



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

---

# EL CANNABIDIOL ATENÚA LAS ALTERACIONES EN EL METABOLISMO CEREBRAL Y LA CONDUCTA INDUCIDOS POR EXPOSICIÓN A ESTRÉS TEMPRANO EN RATONES HEMBRA

---

Paula Amador Abreu

27 DE JUNIO DE 2021

TUTOR/COTUTOR: HÉCTOR GONZÁLEZ PARDO E ISABEL LÓPEZ TABOADA  
Máster Universitario en Investigación en Neurociencias  
Curso 2020/2021  
Facultad de Psicología de la Universidad de Oviedo



## Listado de Abreviaturas:

ACAd	<b>Corteza cingulada anterior dorsal</b>
ACB	Núcleo accumbens
AEA	Anandamida
2-AG	2-araquidonglicerol
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
BA	Amígdala basal
BST	Núcleo del lecho estriado
CB1	Receptor de endocannabinoide tipo 1
CB2	Receptor de endocannabinoide tipo 2
CBD	Cannabidiol
CCA	Corteza cingulada anterior
CCO	Citocromo c oxidasa
CeAm	Amígdala central
CEEA-PRBB	Comité de ética local, Parque de Investigación Biomédica de Barcelona
CP	Caudado-putamen
CoA	Amígdala cortical
CRH/CRF	Hormona liberadora de corticotropina
DG	Giro dentado
EPM	Laberinto elevado en cruz
ELS	Separación temprana prolongada
FAAH	Amida hidrolasa de ácidos grasos
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GPR55	Receptor 55 acoplado a proteína G
HP	Hipocampo
HPA	Eje hipotálamo-ptuitario-adrenal
HPG	Eje hipotálamo-pituitario-gonadal
5-HT	Serotonina/ 5-hidroxitriptamina
5-HT1A	Receptor de 5-hidroxitriptamina tipo 1A
ILA	Corteza infralímbica
LA	Amígdala lateral
MeA	Amígdala medial
MSEW-CBD	Separación materna-cannabidiol
MSEW-VEH	Separación materna - vehículo
PD	Día postparto
PFC	Corteza prefrontal
PL	Corteza prelímbica
PPAR	Receptores activados por proliferadores peroxisómicos
PVH/ PVN	Núcleo paraventricular hipotalámico
ROD	Densidad óptica relativa
SNC	Sistema nervioso central
SN-CBD	Sin separación materna-cannabidiol
SN-VEH	Sin separación materna-vehículo
TRPV1	Receptor de potencial transitorio dependiente de voltaje 1

TST  
THC/ $\Delta^9$ -THC

Prueba de suspensión por la cola  
delta-9-tetrahidrocannabinol

## Índice

<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
2.1. Animales	13
2.2. Condiciones de cría	13
2.3. Tratamiento	13
2.4. Pruebas de Conducta	14
2.4.1. Laberinto en cruz elevado (Elevated Plus Maze)	14
2.4.2. Prueba de suspensión de la cola (Tail Suspension Test)	14
2.4.3. Histoquímica cuantitativa de la citocromo c oxidasa (CCO)	14
2.4.4. Análisis estadísticos de los resultados	15
<b>3. RESULTADOS:</b>	<b>17</b>
3.1. Experimento: Efectos ansiolíticos y antidepresivos del CBD	17
Efectos ansiolíticos del CBD en ratones SN y MSEW	17
Efecto antidepresivo del CBD en ratones hembra MSEW	17
Actividad CCO	18
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>21</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>25</b>
<b>6. REFERENCIAS</b>	<b>26</b>
<b>ANEXO 1: PRUEBAS DE CONDUCTA</b>	<b>30</b>
Laberinto elevado en cruz (EPM)	30
Prueba de suspensión por la cola (TST)	30

