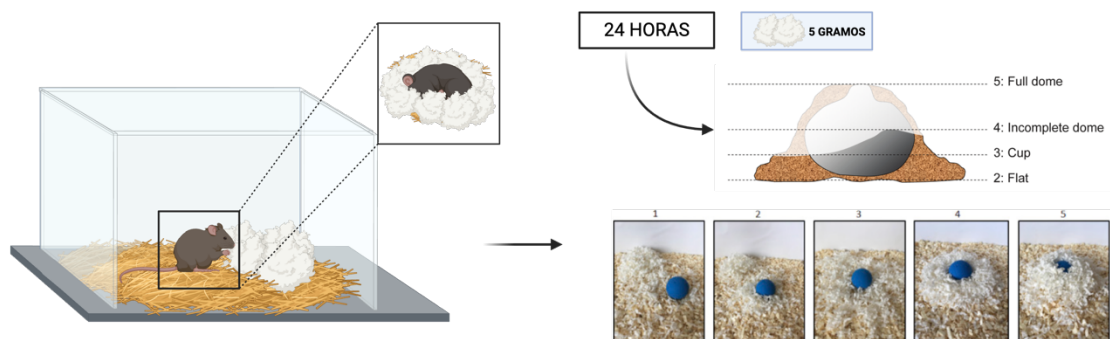


Fig. 5. Prueba del nido. Evaluación de la función cognitiva y motora en ratones mediante la prueba de construcción de nido, calificada en una escala de 0 a 5 según la complejidad estructural del nido formado a partir de algodón comprimido.

6.3.2.3 Prueba de la marcha

La prueba de la marcha es una prueba no invasiva utilizada para evaluar posibles alteraciones motoras en los ratones. Se analizó el patrón de marcha de los animales al pintar las patas posteriores y anteriores con pintura lavable no tóxica y permitirles caminar sobre una hoja de papel colocada dentro de un túnel. El túnel tiene un compartimento

oscuro en su extremo final, lo que favorece el comportamiento natural de los roedores, que tienden a preferir áreas oscuras. Esta característica ayudó a que los ratones pasaran de manera más natural por el túnel, favoreciendo que su patrón de pisada fuera el adecuado. Antes de realizar la prueba, los ratones fueron aclimatados durante tres días, permitiéndoles interactuar en ese ambiente durante 10 minutos cada día. Posteriormente, a partir del patrón de huellas impresas, se midieron el largo y el ancho de las pisadas para evaluar las alteraciones motoras presentes en los ratones.

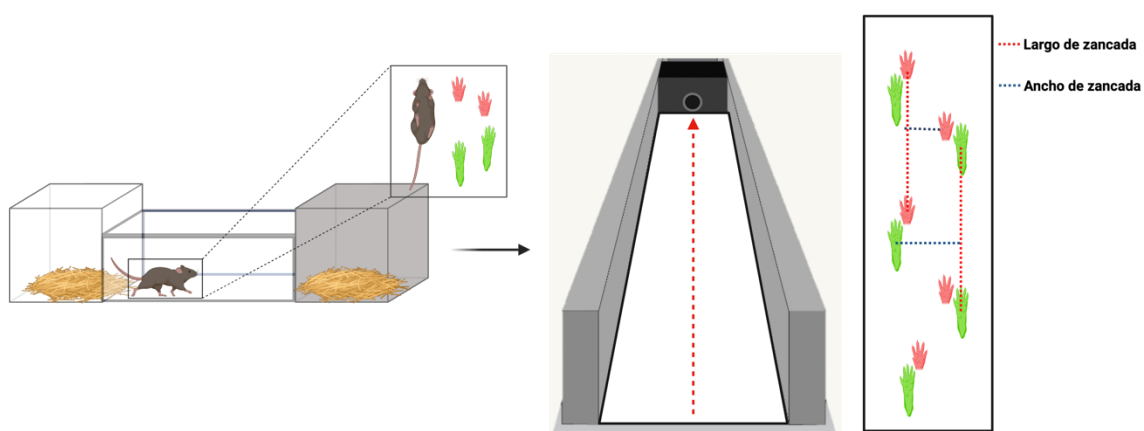


Fig. 6. Prueba de la marcha. Evaluación del patrón de marcha en ratones mediante el análisis de huellas, midiendo el largo y ancho de las pisadas como indicadores de alteraciones motoras.

6.3.2.4 Prueba del campo abierto

Para evaluar el comportamiento tipo ansioso en los ratones, se utilizó la prueba del campo abierto. En este ensayo conductual, los animales fueron colocados en una caja de acrílico de 30×30 cm, cuya base estaba cubierta con una hoja cuadriculada dividida en 25 cuadros de 6×6 cm. Durante un período de 10 minutos, se analizó su comportamiento mediante el registro del tiempo que pasaron en la cuadrícula periférica y central.

Esta prueba permite evaluar diversos aspectos del comportamiento, incluyendo la actividad locomotora, la ansiedad y la exploración. Al exponer a los ratones a un ambiente nuevo y delimitado, se midió la distancia total recorrida y el tiempo pasado en el centro

en comparación con la periferia, lo que proporcionó una medida indirecta de su nivel de ansiedad. Para ello, se registró su desplazamiento a lo largo del periodo de prueba mediante grabación y análisis de video.

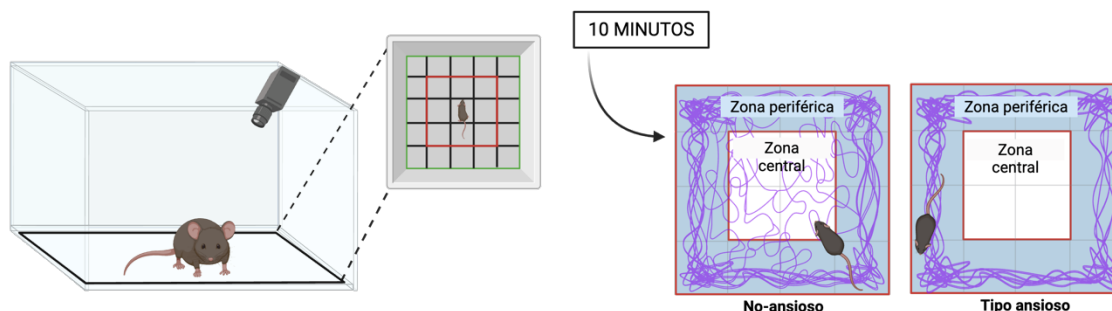


Fig. 7. Prueba del campo abierto. Evaluación del comportamiento tipo ansioso y la actividad locomotora en ratones mediante la prueba del campo abierto, registrando el tiempo en zonas central y periférica durante 10 minutos.

6.3.2.5 Prueba de la transición luz y oscuridad

Para evaluar el comportamiento tipo ansioso y el comportamiento exploratorio en murinos, se utilizó la prueba de transición luz/oscuridad. En este ensayo conductual, los ratones fueron colocados en una caja dividida en dos compartimentos: uno iluminado y otro oscuro, separados por una abertura. La prueba se basa en la aversión innata de los roedores a las áreas iluminadas y su preferencia por las zonas oscuras. Durante un periodo de 10 minutos, se evaluó el tiempo que los animales pasaron en cada una de las zonas, lo que proporcionó una medida indirecta de su comportamiento y su tendencia a explorar un entorno nuevo, en un contexto de conflicto entre la exploración y la ansiedad.

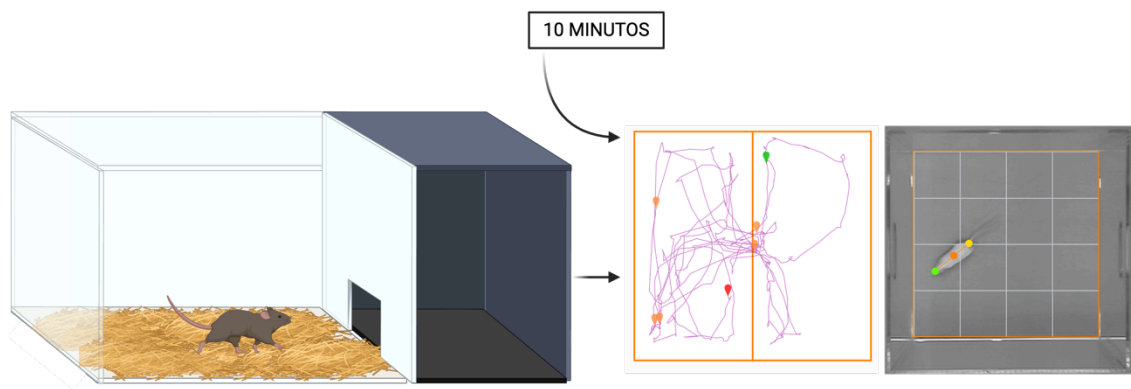


Fig. 8. Prueba de la transición luz y oscuridad. Evaluación del comportamiento tipo ansioso y exploratorio en ratones mediante la prueba de transición luz/oscuridad, registrando el tiempo de permanencia en cada compartimento durante 10 minutos.

6.3.3 Evaluación del efecto histopatológico

6.3.3.1 Técnica histológica

Al finalizar los seis meses de tratamiento en el modelo experimental, los ratones fueron sometidos a eutanasia por exanguinación bajo anestesia, utilizando una combinación de ketamina (100 mg/kg) (#Q7833028, PiSA Labs, General Escobedo, México) y xilacina (10 mg/kg) (#Q7833099, PiSA Labs, General Escobedo, México). Se verificó la ausencia de reflejos de dolor antes de proceder a la apertura de la cavidad torácica.

Para la perfusión, se realizó un corte en la aurícula derecha y se insertó una aguja para administrar solución PBS 1×, seguida de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS, con el objetivo de fijar los órganos. El procedimiento se consideró concluido tras la detención de la actividad cardiopulmonar, el cambio en la coloración de los tejidos y la induración de la piel.

Posteriormente, se recolectó el intestino delgado, el hígado y el riñón de los sujetos experimentales, los cuales fueron post-fijados en PFA al 4% durante 24 horas y procesados para la obtención de cortes congelados o en parafina, con el fin de realizar cortes histológicos seriados de 4 µm de cada uno de ellos. Los cortes de los tejidos

embebidos en parafina fueron desparafinizados en xilol e hidratados en concentraciones decrecientes de alcohol.

6.3.3.2 Tinción con Hematoxilina & Eosina

Para la evaluación de la morfología general, se empleó la tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E), la cual permite diferenciar los distintos componentes celulares y tisulares. Con esta tinción, los núcleos se tiñen de color azul oscuro o violeta, mientras que el citoplasma, las fibras musculares y otros componentes extracelulares adquieren una tonalidad rosada.

Tras la rehidratación de los cortes histológicos, estos fueron sumergidos en hematoxilina de Gill durante 2 minutos y posteriormente lavados con agua corriente durante 5 minutos. A continuación, se realizaron inmersiones sucesivas en alcohol ácido y agua amoniacal, intercaladas con lavados en agua corriente, con el fin de lograr la diferenciación y el viraje. Enseguida, los tejidos fueron teñidos mediante seis inmersiones en eosina, y luego sometidos a un proceso de deshidratación progresiva utilizando soluciones de alcohol en concentraciones crecientes. Finalmente, las muestras fueron incluidas empleando una solución de Entellan (107960, Sigma-Aldrich, St. Louis and Burlington, MA).

6.3.3.3 Tinción Ácido Peryódico de Schiff (PAS)

Con el objetivo de evidenciar la presencia de carbohidratos, como glucógeno, mucinas neutras y componentes de la matriz extracelular, se utilizó la técnica de ácido peryódico de Schiff (PAS). En el intestino delgado, esta tinción permitió el análisis de estructuras como la chapa estriada y las células caliciformes. En el hígado, se empleó para evaluar las

reservas de glucógeno, mientras que en el riñón se utilizó para identificar posibles alteraciones en la membrana basal glomerular.

Una vez rehidratados los cortes histológicos, fueron sumergidos en una solución de ácido peryódico durante 10 minutos y posteriormente fueron lavados con agua. A continuación, se sumergieron en el reactivo de Schiff durante 20 minutos, observando durante ese periodo la aparición de una coloración magenta en las estructuras positivas. Para llevar a cabo la diferenciación, los tejidos se colocaron durante 2 minutos en una solución de enjuague compuesta por ácido clorhídrico 1N y metabisulfito de sodio al 10 % disueltos en agua. Posteriormente, se realizó una contratinción con hematoxilina de Gill durante 2 minutos. Finalmente, las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación progresiva mediante soluciones de alcohol en concentraciones crecientes, y se incluyeron utilizando una solución de Entellan (107960, Sigma-Aldrich)

6.3.3.4 Tinción Tricrómico de Masson

Las lesiones crónicas en los órganos suelen conducir a la sustitución del parénquima dañado por tejido fibroso. Con el propósito de teñir las fibras de colágeno e identificar una posible fibrosis en los órganos evaluados, se llevó a cabo la tinción de Tricrómico de Masson.

Para ello, los cortes fueron expuestos a una solución de Bouin durante 60 minutos a 56°C, ya que este actúa como mordente, aumentando la afinidad de los colorantes por las estructuras a teñir. Posteriormente, se realizó un lavado con agua corriente para asegurar la eliminación de la coloración amarilla en los cortes. Luego, estos fueron incubados

durante 10 minutos en Hematoxilina de Gill, seguidos de un enjuague en agua corriente y, posteriormente, en agua destilada.

A continuación, los cortes se tiñeron en una solución de Fucsina-Escarlata durante 5 segundos, y después se sometieron a una solución con ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10 minutos, con el objetivo de modificar el pH y permitir la tinción específica de las fibras de colágeno. Posteriormente, los tejidos fueron teñidos con una solución de azul de anilina durante 15 segundos y lavados con agua destilada.

Finalmente, las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación progresiva mediante soluciones de alcohol en concentraciones crecientes, y se incluyeron utilizando una solución de Entellan (107960, Sigma-Aldrich).

6.3.3.5 Violeta de cresilo

Con el propósito de evaluar el efecto del CBD en el plexo mientérico del intestino delgado, se llevó a cabo la tinción de violeta de cresilo para observar la presencia de cuerpos de Nissl, que son estructuras características de las neuronas, compuestas por retículo endoplásmico rugoso y ribosomas.

Para ello, los cortes histológicos de intestino delgado fueron rehidratados para posteriormente ser expuestos a una solución de violeta de cresilo al 0.1% durante 10 minutos, seguido de cinco inmersiones en agua destilada, para finalmente ser sometidas a un proceso de deshidratación progresiva mediante soluciones de alcohol en concentraciones crecientes. Finalmente, las tinciones obtenidas se incluyeron utilizando una solución de Entellan (107960, Sigma-Aldrich).

6.3.3.6 Inmunofluorescencia

Con la finalidad de evaluar posibles alteraciones celulares en el plexo mientérico, se utilizaron anticuerpos para el marcaje de neuronas (HUC/HUD) y células gliales entéricas (GFAP).

Se utilizaron cortes histológicos de intestino delgado incluidos en parafina (4 μ m), los cuales fueron desparafinizados en xilol e hidratados en concentraciones decrecientes de alcohol. Posteriormente, se llevó a cabo la recuperación de los antígenos mediante calor, utilizando un buffer de recuperación de antígenos (TRS) Tris/EDTA a pH 9.

A continuación, se realizó un bloqueo con suero de caballo al 10%, seguido de una incubación con los anticuerpos primarios (1:500): anti-HUC/HUD de conejo (ab184267, Abcam) y anti-GFAP de conejo (ab7260, Abcam) durante toda la noche a 4 °C. Después del tiempo de incubación, se realizó un lavado con TBST y los cortes histológicos fueron incubados con el anticuerpo secundario (1:1000) Alexa 488 anti-conejo (A-11008, Thermo Fisher Scientific) durante 1 hora, a temperatura ambiente y en oscuridad.

Finalizada la incubación, se realizó un lavado con TBST. Por último, las secciones fueron incubadas con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 1:10,000 durante 15 minutos, y se montaron con VECTASHIELD Antifade Mounting Medium (H-1000-10, Vector Laboratories).

6.3.4 Análisis morfométricos

6.3.4.1 Tinciones

Las secciones teñidas con las diferentes tinciones fueron examinadas bajo un microscopio de luz Nikon® Eclipse 50i (Nikon, Melville, NY). Las imágenes fueron capturadas con aumentos de 10×, 40× y 100× utilizando el software QCapture Pro 7TM (QImaging Corporation, Canadá). Para el análisis cuantitativo, se utilizó el software ImageJ®.

En las secciones de intestino delgado teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), se evaluaron los siguientes parámetros morfométricos: altura y ancho de las vellosidades, profundidad de las criptas, relación vellosidad/cripta (V/C), número de vellosidades por campo, distancia entre vellosidades, grosor de la mucosa, grosor de la muscular externa y número de células musculares por campo.

Mediante la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS), se cuantificaron las células caliciformes en 10 campos aleatorios por sujeto.

Además, se realizó el análisis del plexo mientérico utilizando la tinción de cristal violeta. Se midieron el área total del plexo, el área del citoplasma neuronal, el área del núcleo neuronal y el número total de neuronas por campo. Para ello, se analizaron 10 campos diferentes por sujeto.

En las muestras procesadas mediante inmunofluorescencia, se evaluó la expresión de los marcadores HUC/D (neuronal) y GFAP (glial). Se realizó el conteo de células positivas en 15 campos por sujeto, y se obtuvo el promedio de células por grupo experimental.

En las muestras hepáticas teñidas con H&E, se cuantificó el número de hepatocitos binucleados en las zonas periportal y centrolobulillar, como indicador indirecto de la actividad regenerativa del tejido hepático, utilizando 10 campos de cada una de las zonas por sujeto.

Asimismo, se evaluó el contenido de colágeno mediante tinción tricrómica de Masson, analizando el porcentaje de área ocupada por fibras colágenas en 10 campos por sujeto. Como control de tinción se utilizaron cortes de piel de los mismos murinos.

El análisis en riñón se centró en el glomérulo, dada su importancia funcional en la filtración. Se midieron los siguientes parámetros morfométricos: área, perímetro, diámetro, circularidad y celularidad glomerular, así como el área del espacio de Bowman. Estas variables se evaluaron en 10 glomérulos por sujeto.

Además, utilizando la tinción de PAS, se evaluaron alteraciones estructurales glomerulares en 15 glomérulos por sujeto para estimar el cambio relativo asociado al tratamiento.

El contenido de colágeno renal fue determinado mediante tinción tricrómica de Masson, analizando 10 campos por muestra.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 Modelo *in vitro*

7.1.1 El CBD disminuye el estrés oxidativo citoplasmático inducido por PQ.

Primeramente, se evaluó el efecto del cannabidiol (CBD) en células SH-SY5Y de fenotipo dopaminérgico. Las células fueron tratadas con el fitocannabinoide a concentraciones de 1, 5, 10 y 25 μM durante 1 y 24 horas, y posteriormente se indujo estrés oxidativo mediante la exposición a paraquat (0.5 mM) durante 24 y 48 horas. Tras los tratamientos, se cuantificó el porcentaje de especies reactivas de oxígeno (ROS) con el objetivo de identificar una dosis de CBD que, por sí sola, no generara estrés celular y que además ofreciera protección frente al daño inducido por el agente oxidante.

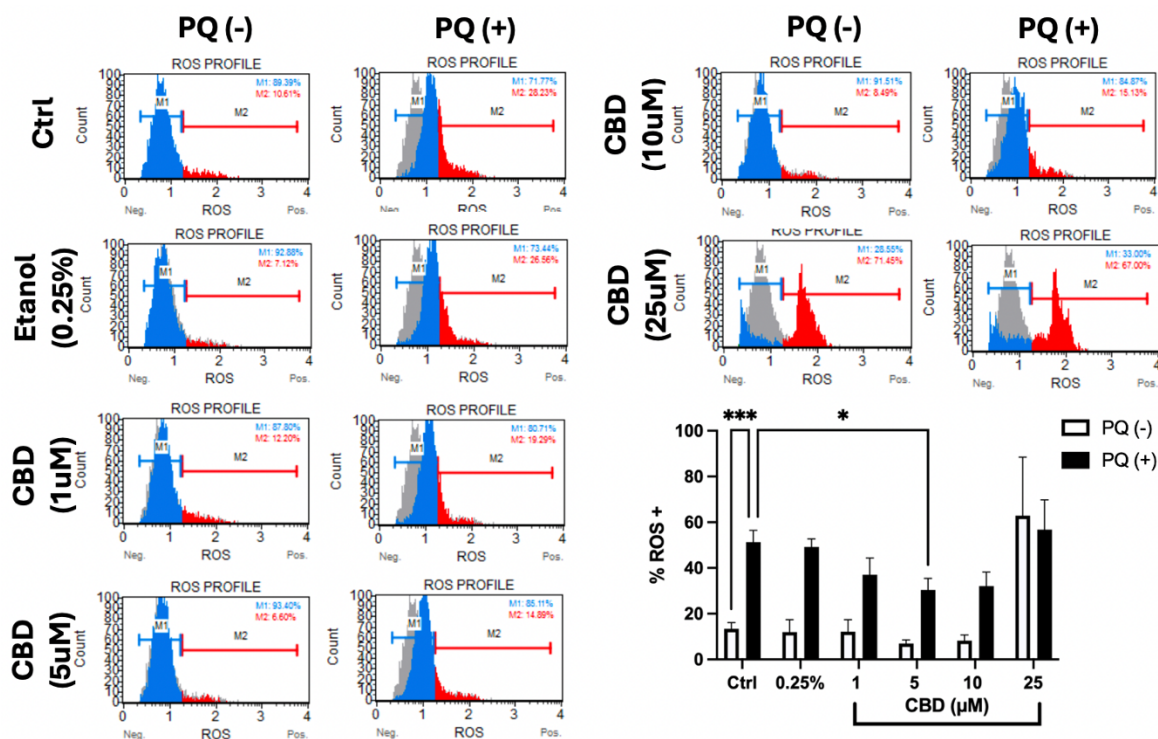


Fig. 9. El pretratamiento con CBD durante 1 hora disminuye los niveles de ROS inducidos por PQ a las 24 horas. Histogramas representativos de células pretratadas con CBD (1, 5, 10 y 25 μM) durante 1 hora, seguidos de exposición a paraquat (PQ) durante 24 horas. El sombreado en gris representa al grupo

control. La gráfica muestra el porcentaje de células positivas a especies reactivas de oxígeno (ROS), evidenciando un incremento significativo en la producción de ROS en células tratadas con 10 μ M de CBD. Asimismo, se observa que la concentración de 25 μ M induce un efecto estresante por sí sola, incluso en ausencia de PQ. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$

Los resultados mostraron que las concentraciones de 1, 5 y 10 μ M de CBD no incrementaron de manera significativa los niveles de ROS cuando se administraron de forma aislada, por lo que fueron consideradas seguras para su uso tanto a las 24 como a las 48 horas (fig. 9). En contraste, la concentración de 25 μ M provocó un aumento significativo en la producción de ROS incluso en ausencia de paraquat, superando los niveles inducidos por el herbicida. Por esta razón, dicha concentración fue descartada para los experimentos posteriores. Reforzar con los valores de p entre paréntesis.

Adicionalmente, se incluyó un control con etanol a la concentración equivalente a la utilizada para disolver 25 μ M de CBD, con el fin de descartar efectos tóxicos atribuibles al vehículo. Se observó que el etanol por sí solo no indujo un incremento significativo en los niveles de ROS, por lo que no se consideró responsable del efecto observado con dicha dosis de CBD.

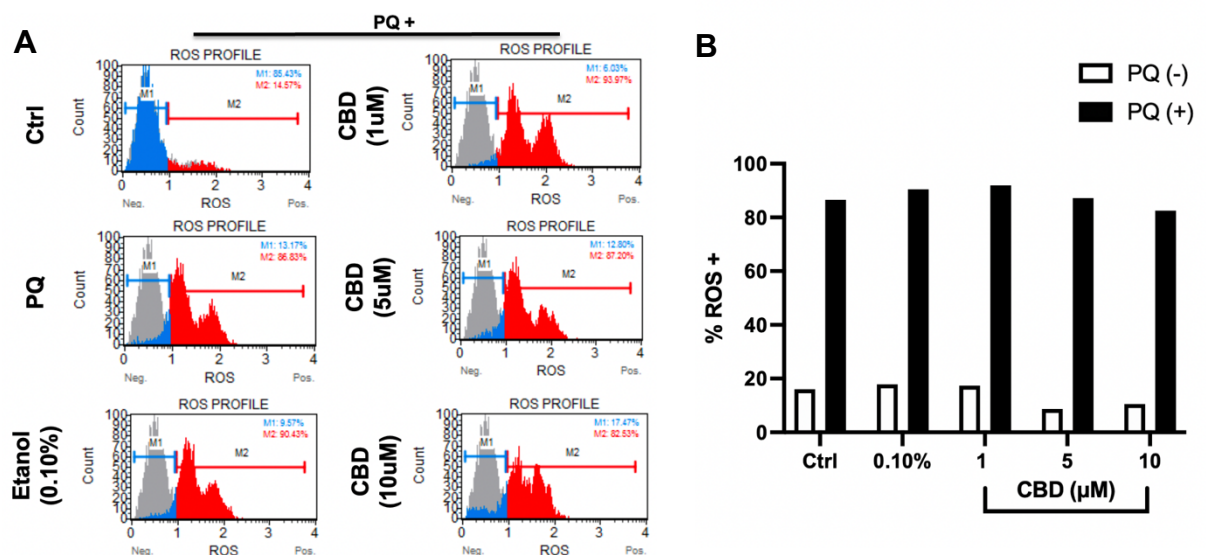


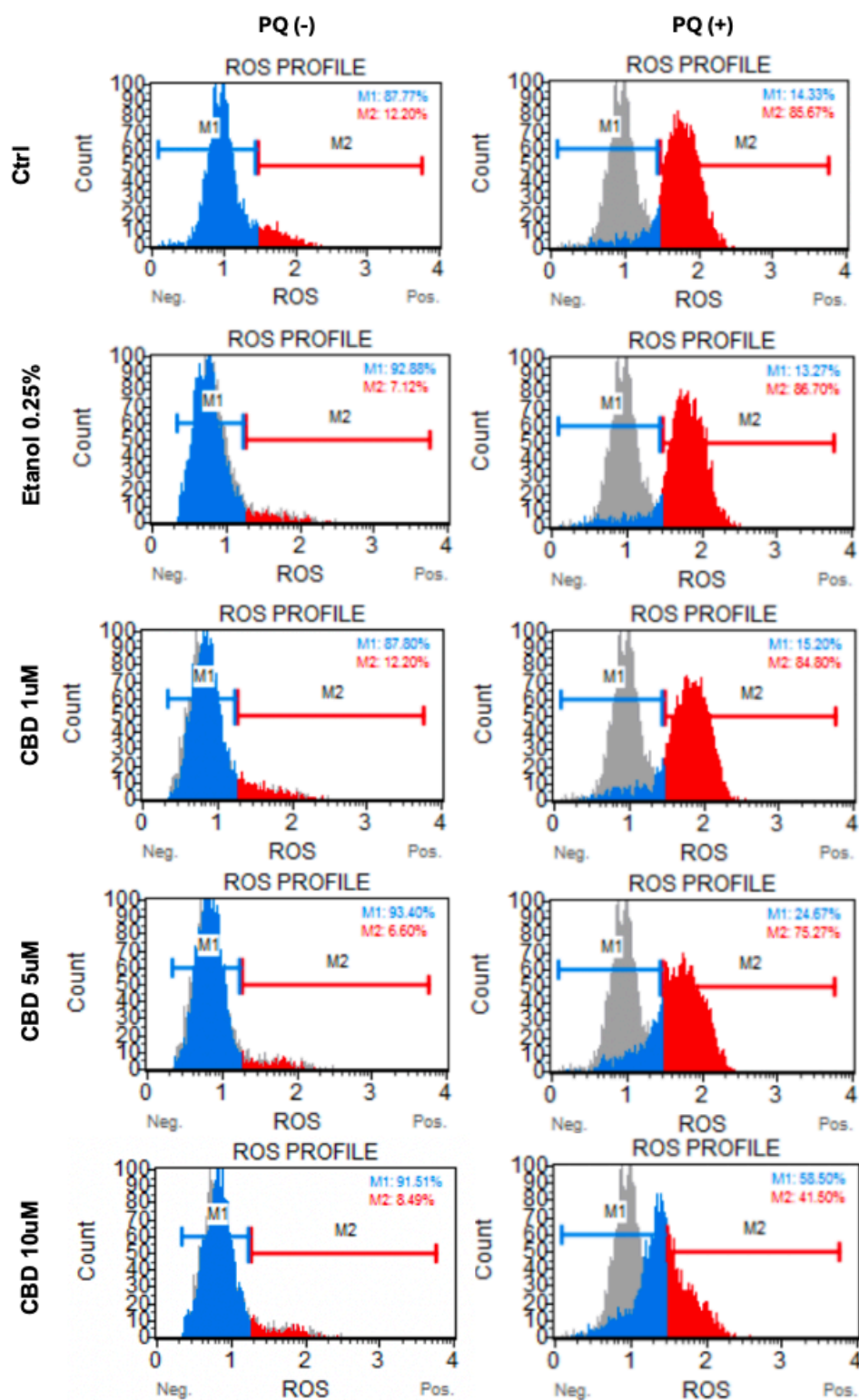
Fig. 10. El pretratamiento con CBD durante 1 hora no disminuye los niveles de ROS inducidos por PQ a las 48 horas. A. Histogramas representativos de células pretratadas con CBD (1, 5, 10 μ M) durante 1 hora, seguidos de exposición a PQ durante 48 horas. El sombreado en gris representa al grupo control. B. La gráfica muestra el porcentaje de células positivas a especies reactivas de oxígeno (ROS), indicando que, bajo el esquema de tratamiento empleado, el CBD no confiere protección frente al estrés oxidativo inducido por PQ. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$

Además, se encontró que la concentración de 5 μ M confería una protección significativa frente al estrés oxidativo inducido por el paraquat, en comparación con las células tratadas únicamente con el agente. No obstante, este efecto protector se perdió cuando la exposición al paraquat se prolongó a 48 horas (Fig. 10).

A partir de estos resultados, y considerando que el CBD ha sido reportado como modulador de diversas vías celulares involucradas en la respuesta antioxidante y antiinflamatoria, como NRF2 y PPAR γ ²², se decidió implementar un pretratamiento extendido de 24 horas. Este enfoque buscó favorecer la activación de mecanismos de defensa antioxidante y antiinflamatoria antes de la inducción del estrés oxidativo.

Con este esquema experimental (Fig.11), se observó que, tras 48 horas de exposición a paraquat, el pretratamiento con CBD a una concentración de 10 μ M redujo significativamente, en aproximadamente un 50%, el porcentaje de células estresadas, en comparación con el grupo tratado únicamente con paraquat. Por lo tanto, se determinó que la concentración de 10 μ M de CBD, con un pretratamiento de 24 horas, es óptima para inducir una respuesta antioxidante sin causar daño celular por sí sola.

A



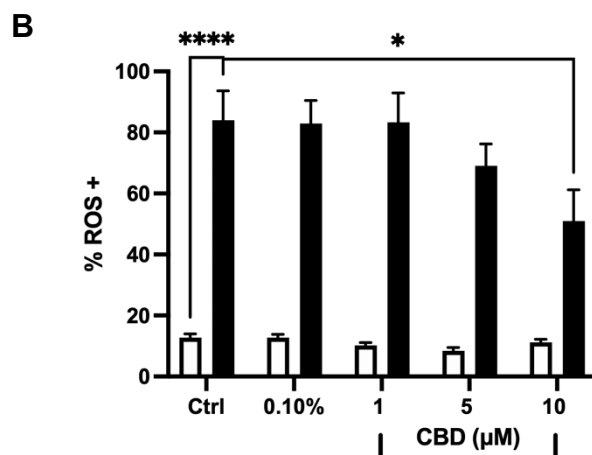


Fig. 11. El pretratamiento con CBD durante 24 hora disminuye los niveles de ROS inducidos por PQ a las 48 horas. A. Histogramas representativos de células pretratadas con CBD (1, 5, 10 μ M) durante 1 hora, seguidos de exposición a PQ durante 48 horas. El sombreado en gris representa al grupo control. B. La gráfica muestra el porcentaje de células positivas a especies reactivas de oxígeno (ROS), indicando que, bajo el esquema de tratamiento empleado, el CBD confiere protección frente al estrés oxidativo inducido por PQ a la concentración de 10 μ M del 50%. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$

7.1.2 El CBD no previene la muerte celular inducida por PQ

A partir de los resultados obtenidos, y considerando que el PQ ejerce su efecto principalmente a nivel mitocondrial, se evaluó el impacto del esquema de tratamiento seleccionado sobre la actividad mitocondrial mediante la prueba de MTT. Posteriormente, las células fueron tratadas de acuerdo con el protocolo previamente descrito, y se analizó el efecto del CBD sobre la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión con azul de tripano. La viabilidad fue cuantificada mediante el conteo de células con un contador automático, obteniéndose así el porcentaje de células viables.

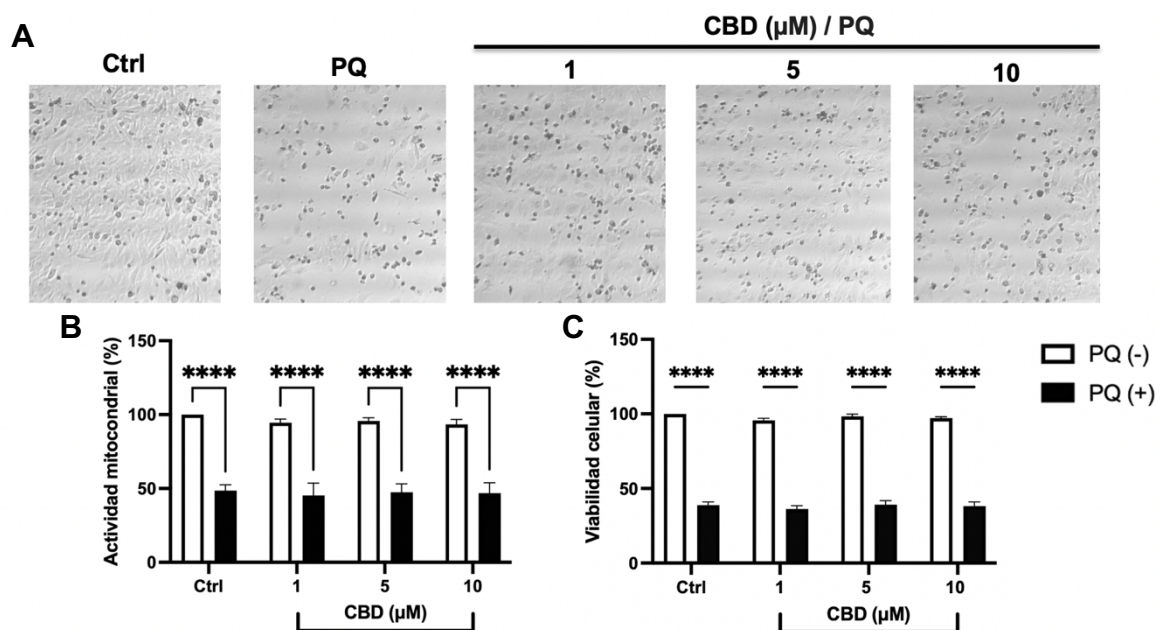


Fig. 12. El pretratamiento con CBD durante 24 hora no previene la muerte celular inducida por PQ a las 48 horas. A. Imágenes representativas de células SH-SY5Y observadas mediante microscopía óptica tras la exposición a las distintas condiciones experimentales. B. Porcentaje de actividad mitocondrial evaluado mediante la prueba de MTT. C. Porcentaje de viabilidad celular determinado mediante la prueba de exclusión por azul de tripano. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$

Los resultados obtenidos mediante ambos métodos de evaluación, la prueba de MTT (Fig. 12B) y la exclusión de captación con azul de tripano (Fig. 12C), no mostraron una mejora significativa en la viabilidad celular ni en la mitigación del daño causado por la inducción de estrés oxidativo con paraquat. A pesar del tratamiento con CBD, en la prueba de MTT no se detectó un aumento en la producción de formazán, lo que indicaría una mejora en la actividad mitocondrial; en consecuencia, no se observó un incremento en la cantidad de células viables en comparación con el grupo control.

Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones experimentales y concentraciones evaluadas, el CBD no ejerció un efecto protector significativo frente al daño celular inducido por el paraquat.

7.2 Modelo *in vivo*

7.2.1 Evaluación del peso corporal y la supervivencia

Durante el periodo de tratamiento, se realizó un seguimiento semanal del peso corporal de los animales en ambos grupos experimentales. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso entre los ratones del grupo control y los tratados con CBD a lo largo del experimento (fig. 13), lo que sugiere que la administración crónica de CBD no afectó el crecimiento, el peso ni la supervivencia de los ratones utilizados.

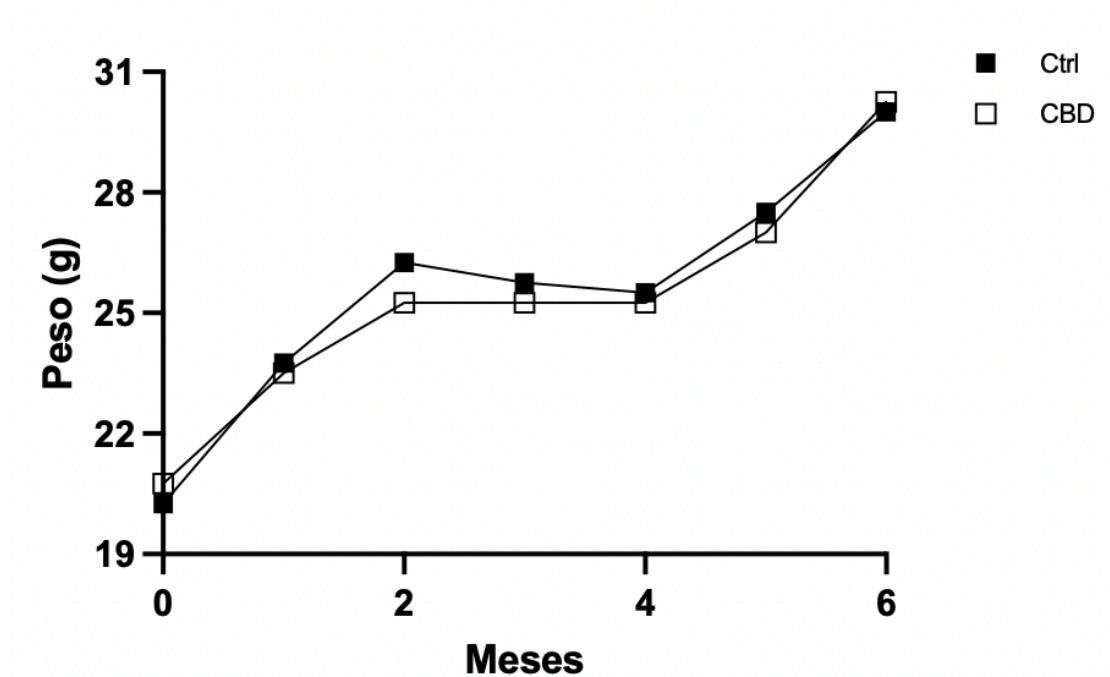


Fig. 13. La administración crónica de CBD no altera el peso corporal de los ratones. Evaluación del peso corporal durante el periodo experimental. Promedio de peso corporal (en gramos) de los ratones del grupo control y del grupo tratado con CBD a lo largo de los meses de tratamiento.

7.2.2 Evaluación de la función motora y cognitiva

7.2.2.1 El CBD no afecta el bienestar general

La incapacidad de realizar tareas innatas es uno de los principales signos de un deterioro cognitivo y motor en los sujetos ²⁹. Al analizar el porcentaje de alimento desplazado (Fig. 14) durante un periodo de 12 horas, a los tres y seis meses de administración, no se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados. Esto demuestra que la administración crónica de CBD no afecta el bienestar general de los sujetos de estudio.

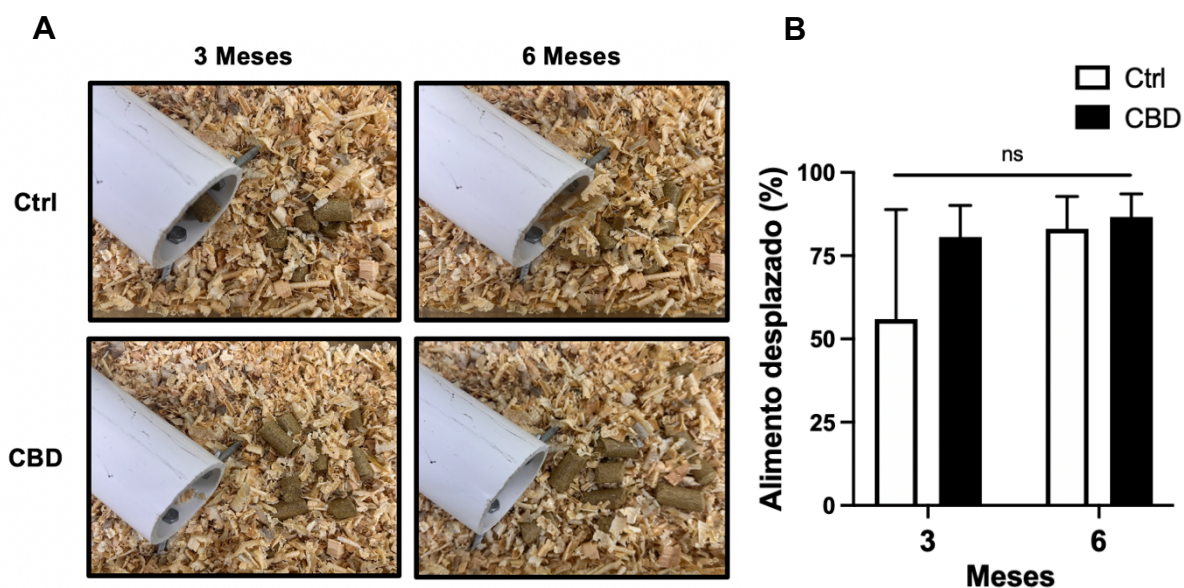


Figura 14. La administración oral de CBD no afecta el bienestar general. A. Imágenes representativas del desplazamiento de alimento evaluado a los 3 y 6 meses de administración del fitocannabinoide; B. Evaluación del porcentaje de alimento desplazado; no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos evaluados. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

7.2.2.2 La administración oral de CBD no causa deterioro cognitivo

Con el objetivo de evaluar posibles alteraciones cognitivas asociadas a la administración crónica de CBD, se llevó a cabo la prueba del nido. Esta prueba se basa en el

comportamiento natural y esencial para los roedores, ya que construir un nido adecuado es crucial para su bienestar y supervivencia.

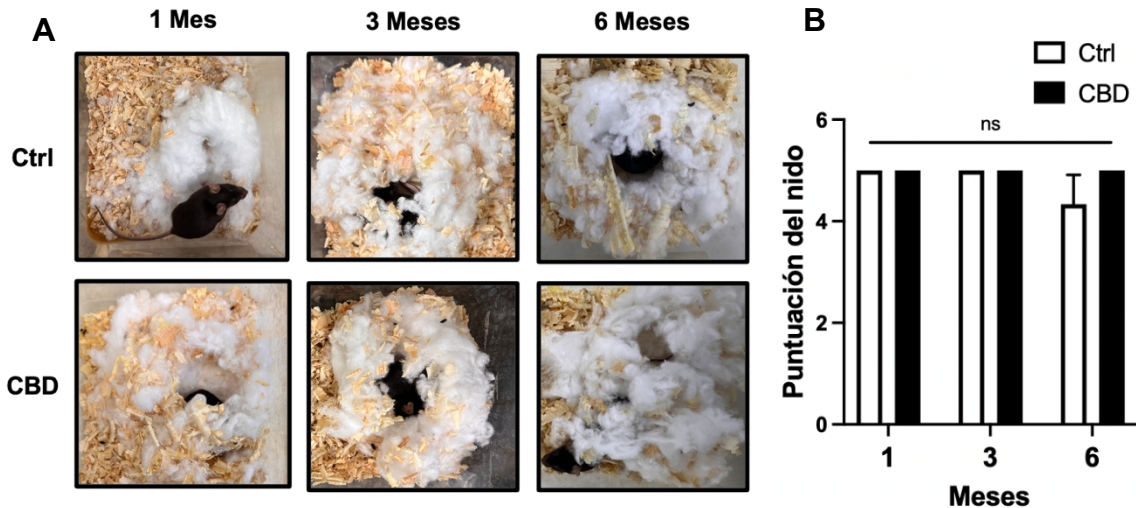


Fig. 15. La administración prolongada de CBD no afecta el desempeño cognitivo. A. Imágenes representativas de los nidos contruidos a los 1, 3 y 6 meses de tratamiento, en las que se observa que tanto el grupo control como el grupo tratado con CBD obtuvieron consistentemente puntuaciones máximas durante el periodo de evaluación. B. Escala de calificación de los nidos: 5 = construcción óptima, 4 = domo incompleto, 3 = forma de copa, 2 = nido plano, 1 = material manipulado y 0 = material no manipulado. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

Durante todo el periodo de tratamiento, tanto los ratones tratados con CBD como los controles obtuvieron de manera consistente las puntuaciones máximas (Fig. 15B), construyendo nidos con entrada y salida, con una estructura completa en forma de domo. Estos resultados indican que la administración crónica de CBD no afecta negativamente el desempeño cognitivo evaluado mediante esta prueba. Puedes poner alguna estadística descriptiva aquí (ej., "medias de $X \pm Y$ ") incluso si no hay significancia para mostrar la consistencia.

7.2.2.3 La administración oral de CBD no causa disfunción motora

Se ha reportado que el cannabidiol (CBD) puede modular la liberación de neurotransmisores al interactuar con receptores como el 5-HT_{1A}, TRPV1 y GPR55, lo que sugiere un potencial impacto sobre la función neuromuscular²⁶. Por ello, con el propósito de identificar posibles efectos secundarios derivados de su administración crónica y determinar si este compuesto inducía alteraciones en el equilibrio o la coordinación motora, se evaluó la función motora de los ratones mediante la prueba de la marcha. A través de esta prueba, se midieron parámetros como la longitud y el ancho de la zancada, tanto anterior como posterior (Fig. 16 A).

Los resultados obtenidos (Fig. 16 B-D) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con CBD y el grupo control en ninguno de los parámetros analizados. Estos hallazgos indican que la administración crónica de CBD no provoca alteraciones motoras en los sujetos evaluados.

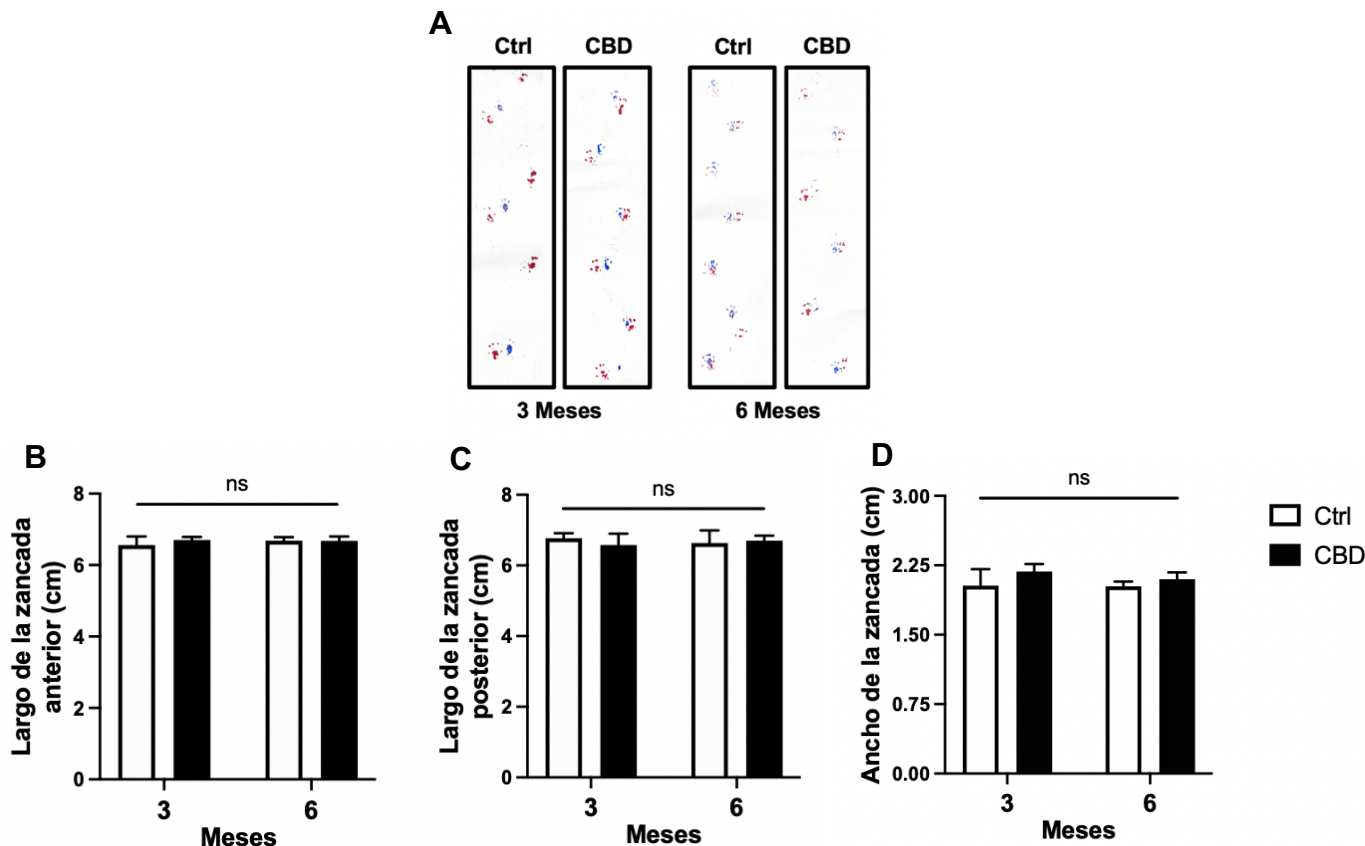


Fig. 16. El CBD no compromete el desempeño motor tras administración crónica. A. Imágenes representativas del patrón de caminata obtenidas mediante la prueba de marcha, incluyendo los parámetros analizados. B-C. Análisis de la longitud de la zancada anterior y posterior, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo tratado con CBD. D. Evaluación del ancho de la zancada, sin diferencias significativas entre los grupos experimentales. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

7.2.2.4 La exposición oral crónica de CBD no afecta el comportamiento

exploratorio y disminuye el comportamiento tipo ansioso

Debido a que al unirse al receptor 5-HT_{1A} el CBD puede aumentar la liberación de serotonina, mecanismo que ha sido asociado con sus efectos ansiolíticos y antidepresivos, se realizaron dos pruebas conductuales para evaluar el comportamiento tipo ansioso y exploratorio de los sujetos de estudio.

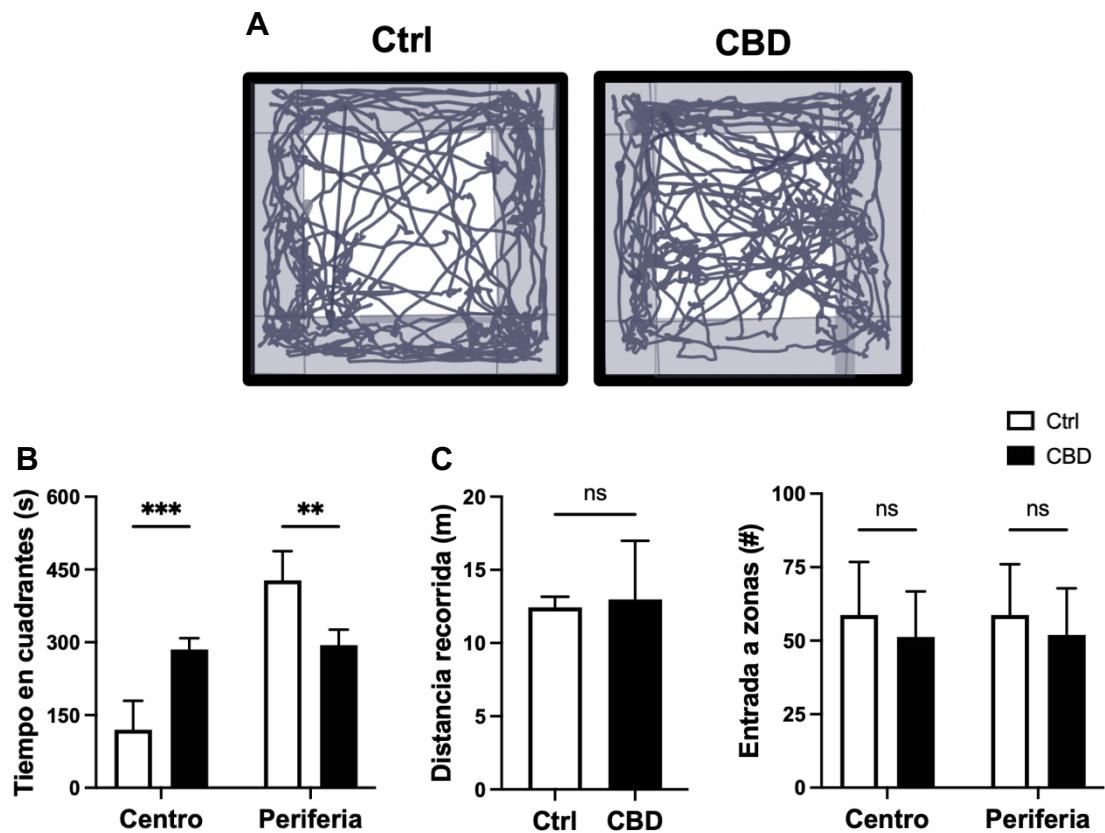


Fig. 17. La administración de CBD diaria modifica la preferencia espacial sin alterar el comportamiento exploratorio. A. Trayectoria representativa del recorrido en la arena, donde se observa que el grupo control permaneció principalmente en la periferia, mientras que el grupo tratado con CBD pasó mayor tiempo en la zona central. B. Tiempo de permanencia en cada zona. Se observa una diferencia significativa entre los grupos, con mayor permanencia del grupo tratado con CBD en la zona central. C. Evaluación de la distancia recorrida y número de entradas a ambas zonas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

La primera de ellas fue la prueba de campo abierto (Fig. 17). Transcurridos los seis meses de administración, se observa en los track plots que los ratones del grupo control mostraron una marcada preferencia por la zona periférica del campo. Este patrón se relaciona con el comportamiento natural de los roedores, ya que estos tienden a evitar áreas abiertas por considerarlas zonas de mayor vulnerabilidad ante posibles depredadores.

En contraste, los ratones tratados con CBD pasaron mayor tiempo en el centro del campo, lo cual podría sugerir una disminución del comportamiento tipo ansioso atribuible a la administración del fitocannabinoide. No obstante, este hallazgo no tuvo un impacto en el comportamiento exploratorio general, ya que ambos grupos realizaron un número comparable de entradas en ambos cuadrantes y recorrieron distancias similares.

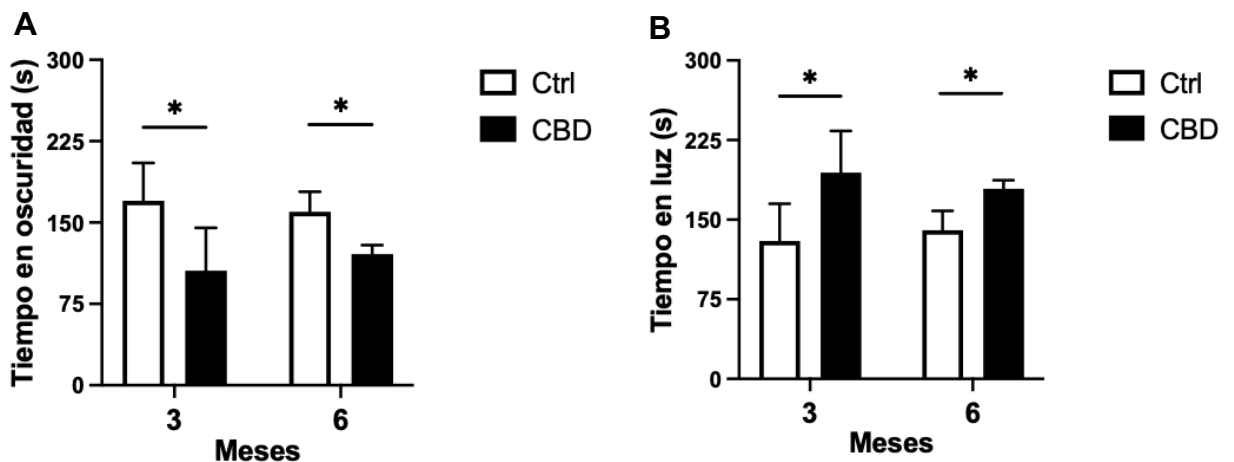


Fig. 18. El CBD aumenta la disposición de los sujetos a explorar áreas iluminadas y expuestas. A. Tiempo de permanencia en la zona oscura a los tres y seis meses. El grupo control permanece

significativamente más tiempo en esta área en comparación con el grupo tratado con CBD. B. Tiempo de permanencia en la zona iluminada a los tres y seis meses. El grupo tratado con CBD presenta un aumento significativo en el tiempo pasado en esta zona, lo que sugiere una mayor disposición exploratoria. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos, se realizó la prueba de transición luz-oscuridad (Fig. 18). En esta segunda prueba, realizada a los 3 y 6 meses de tratamiento, se observó que los ratones del grupo control pasaron significativamente más tiempo en la zona oscura que en la zona iluminada. Este comportamiento es característico de un estado tipo ansioso, ya que los roedores, al ser animales de presa, tienden a evitar espacios abiertos o con iluminación intensa, buscando refugio en áreas oscuras.

En contraste, los ratones tratados con CBD permanecieron por más tiempo en la zona iluminada, lo cual sugiere una reducción del comportamiento tipo ansioso. Esta mayor disposición a explorar zonas expuestas indica un posible efecto ansiolítico inducido por la administración crónica del fitocannabinoide.

Este resultado, en conjunto con lo observado previamente en la prueba de campo abierto, refuerza la hipótesis de que el CBD ejerce un efecto modulador de la ansiedad, disminuyendo la aversión de los ratones a ambientes abiertos o iluminados y favoreciendo una mayor interacción con ellos.

7.2.3 Evaluación del efecto histopatológico

Para determinar el efecto del CBD sobre los órganos involucrados en su metabolismo, se realizó un análisis histopatológico del intestino delgado, hígado y riñón.

7.2.3.1 La administración oral de CBD no causa alteraciones morfológicas en la mucosa del intestino delgado

Primeramente, puesto que el CBD se administró por vía oral, y dado que existen diversos receptores que responden al mismo ²⁶, la mucosa del intestino delgado podría sufrir alteraciones. Por lo tanto, se procedió a su análisis, ya que cualquier alteración en esta región podría reflejar un impacto en la absorción del CBD y, por ende, en su biodisponibilidad, lo cual influiría en su distribución sistémica. La morfología intestinal fue analizada mediante la medición de la altura de las vellosidades (AV), la profundidad de las criptas (PC), la proporción vellosidad/cripta y el grosor de la capa mucosa (GM) (Fig. 19). Estos parámetros no mostraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con CBD.

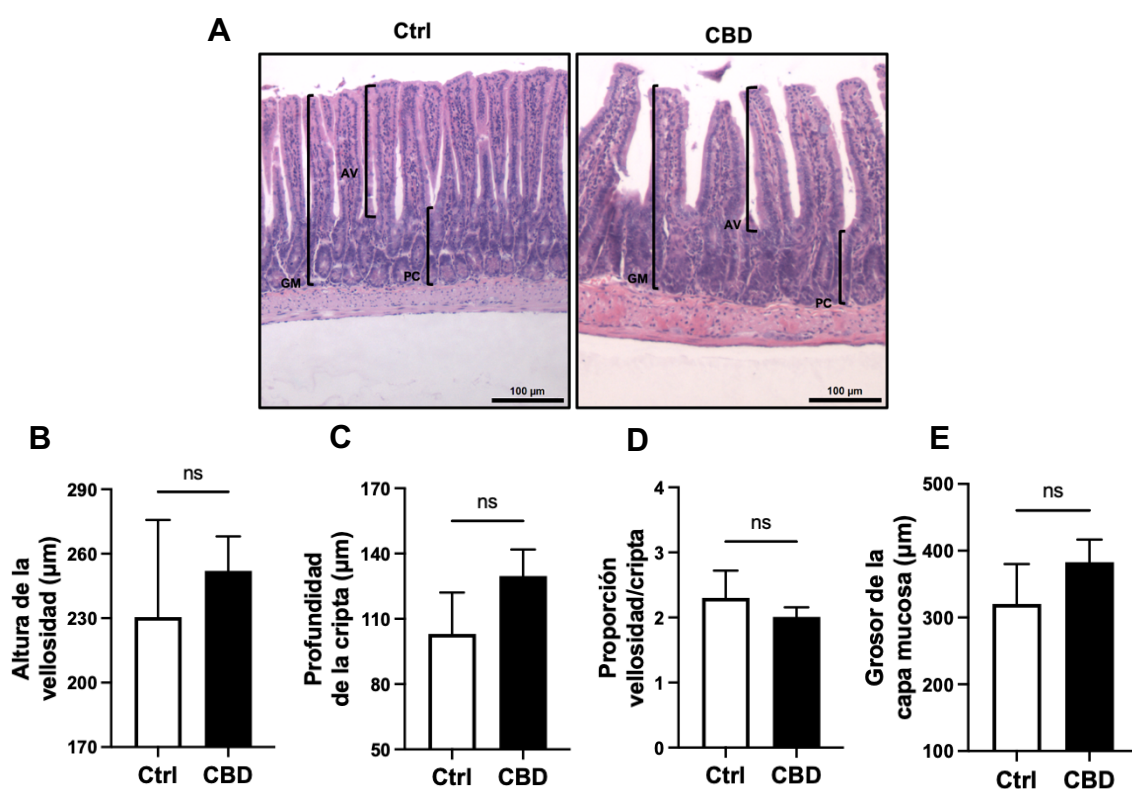


Fig. 19. El CBD no causa alteraciones en la mucosa del intestino delgado. A. Microfotografías representativas de la mucosa del intestino delgado teñida con H&E, en donde se muestran los parámetros evaluados. B-E. Mediciones morfométricas de la altura de las vellosidades (AV), profundidad de las criptas (PC), proporción vellosidad/cripta y grosor de la capa mucosa (GM), donde no se observaron diferencias significativas entre los grupos evaluados. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

Adicionalmente, se evaluó el ancho de las vellosidades, el número de vellosidades por campo y la distancia entre ellas (DV), sin encontrarse variaciones significativas entre los grupos analizados (Fig. 20). Añadir que es ns.

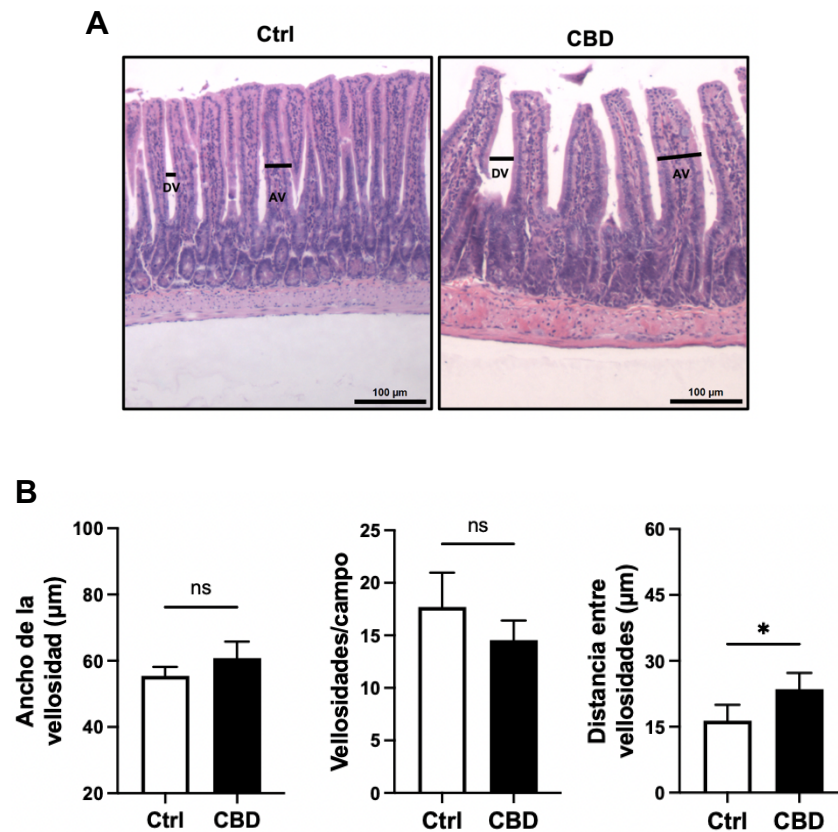


Fig. 20. La administración oral de CBD influye en la distribución espacial de las vellosidades en la mucosa del intestino delgado. A. Microfotografías representativas de la mucosa del intestino delgado teñida con H&E, en donde se muestran los parámetros evaluados. B. Mediciones morfométricas del ancho de las vellosidades (AV), número de vellosidades por campo y distancia entre vellosidades. Solo esta última presentó una diferencia significativa, observándose una mayor distancia entre vellosidades en el grupo tratado con CBD. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

7.2.3.2 La administración oral de CBD induce hipertrofia en las células musculares lisas de la muscular externa

Posterior a la evaluación de la mucosa, se observó un incremento en el grosor de la muscular externa (ME) (Fig. 21A), por lo que se procedió a cuantificar este parámetro. El

grupo tratado con CBD presentó un aumento significativo (Fig. 21B) en el grosor de la ME en comparación con el grupo control. Para determinar la causa de este engrosamiento, se realizó el conteo de células musculares lisas, sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos analizados (Fig. 21C). Estos resultados sugieren que el incremento en la ME podría estar asociado a un proceso de hipertrofia inducido por el tratamiento con CBD. Incluye el p-valor para el aumento significativo del grosor.

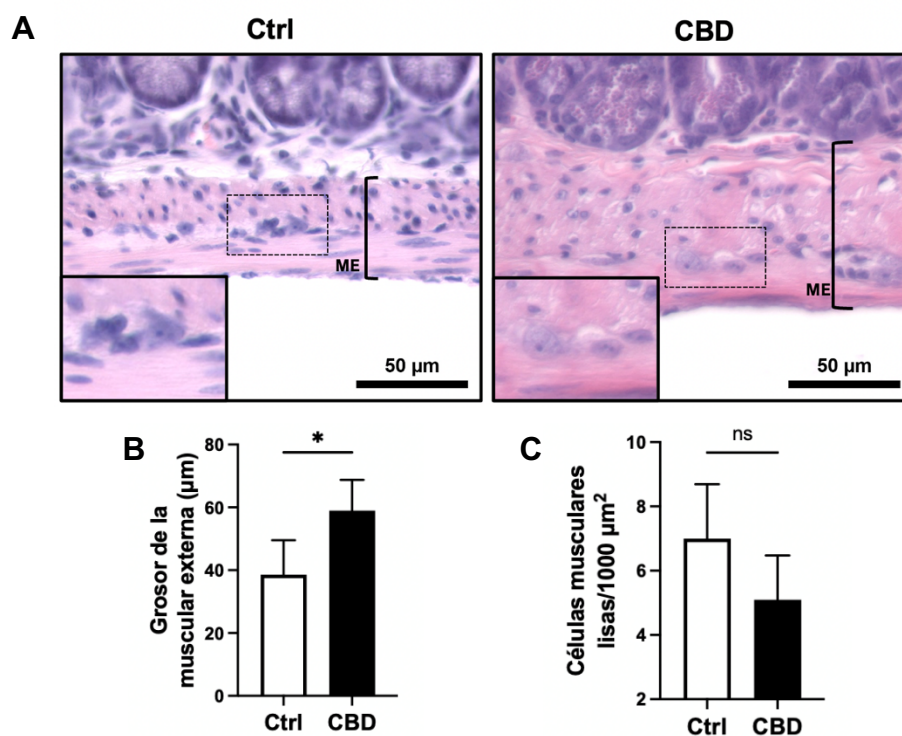


Fig. 21. La administración oral de CBD induce hipertrofia en las células musculares lisas de la muscular externa del intestino delgado. A. Microfotografías representativas de una sección transversal del intestino delgado teñida con H&E, donde se observa la capa de la muscular externa. B. Mediciones morfométricas del grosor de la muscular externa. C. Cuantificación del número de células musculares lisas. El grupo tratado con CBD presentó un incremento significativo en el grosor de esta capa en comparación con el grupo control. No se observaron diferencias significativas en el número de células musculares lisas entre ambos grupos, lo que sugiere una respuesta de tipo hipertrófico más que hiperplásica. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

7.2.3.3 La administración oral de CBD induce cambios morfológicos en el plexo mientérico

Dado que se observó un incremento significativo en el grosor de la muscular externa en el grupo tratado con CBD, se consideró pertinente evaluar posibles alteraciones en el plexo mientérico (Fig. 22A), estructura ubicada entre las capas musculares longitudinal y circular, fundamental en la regulación de la motilidad intestinal. Con el objetivo de explorar si el CBD inducía cambios a nivel neuroentérico, se realizaron análisis morfométricos del área del plexo mientérico, área citoplasmática neuronal, área nuclear, proporción núcleo/citoplasma y número de neuronas por campo.

Los resultados mostraron que el grupo tratado con CBD presentó un aumento significativo en el área del plexo mientérico, así como en el área citoplasmática de las neuronas, acompañado de una disminución en la proporción núcleo/citoplasma (Fig. 22 B-E). Además, estos cambios se asociaron con una reducción en el número de neuronas por área analizada (Fig. 22F). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la administración oral de CBD modula la arquitectura del plexo mientérico, promoviendo una respuesta hipertrofica en las células neuronales entéricas. Incluye los p-valores para cada uno de los parámetros significativamente alterados.

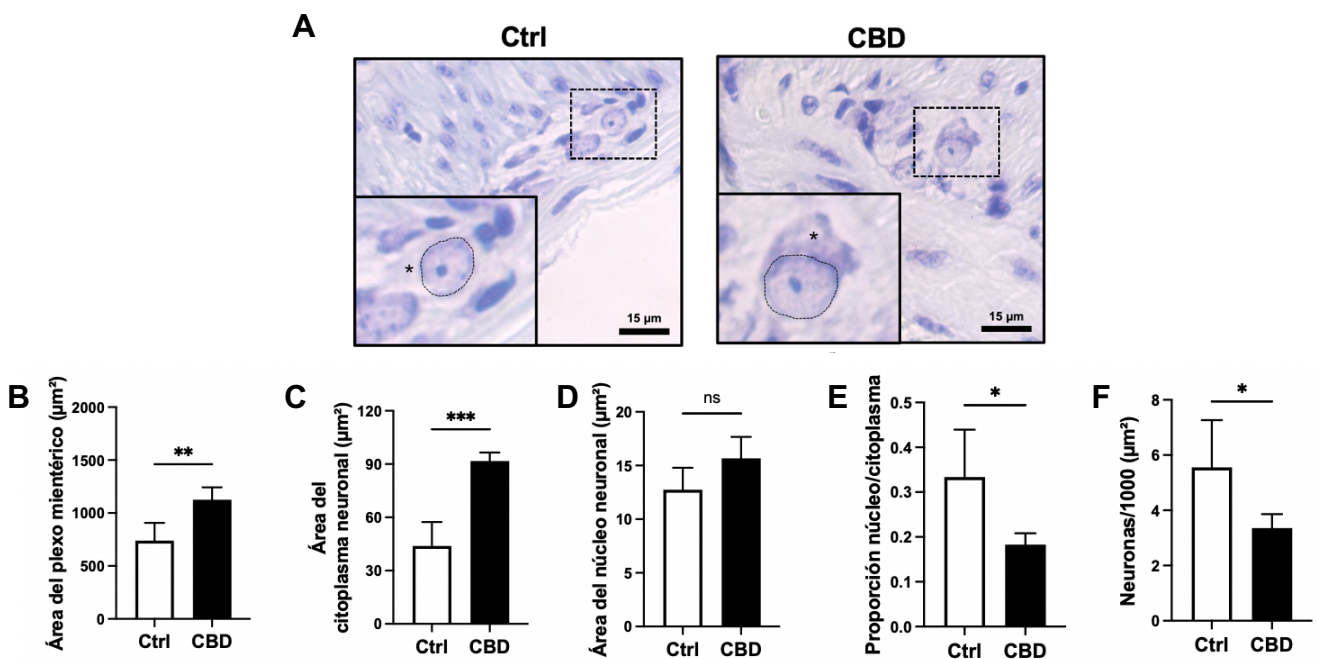


Fig. 22. El CBD induce hipertrofia en las células del plexo mientérico. A. Microfotografías representativas de una sección transversal del intestino delgado teñida con H&E (40X). En el recuadro amplificado se observa el plexo mientérico localizado entre las capas de músculo liso: circular interna y longitudinal externa. B. Análisis morfométrico del área total del plexo mientérico, que mostró un incremento significativo en los ratones tratados con CBD en comparación con el grupo control. C. Evaluación del área

citoplasmática de las neuronas mientéricas, la cual se encontró significativamente aumentada en el grupo CBD, indicando una posible hipertrofia celular. D. Medición del área nuclear neuronal, en la que no se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados. E. Proporción núcleo/citoplasma, que resultó significativamente menor en el grupo tratado con CBD, consistente con un aumento selectivo del volumen citoplasmático. F. Conteo del número de neuronas por área del plexo, donde se evidenció una reducción en el grupo tratado con CBD, posiblemente asociada al incremento del tamaño celular y del área total del plexo. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

Ante los cambios morfológicos observados en el plexo mientérico tras la administración de CBD, se consideró pertinente profundizar en la caracterización de la población celular presente en esta región. Para ello, se emplearon técnicas de inmunomarcaje utilizando el marcador HuC/HuD (Fig. 23A), ampliamente validado para la identificación de neuronas entéricas. El análisis cuantitativo no reveló diferencias significativas en el número de neuronas HuC/HuD positivas entre el grupo control y el grupo tratado con CBD. Este hallazgo sugiere que el tratamiento con CBD no modifica la población neuronal del plexo mientérico ni induce cambios asociados a la neurogénesis.

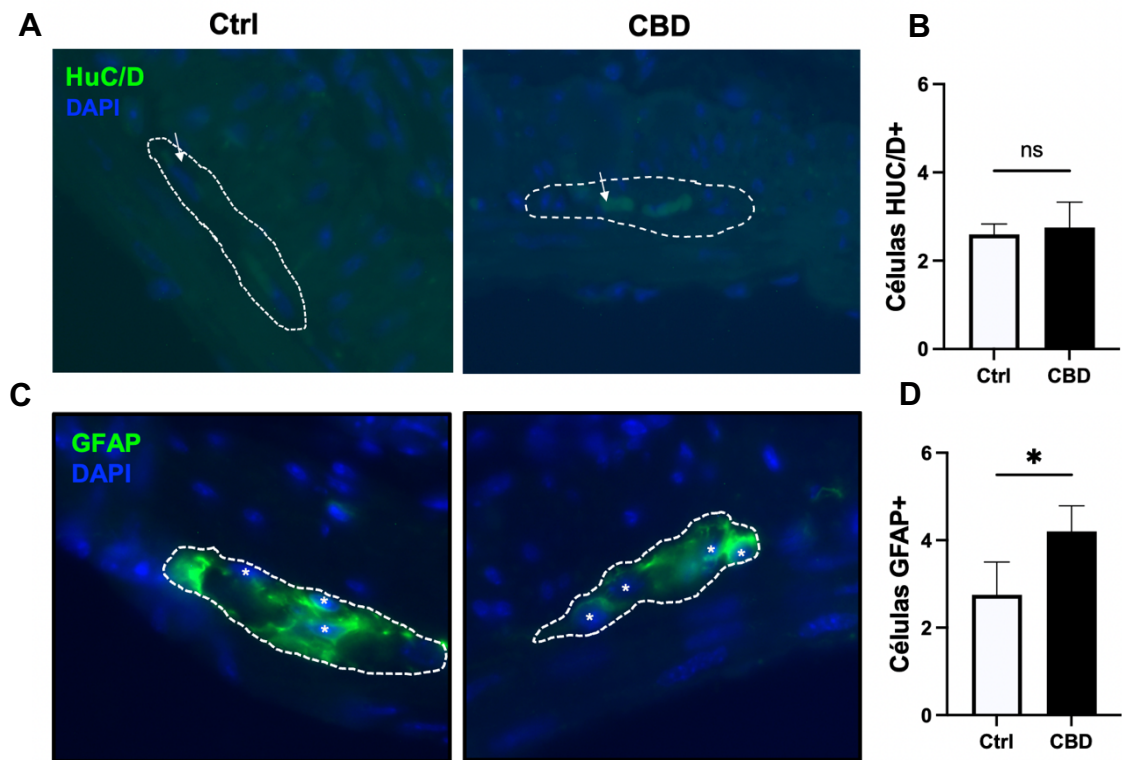


Fig. 23. El CBD no modifica la población neuronal del plexo mientérico. A. Inmunofluorescencia representativa de las células neuronales del plexo meintérico marcadas con HuC/D (100×), donde se observa el plexo mientérico localizado entre las capas muscular circular interna y longitudinal externa. B. Cuantificación de las células positivas a HuC/D, no se observó diferencia significativa en los grupos

analizados. C. Inmunofluorescencia representativa de células gliales marcadas con GFAP. D. Cuantificación de células positivas a GFAP, se muestra un incremento significativo en el grupo tratado con CBD. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

A partir de estos resultados, se evaluó mediante inmunofluorescencia si el tratamiento con CBD impactaba en el número de células gliales entéricas, utilizando GFAP (Fig. 23C) como marcador. Se observó un aumento significativo en la cantidad de células GFAP positivas en el grupo tratado con CBD en comparación con el grupo control. Estos hallazgos sugieren que el CBD podría modular la interacción neurona-glía, favoreciendo un microambiente que promueve el mantenimiento y la estabilidad neuronal en el plexo mientérico.

7.2.3.4 El CBD no modifica la deposición de colágeno en el intestino delgado

Con el objetivo de evaluar posibles alteraciones en la composición de la matriz extracelular del intestino delgado, se realizó la tinción de tricrómico de Masson, con el fin de identificar cambios estructurales asociados a procesos de remodelación tisular, fibrosis o hipertrofia. En las secciones analizadas se puso especial atención en la submucosa (Fig. 24), donde no se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado con CBD y el grupo control. Estos resultados sugieren que el tratamiento con CBD no modifica la deposición de colágeno en la submucosa del intestino delgado.

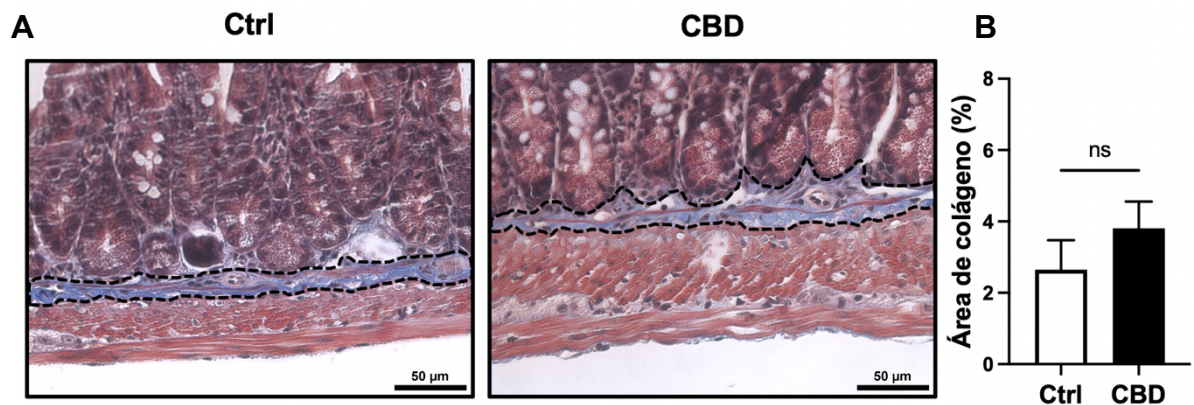


Fig. 24. El CBD no altera el depósito de colágeno en el intestino delgado. A. Microfotografías representativas de la submucosa del intestino delgado teñida con la técnica de tricrómico de Masson (40 $\times$),

donde el colágeno se observa de color azul. B. Cuantificación del porcentaje de área positiva para colágeno en la región submucosa. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado con CBD y el grupo control. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

7.2.3.5 La administración oral de CBD aumenta el número de células caliciformes en el intestino delgado

Con la finalidad de evaluar posibles alteraciones en la producción de mucinas y en la población de células secretoras del epitelio intestinal, se realizó la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS), la cual permite resaltar polisacáridos y mucopolisacáridos presentes en el moco¹. Por ello, se cuantificó el número de células PAS positivas en las vellosidades del intestino delgado (Fig. 25). Los ratones tratados con CBD mostraron un aumento en la abundancia de células caliciformes en comparación con el grupo control, lo cual podría estar relacionado con una mayor necesidad de reforzar la barrera epitelial frente a posibles cambios en las condiciones del lumen intestinal. Incluye el p-valor para el aumento significativo.

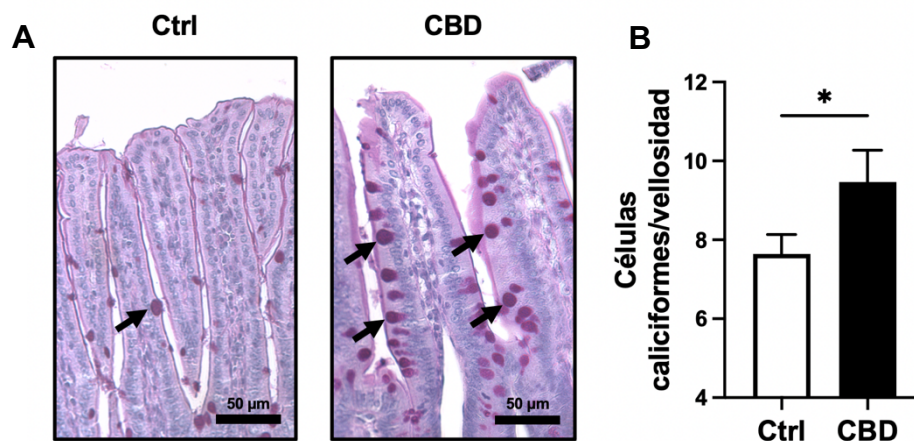


Fig. 25. El CBD aumenta la cantidad de células caliciformes en las vellosidades del intestino delgado. A. Microfotografías representativas de la mucosa del intestino delgado teñida con la técnica de PAS (40×), donde las células caliciformes se observan de color magenta. B. Cuantificación del número de células PAS positivas por vellosidad. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado con CBD y el grupo control. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

7.2.3.6 La administración oral de CBD no causa alteraciones morfológicas en el hígado

Dado que el cannabidiol (CBD) es metabolizado en gran parte por el sistema enzimático hepático, particularmente por las enzimas del citocromo P450 ⁵¹, se analizaron cortes histológicos de hígado con el objetivo de detectar posibles alteraciones estructurales asociadas a la administración de este fitocannabinoide. A medida que la sangre fluye desde la periferia del lobulillo hacia la vena central, los hepatocitos participan activamente en el procesamiento de nutrientes, el metabolismo de fármacos y la eliminación de toxinas ⁵². En este trayecto, los hepatocitos de la zona periportal (zona 1) reciben mayor oxigenación y aporte de nutrientes, mientras que los de la zona centrolobulillar (zona 3), más próximos a la vena central, están más expuestos a productos metabólicos intermedios y posibles agentes tóxicos ⁵². Por ello, se puso especial atención en estas regiones, ya que su análisis es clave para comprender el impacto del CBD sobre la función hepática.

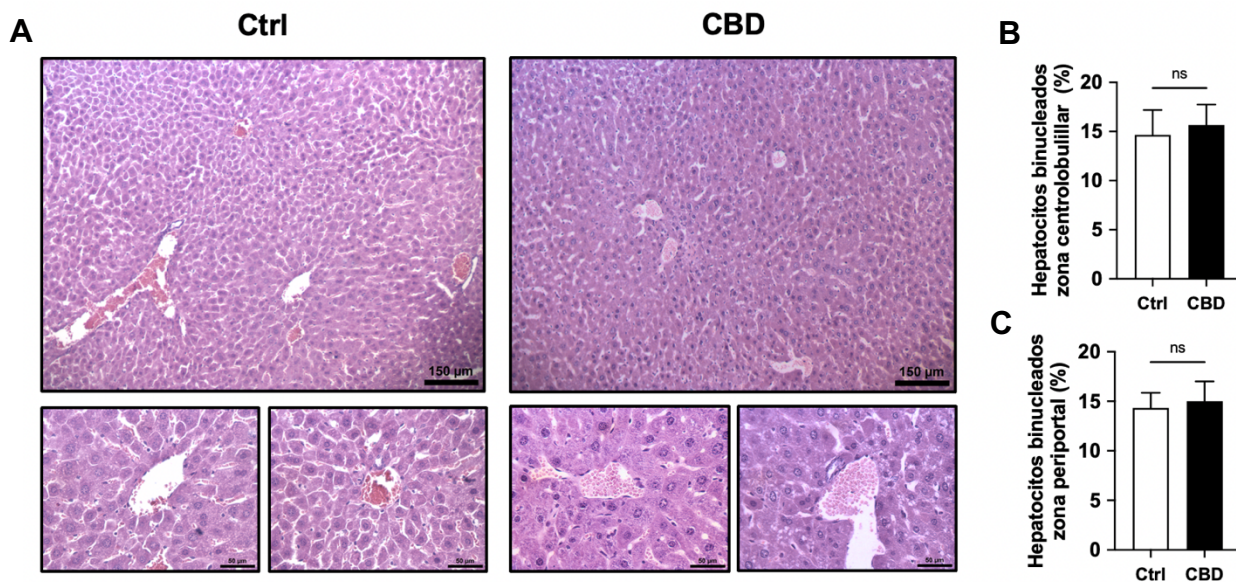


Fig. 26. El CBD no modifica la morfología del hígado. A. Microfotografías representativas de una sección de hígado teñida con hematoxilina y eosina (40 $\times$). B. Cuantificación del porcentaje de hepatocitos binucleados en la zona centrolobulillar. C. Cuantificación del porcentaje de hepatocitos binucleados en la zona periportal. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado con CBD y el grupo

control. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

En la evaluación histológica panorámica del hígado mediante tinción con H&E (Fig. 26A), no se observaron alteraciones estructurales evidentes. Sin embargo, con el objetivo de profundizar en el análisis y detectar posibles cambios sutiles, se realizaron mediciones morfométricas (Fig. 26B-C). En particular, se decidió cuantificar el número de hepatocitos binucleados, ya que variaciones en esta población celular pueden reflejar alteraciones en la capacidad regenerativa del hígado inducidas por el tratamiento con CBD. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de hepatocitos binucleados en las zonas centrolobulillar ni periportal entre el grupo tratado con CBD y el grupo control.

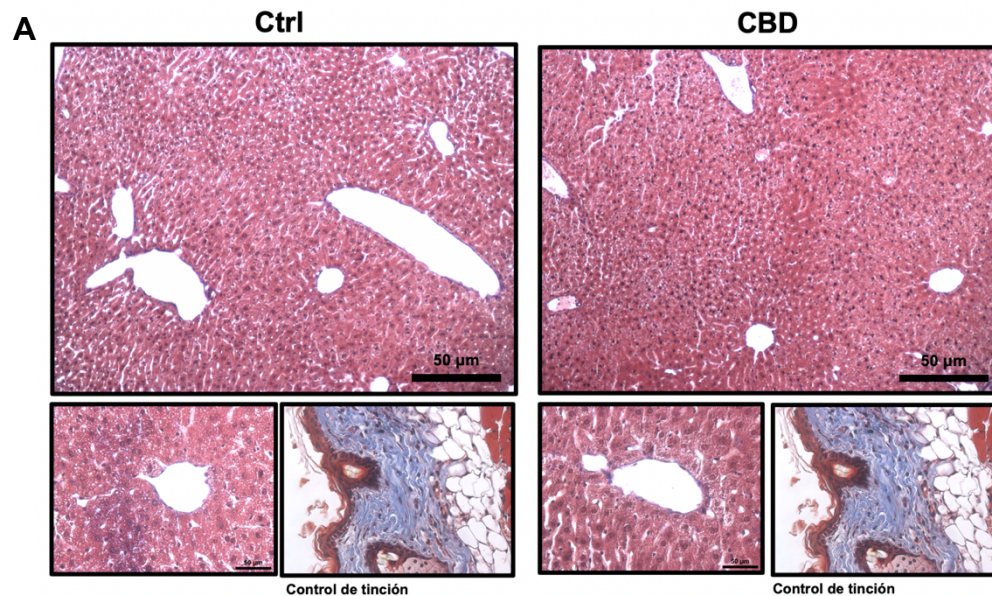


Fig. 27. El CBD no modifica el depósito de colágeno en el hígado. A. Microfotografías representativas de una sección de hígado teñida con tricrómico de Masson (10x). Las fibras de colágeno se tiñen de azul y se localizan en la adventicia de los vasos sanguíneos. Sin embargo, la pared de las vénulas centrales es muy delgada, y no se observó presencia de colágeno en el parénquima hepático en ninguno de los grupos analizados, lo que indica ausencia de fibrosis asociada al tratamiento con CBD. El recuadro inferior izquierdo muestra una ampliación de una vena central (40x). El recuadro inferior derecho corresponde a un corte de piel como control de la tinción. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

Posteriormente, se realizó la tinción de tricrómico de Masson (Fig. 27A) con el objetivo de evaluar posibles alteraciones en la organización del tejido conectivo y determinar si la administración de CBD induce fibrosis hepática. En las secciones analizadas, se observaron fibras de colágeno teñidas de azul, localizadas principalmente en la capa adventicia de las venas centrales. No obstante, en la evaluación panorámica del parénquima hepático no se detectó presencia de colágeno. Estos hallazgos sugieren que el tratamiento con CBD no induce fibrosis ni altera significativamente la arquitectura del tejido conectivo en el hígado, por lo que el CBD no causa alteraciones morfológicas en este órgano.

7.2.3.7 La administración oral de CBD no causa alteraciones morfológicas en el riñón

Finalmente, tras su metabolismo hepático, el CBD y sus metabolitos son eliminados principalmente a través del sistema urinario ⁵³. Aunque no existen estudios que aborden los efectos histológicos del CBD sobre las estructuras renales, en el presente trabajo se realizó un análisis enfocado en el glomérulo, dado su papel esencial en la filtración renal y en el mantenimiento de la homeostasis corporal. Para ello, se evaluaron parámetros morfométricos como el diámetro, perímetro y área glomerular, el área del espacio de Bowman, la celularidad y la circularidad glomerular (Fig. 28). Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con CBD y el grupo control.

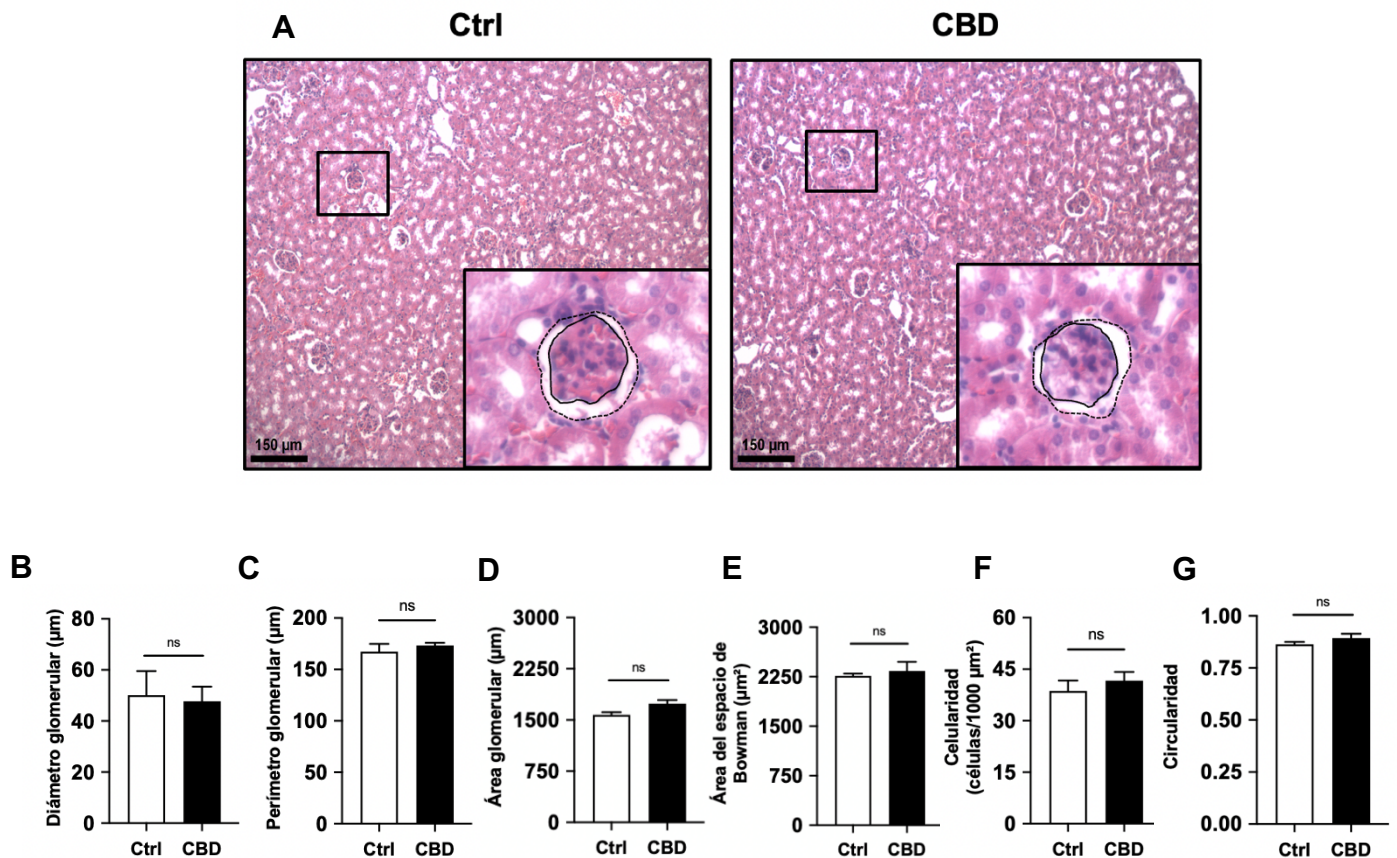


Fig. 28. La administración oral de CBD no causa alteraciones morfológicas en riñón. A. Microfotografías representativas de una sección de riñón teñida con H&E (40X). B. Medición del diámetro glomerular. C. Medición del perímetro glomerular. D. Cálculo del área glomerular. E. Medición del área del espacio de Bowman. F. Cuatificación de la celularidad glomerular. G. Evaluación de la circularidad glomerular. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

Posteriormente, se evaluó la presencia de depósitos de colágeno en el parénquima renal mediante la tinción tricrómica de Masson. En las secciones analizadas (fig. 29) no se observaron depósitos anormales de colágeno en los glomérulos ni en el intersticio renal. La ausencia de tinción azul característica indica que la administración de CBD no induce procesos fibróticos ni remodelación tisular en los riñones de los ratones tratados. ns=?

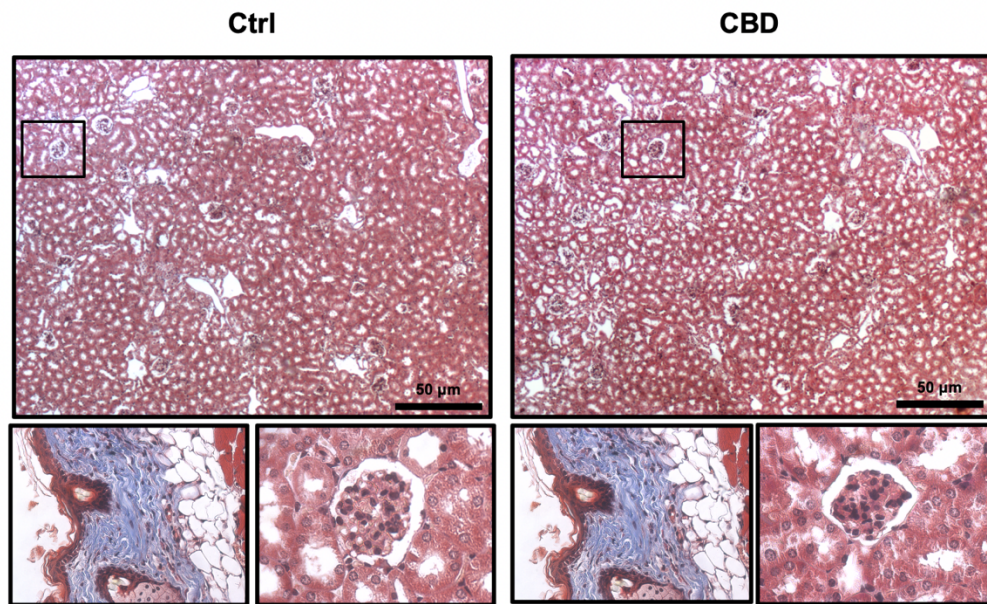


Fig. 29. La administración oral de CBD no causa alteraciones fibróticas en riñón. A. Microfotografías representativas de una sección de riñón teñida con Tricrómico de Masson (10×), en donde no se observó presencia de depósitos de colágeno en tinción azul. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

Por último, mediante la técnica de tinción PAS se evaluó la membrana basal glomerular, debido a su alta concentración de glucoproteínas, esenciales para su función estructural y como barrera de filtración. No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con CBD (fig. 30). En conjunto, estos resultados sugieren que la administración oral prolongada de CBD no provoca alteraciones morfológicas renales.

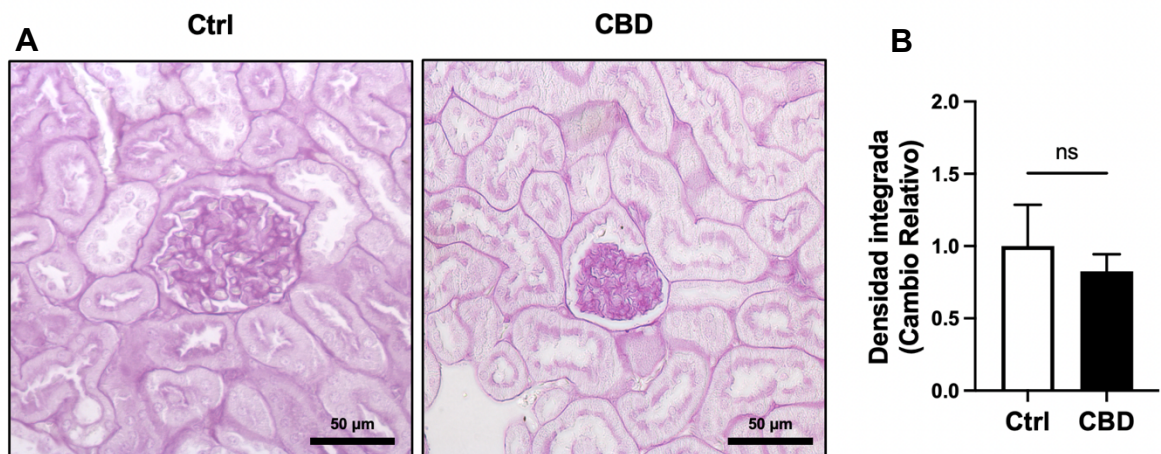


Fig. 30. La administración oral de CBD no altera la membrana basal glomerular. A. Microfotografías representativas de una sección de riñón teñida con la técnica de PAS (40×), se observa positividad a glucoproteínas en la región glomerular, evidenciada por la coloración magenta. B. Cuantificación de la densidad integrada en los glomérulos, sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos analizados. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$, ns (no significativo).

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

El sistema endocannabinoide desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del organismo ¹. Debido a la corta vida media de sus moléculas endógenas, se ha impulsado la búsqueda de compuestos químicos exógenos que puedan replicar sus funciones. En este contexto, los fitocannabinoides han despertado un creciente interés por sus posibles efectos terapéuticos. No obstante, sus propiedades beneficiosas aún no se encuentran completamente caracterizadas. Por ello, es fundamental evaluar tanto su potencial terapéutico como el impacto que su consumo crónico pueda tener sobre los órganos implicados en su metabolismo.

Uno de los fitocannabinoides con mayor potencial terapéutico es el cannabidiol (CBD), una molécula carente de efectos psicotrópicos ⁶. Diversos estudios han documentado su capacidad antioxidante frente a agentes estresores como el MPP⁺ y el paraquat (PQ), posicionándolo como una alternativa prometedora en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, ya que estos compuestos mimetizan el daño celular característico de dichas patologías ³⁴.

En nuestro modelo experimental *in vitro*, el pretratamiento con 10 μ M de CBD durante 24 horas resultó en una disminución aproximada del 50 % en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por PQ tras 48 horas de exposición. Este hallazgo es consistente con lo reportado en la literatura sobre la acción antioxidante del CBD y sugiere un efecto modulador sobre la generación de ROS en condiciones de estrés oxidativo ³³. No obstante, a pesar de esta reducción, no se observó una mejora significativa en la viabilidad celular ni en la actividad mitocondrial, lo cual contrasta con estudios

previos en los que el CBD mostró un efecto protector más amplio. En dichos estudios, un pretratamiento con la misma concentración utilizada en nuestro modelo fue capaz de contrarrestar la pérdida de viabilidad celular inducida por diferentes concentraciones del estresor MPP⁺, lo cual se evidenció mediante la disminución en la expresión de marcadores apoptóticos como Bax y caspasa-3 ³¹.

Asimismo, se ha reportado que un pretratamiento a una concentración de 25 µM de CBD puede revertir el efecto supresor del MPP⁺ sobre la vía antioxidante NRF2, restaurando su expresión en células sometidas a este estresor ²². Sin embargo, en nuestro modelo experimental, dicha concentración resultó dañina, ya que por sí sola indujo estrés celular. Esto sugiere que tanto la concentración como el tiempo de exposición al CBD son variables críticas que pueden condicionar la activación de rutas protectoras como NRF2 y modular procesos apoptóticos como la activación de caspasa-3 y Bax. Adicionalmente, se ha descrito que concentraciones directas aún menores de CBD, como 1 µM, pueden ejercer efectos antioxidantes, como la reducción de los niveles de oxidación de la proteína DJ-1 en modelos de estrés inducido por la combinación de PQ y Maneb (MB), plaguicidas utilizados en agricultura, lo cual refuerza la idea de una acción dosis-dependiente del CBD ³⁰.

Asimismo, es posible que otros mecanismos de acción del CBD no hayan sido detectados con los métodos empleados en esta etapa del estudio, ya que el análisis se centró exclusivamente en la cuantificación de ROS mediante la sonda DHE. Cabe señalar que el PQ también puede inducir la formación de especies reactivas de nitrógeno (RNS), las cuales no fueron evaluadas. Por tanto, es fundamental esclarecer si el CBD ejerce también un efecto modulador sobre estas especies y explorar de manera más amplia las vías antioxidantes implicadas. Asimismo, se requiere profundizar en la caracterización del

daño mitocondrial inducido por el PQ y evaluar de forma específica cómo el tratamiento con CBD podría modificar estos efectos. Estas aproximaciones permitirán una mejor comprensión del potencial terapéutico del CBD en contextos de toxicidad oxidativa compleja.

Considerando las limitaciones del modelo *in vitro*, en este estudio también se evaluaron los efectos del CBD en un modelo animal mediante la administración crónica de una dosis equiparable a la previamente reportada en estudios clínicos en humanos (5.6 mg/kg). La dosis utilizada no fue tóxica para los animales, ya que no se observaron alteraciones en el patrón de ingesta de alimento, peso corporal ni en la supervivencia durante el periodo de administración. A diferencia de otros fitocannabinoides, el CBD tiene una baja afinidad por el receptor CB1, el cual se ha asociado con la alteración en el apetito y el aumento de la ingesta alimentaria ³⁶⁻³⁷.

A nivel conductual, los animales tratados con CBD no mostraron déficits en parámetros motores ni cognitivos, lo que sugiere que esta dosis no compromete funciones neurológicas básicas. No obstante, se observó un efecto conductual significativo en donde los animales tratados mostraron una menor aversión a zonas abiertas e iluminadas, reflejando una mayor disposición a explorarlas. Este patrón ha sido previamente descrito en modelos animales de ansiedad, donde el CBD ha demostrado efectos ansiolíticos caracterizados por un aumento en el tiempo pasado en la zona iluminada y un mayor número de entradas en la prueba de transición luz/oscuridad ³⁸. De manera similar, en la prueba de campo abierto, se ha observado que el tratamiento con CBD incrementa la permanencia en el centro del campo ³⁹. Este efecto podría estar mediado por una mayor liberación de dopamina modulada por la acción del CBD sobre el receptor serotoninérgico 5-HT1A, cuya activación ha sido relacionada con efectos ansiolíticos ²⁸. Por lo tanto,

nuestros hallazgos respaldan la evidencia existente sobre el potencial ansiolítico del CBD en condiciones fisiológicas normales.

Si bien se ha reportado que la biodisponibilidad del CBD tras su ingesta oral es limitada ⁴⁰, existe escasa información sobre sus posibles efectos a nivel tisular en modelos sanos. Nuestros hallazgos indican que la administración prolongada de CBD no produce alteraciones histológicas evidentes en órganos clave para su metabolismo y excreción, como el hígado y el riñón, en donde no se observaron alteraciones en la morfología hepática ni cambios estructurales significativos en los glomérulos renales. Estos resultados sugieren que, a la dosis utilizada, el CBD no genera toxicidad detectable en estos tejidos, respaldando su perfil de seguridad a nivel histológico.

Debido a su amplio espectro de propiedades farmacológicas, el cannabidiol (CBD) ha sido utilizado como tratamiento complementario en diversas patologías, incluyendo epilepsia, esquizofrenia y para el alivio de síntomas asociados a tratamientos oncológicos, como náuseas y dolor crónico ^{19, 20 y 21}. Sin embargo, aunque su perfil de seguridad es considerado favorable, se han documentado efectos adversos leves tras su administración en humanos, tales como somnolencia, disminución del apetito y, en mayor proporción, diarrea ⁴¹. Estos efectos a nivel gastrointestinal destacan el impacto que presenta el CBD a nivel del sistema digestivo, por lo que es crítica su evaluación, sobre todo debido a su administración prolongada.

En el modelo animal de exposición crónica al CBD, se observaron cambios a nivel de la mucosa del intestino delgado, los cuales sugieren que el tratamiento con el fitocannabinoide podría inducir una respuesta adaptativa del epitelio intestinal, posiblemente orientada a preservar la función de barrera y la eficiencia absortiva ante cambios en el ambiente luminal ⁴². Estudios previos han demostrado que la administración

oral de CBD es capaz de prevenir el aumento en la permeabilidad intestinal inducido por procesos inflamatorios, evidenciado mediante pruebas como la relación lactulosa/manitol ⁴³. Estos efectos protectores se han atribuido a la activación de receptores como CB1 y PPAR γ , involucrados en la modulación de la inflamación y la homeostasis epitelial ⁴⁴.

La motilidad intestinal se regula por contracciones del músculo liso, coordinadas por el sistema nervioso entérico y moduladas por señales del sistema nervioso central ⁴⁵.

Neurotransmisores como la serotonina (5-HT) y la acetilcolina son fundamentales para el control del peristaltismo y del tono intestinal ⁴⁴. Además, la presencia de receptores del sistema endocannabinoide en el tracto gastrointestinal, principalmente en neuronas entéricas, sugiere una participación activa de este sistema en la regulación digestiva ⁴⁷.

Nuestros hallazgos indican que el CBD podría inducir un efecto hipertrófico sobre la muscular externa, posiblemente mediado por su interacción con el receptor TRPV1 o 5-HT1A, los cuales participan en la modulación de la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina ⁵⁴. La presencia de modificaciones morfológicas en las neuronas del plexo mientérico, denotando un estado de activación, respalda la hipótesis de que el CBD actúa a través del eje neuroentérico para modular la actividad del músculo liso intestinal. También se sugiere que podría participar en la inhibición de las enzimas acetilcolinesterasas, aumentando los niveles de acetilcolina ⁵⁵.

También, se observó un incremento en el número de células gliales entéricas, sin que se detectaran alteraciones en la población neuronal, evaluado mediante el marcaje para GFAP y HuC/HuD, respectivamente. Dado que el CBD puede activar el receptor TRPV1, uno de sus efectos potenciales es la inducción de factores neurotróficos involucrados en la supervivencia y funcionalidad neuronal ⁴⁹. Debido a que previamente observamos un aumento en el área del citoplasma neuronal tras la administración de CBD, esto podría

interpretarse como una respuesta adaptativa orientada a reforzar el soporte trófico y funcional a las neuronas entéricas. Estos hallazgos sugieren que el CBD podría modular la interacción neurona-glía en el sistema nervioso entérico, promoviendo una homeostasis que favorece el mantenimiento de la integridad neuronal.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

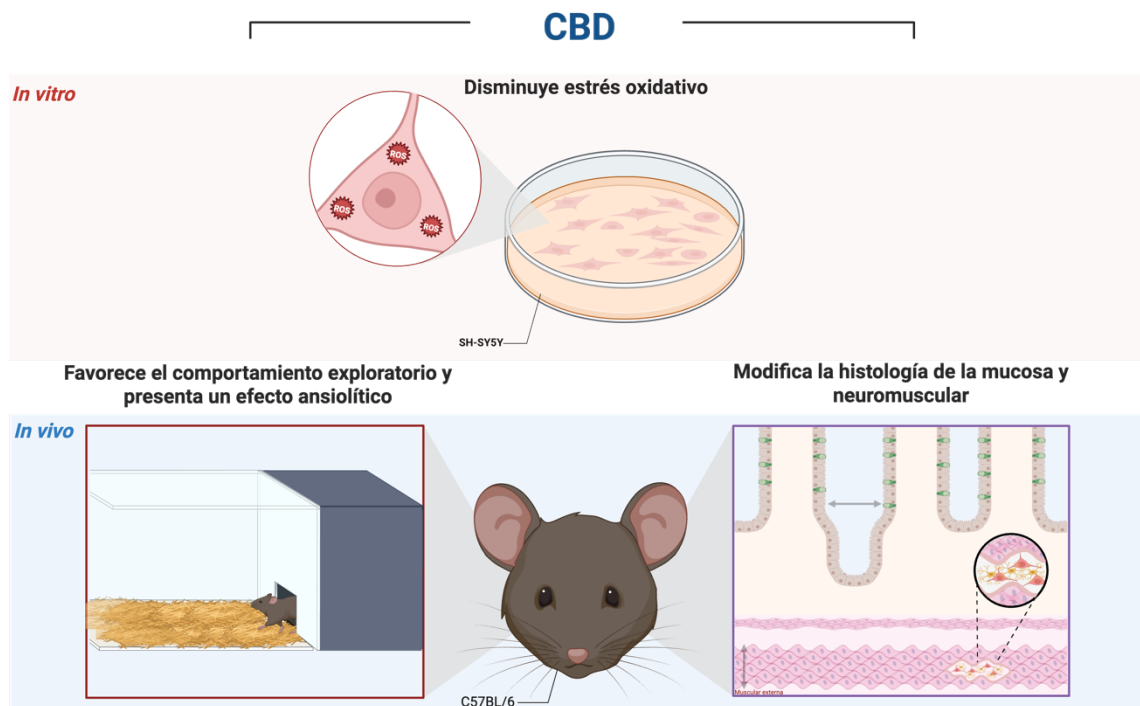


Fig. 30. Resumen gráfico. El CBD ejerce efectos antioxidantes y modula funciones conductuales y gastrointestinales sin efectos adversos detectables.

En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio indican que el CBD reduce significativamente la producción de especies reactivas de oxígeno generadas por el paraquat, aunque no logró prevenir la muerte celular. La exposición crónica al CBD, en el modelo animal, promovió un comportamiento exploratorio y redujo el comportamiento tipo ansioso en los murinos. Asimismo, el uso prolongado de CBD es seguro en los órganos involucrados en su metabolismo, como el hígado y riñón, sin evidenciar toxicidad.

No obstante, se observaron modificaciones en la mucosa y a nivel neuromuscular en el intestino delgado. Estos cambios sugieren que el CBD podría favorecer la peristalsis y facilitar el tránsito intestinal mediante adaptaciones estructurales.

En conjunto, estos hallazgos indican que el CBD ejerce efectos antioxidantes y modula funciones conductuales y gastrointestinales sin efectos adversos sistémicos detectables, respaldando su perfil de seguridad y abriendo nuevas perspectivas para su potencial uso terapéutico en diversas condiciones.

REFERENCIAS

1. Lu, H.-C., & Mackie, K. (2016). An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biological Psychiatry*, 79(7), 516–525.
2. Gonsiorek, W., Lunn, C., Fan, X., Narula, S., Lundell, D., & Hipkin, R. W. (2000). Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: Antagonism by anandamide. *Molecular Pharmacology*, 57(5), 1045–1050.
3. Lu, H.-C., & Mackie, K. (2021). Review of the endocannabinoid system. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 6(6), 607–615.
4. Messina, F., & Micale, V. (2015). Chapter 2: Cannabis and Bioactive Cannabinoids. Elsevier. *Studies in Natural Products Chemistry*, 45, 17-57.
5. Golub, V., & Reddy, D. S. (2021). Cannabidiol therapy for refractory epilepsy and seizure disorders. En *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1264, 93–110.
6. Martinez, N., *et al.* (2023). Molecular and cellular mechanisms of action of cannabidiol. *Molecules*, 28(16).
7. Thomas, B. & ElSohly, M. (2016). Chapter 2: Biosynthesis and Pharmacology of Phytocannabinoids and Related Chemical Constituents. *The Analytical Chemistry of Cannabis*. 27-41.
8. Martinez, N. (2023). Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Cannabidiol. *MoleculeS*, 28(16).
9. Zou, S. & Kuma, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 833.
10. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. (2023). *Informe mundial sobre las drogas 2023: Resumen ejecutivo (Resumen en español)*. Naciones Unidas. https://www.unodc.org/res/WDR-2023/WDR23_ExSum_Spanish.pdf
11. Patcher, P. *et al.* (2006) The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*, 58(1), 389-462.
12. Costa, M. (2016). The endocannabinoid system: A novel player in human placentation. *Reproductive Toxicology*, 61, 58-67.
13. Scherma, M. *et al.* (2018) Brain activity of anandamide: a rewarding bliss?. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(3), 309-323.
14. Bluett, R., (2014). Central anandamide deficiency predicts stress-induced anxiety: behavioral reversal through endocannabinoid augmentation. *Translational Psychiatry*, 4.
15. Liu, Z. (2022). Deficiency in endocannabinoid synthase *DAGLB* contributes to early onset Parkinsonism and murine nigral dopaminergic neuron dysfunction. *The Embo Journal*, 13.
16. Gulck, T. & Lindberg, B. (2020). Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Molecular Plant Communications*, 25(10), 985-1004.

17. Brito, A. *et al.* Phytocannabinoids: Pharmacological effects, biomedical applications, and worldwide prospection. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 13(6), 575-587.
18. Dawidowicz, A. & Olszowy, R. (2021). CBG, CBD, Δ^9 -THC, CBN, CBGA, CBDA and Δ^9 -THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action. *Fisioterapia*, 152.
19. Jurga, M. *et al.* (2024). Cannabis-Based Phytocannabinoids: Overview, Mechanism of Action, Therapeutic Application, Production, and Affecting Environmental Factors. *International Journal of Molecular Science*, 25(20), 11258.
20. Zhang, S. *et al.* (2024). The impact of phyto- and endo-cannabinoids on central nervous system diseases: A review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 13(1), 30-38.
21. Silvestro, S. *et al.* Use of Cannabidiol in the Treatment of Epilepsy: Efficacy and Security in Clinical Trials. *Molecules*, 24(8), 1459.
22. Kang, S. *et al.* (2021). Cannabidiol Induces Autophagy to Protects Neural Cells From Mitochondrial Dysfunction by Upregulating SIRT1 to Inhibits NF- κ B and NOTCH Pathways. *Frontiers of Cell Neurosciences*, 15.
23. Hossain, K., Alghalayini, A. & Valenzuela, S. (2023). Current Challenges and Opportunities for Improved Cannabidiol Solubility. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 14514.
24. Chen, S. (2024). Metabolism and liver toxicity of cannabidiol. *Journal of Environmental Science and Health*, 42(3), 238-254.
25. Zhang, Q., Melchert, P. & Markowitz, J. (2024). Pharmacokinetic Variability of Oral Cannabidiol and Its Major Metabolites after Short-Term High-Dose Exposure in Healthy Subjects. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, 7(1), 1-9.
26. Chayasirisobhon, S. (2020). Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabidiol. *The Permanente Journal*, 25.
27. Davis, J. *et al.* (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature mental health*, 405, 183-187.
28. Resstel, L. *et al.* (2009). 5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *British Journal of Pharmacology*, 156(1), 181-188.
29. Pond, H. *et al.* (2021). Digging behavior discrimination test to probe burrowing and exploratory digging in male and female mice. *Journal of Neuroscience Research*, 99(9), 2046-2058.
30. Mendivil, M. *et al.* (2023). Cannabidiol Protects Dopaminergic-like Neurons against Paraquat- and Maneb-Induced Cell Death through Safeguarding DJ-1/CYS¹⁰⁶ and Caspase 3 Independently of Cannabinoid Receptors: Relevance in Parkinson's Disease. *ACS Chemical Neuroscience*, 14(11), 2159-2171.
31. Gugliandolo, A. *et al.* (2020). Cannabidiol exerts protective effects in an *in vitro* model of Parkinson's disease activating AKT/mTOR pathway. *Fitoterapia*, 143.

32. Islas, M. *et al.* (2024). Isobolographic Analysis of the Cytoprotective Effect of Dapsone and Cannabidiol Alone or Combination upon Oxygen–Glucose Deprivation/Reoxygenation Model in SH-SY5Y Cells. *Antioxidants*, 13(6), 705.
33. Kim, J. *et al.* (2021). In Vitro Studies on Therapeutic Effects of Cannabidiol in Neural Cells: Neurons, Glia, and Neural Stem Cells. *Molecules*, 26(19), 6077.
34. Echeverry, C. *et al.* (2021). A Comparative In Vitro Study of the Neuroprotective Effect Induced by Cannabidiol, Cannabigerol, and Their Respective Acid Forms: Relevance of the 5-HT_{1A} Receptors. *Neurotoxicity Research*, 39, 335-348.
35. Campos, A. *et al.* (2016). Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological research*, 112, 119-127.
36. Elsaid, S., Kloiber, S. & Le Foil, B. (2019). Effects of cannabidiol (CBD) in neuropsychiatric disorders: A review of pre-clinical and clinical findings. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 167, 25-75.
37. Wiley, J. *et al.* (2009). CB₁ cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *British Pharmacological Society*, 145(3), 293-300.
38. Bourin, M. & Hascoet, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, 463(1), 55-65.
39. Kraeuter, A. *et al.* (2019). The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Pre-Clinical Models*, 99-103.
40. Millar, S. *et al.* (2019). A systematic review of cannabidiol dosing in clinical populations. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 85(9), 1888-1900.
41. Story, G. *et al.* (2023). Cannabidiol and Intestinal Motility: A Systematic Review. *Current Developments in Nutrition*, 7(10).
42. Simei, J. *et al.* (2024). Research and Clinical Practice Involving the Use of Cannabis Products, with Emphasis on Cannabidiol: A Narrative Review. *Pharmaceuticals*, 17(12), 1644.
43. Couch, D. *et al.* (2019). Palmitoylethanolamide and Cannabidiol Prevent Inflammation-induced Hyperpermeability of the Human Gut In Vitro and In Vivo-A Randomized, Placebo-controlled, Double-blind Controlled Trial. *Inflammatory Bowel Disease*, 25(6), 1006-1018.
44. Crowley, K. *et al.* (2024). Effects of Cannabinoids on Intestinal Motility, Barrier Permeability, and Therapeutic Potential in Gastrointestinal Diseases. *International Journal of Molecular Science*, 25(12), 6682.
45. Camilleri, M. & Zheng, T. (2023). Cannabinoids and Gastrointestinal Tract. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 21, 3217-3229.
46. Crowley, K. *et al.* (2024). Effects of Cannabinoids on Intestinal Motility, Barrier Permeability, and Therapeutic Potential in Gastrointestinal Diseases. *International Journal of Molecular Science*, 25(12), 6682.
47. Izzo, A. *et al.* (2012). Inhibitory effect of cannabichromene, a major non-psychotropic cannabinoid extracted from *Cannabis sativa*, on inflammation-induced hypermotility in mice. *British Journal of Pharmacology*, 166(4), 1444-1460.

48. Alhamoruni, A. *et al.* (2010). Pharmacological Effects of Cannabinoids on the Caco-2 Cell Culture Model of Intestinal Permeability. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335(1), 82-102.
49. Wang, H. *et al.* (2021). Enteric neuroimmune interactions coordinate intestinal responses in health and disease. *Mucosal Immunology*, 15, 27-39.
50. Kochen, S. *et al.* (2023) Cannabidiol as an adjuvant treatment in adults with drug-resistant focal epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, 144.
51. Doohan, P. *et al.* (2021) Cannabinoid Interactions with Cytochrome P450 Drug Metabolism: a Full-Spectrum Characterization. *The AAPS journal*, 23(91).
52. Blondet, N. *et al* (2019) Mechanisms of Hepatocyte Detoxification. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 6, 981-1001.
53. Ujváry, I. & Hanus, L. (2016) Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy. *Cannabis and Cannabinoid research*, 1(1), 90-101.
54. Louis, K., Tupal, S. & Premkumar, L. (2022) TRPV1: A Common Denominator Mediating Antinociceptive and Antiemetic Effects of Cannabinoids. *International Journal of Molecular Science*, 23(17), 10016.
55. Puopolo, T., Liu, C., Ma, H. & Seeram, N. (2022) Inhibitory Effects of Cannabinoids on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Enzyme Activities. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, 5(1), 85-94.