## **Resumen**

El cannabidiol (CBD) es uno de los principales componentes de la planta *Cannabis sativa* que, en los últimos años, ha recibido gran atención dada sus numerosas propiedades medicinales como sus posibles efectos psicoactivos sin tener potencial adictivo. Puesto que los estudios en hembras son pocos, el paradigma de separación materna se aplicó como modelo animal para inducir en ratones hembra CD1 los efectos del estrés psicosocial mediante la exposición a experiencias adversas en las primeras etapas de la vida. Se realizaron pruebas de comportamientos de tipo ansioso (laberinto elevado en cruz, EPM) y depresivos (test de suspensión por la cola, TST). También se evaluó el metabolismo energético de ciertas regiones cerebrales implicadas en funciones cognitivas y emocionales mediante técnica histoquímica del enzima mitocondrial citocromo c oxidasa (CCO). Los resultados de las pruebas conductuales muestran comportamientos de tipo ansioso y depresivo en etapa juvenil. Las hembras tratadas con CBD presentaron conductas exploratorias y mayor movilidad en EPM y TST, respectivamente. La actividad metabólica se observó alterada en hipocampo y amígdala, que tras el tratamiento con CBD disminuyeron su actividad metabólica. Según los resultados, parece que el tratamiento subcrónico CBD podría tener efectos beneficiosos sobre la ansiedad y depresión inducidos por exposición a estrés temprano en ratones hembra.

**Palabras clave:** CBD, ansiedad, estrés temprano, separación materna

## **Abstract**

Cannabidiol (CBD) is one of the main components of the *Cannabis sativa* plant that, in recent years, has received great attention given its numerous medicinal properties as well as its possible psychoactive effects without having addictive potential. Since studies in females are so few, the maternal separation paradigm was applied as an animal model to induce the effects of psychosocial stress in female CD1 mice through exposure to adverse experiences in the early stages of life. Anxious (elevated plus maze, EPM) and depressive (tail suspension test, TST) behavioral tests were performed. The energy metabolism of certain brain regions involved in cognitive and emotional functions were also evaluated by histochemical technique of the mitochondrial enzyme cytochrome c oxidase (CCO). Behavioral test results show youth-stage anxious and depressive-type behaviors. Females treated with CBD presented exploratory behaviors and greater mobility in EPM and TST

respectively. The metabolic activity was observed as being altered in the hippocampus and amygdala, which after treatment with CBD decreased their metabolic activity. Based on the results it appears that subchronic treatment CBD could have beneficial effects on anxiety and depression induced by early-life stress exposure in female mice.

**Keywords:** CBD, anxiety, early-life-stress, maternal separation

## 1. Introducción

El uso de los derivados de la planta *Cannabis sativa* es milenario, tanto con fines recreativos como medicinales(1–3), si bien, no fue hasta el siglo XXI que se aislaron los componentes activos de la planta, identificando más de 100 cannabinoides (CB) distintos, siendo los dos principales: el delta-9-tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC o THC) y el cannabidiol (CBD)(1,3). El THC es el componente más abundante de la planta y conocido por sus efectos psicoactivos(1,3,4). Por otro lado, el CBD es el segundo más abundante, aproximadamente presente en un 40% y no presenta propiedades psicoactivas ni afecta negativamente a la actividad locomotora, la temperatura corporal, memoria, lo mismo que no causa dependencia, habiendo tomado gran interés en la investigación científica gracias a su potencial aplicación como tratamiento de distintas patologías(1). Algunos ensayos clínicos han demostrado efectos prometedores del CBD como antiinflamatorio, antioxidante, analgésico, ansiolítico, antitumoral, anticonvulsivo, antiemético, inmunomodulador o neuroprotector(1–3). Estos efectos del CBD se relacionan con su actividad sobre el sistema endocannabinoide, responsable de funciones como el aprendizaje, la memoria, las emociones o de la ansiedad, entre otras(2).

En el sistema endocannabinoide se reconocen tres receptores (cannabinoides tipo 1 y 2, CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>, respectivamente, y el receptor 55 acoplado a proteína G, GPR55), que se encuentran tanto en la membrana celular como en la membrana de las mitocondrias, y regulados por ligandos endógenos derivados del ácido araquidónico (anandamida, AEA y 2-araquidonilglicerol, 2-AG) que se sintetizan bajo demanda para su directa liberación hacia las neuronas presinápticas donde se unen a los receptores endocannabinoides(2,5). En el sistema nervioso central, en concreto, en el hipocampo, corteza cerebral, hipotálamo, ganglios basales y cerebelo se localiza en mayor proporción el receptor CB<sub>1</sub>(2). Con la unión del ligando al receptor CB<sub>1</sub> se hiperpolariza la membrana (entrada de K<sup>+</sup> a la célula), disminuyendo la liberación de otros neurotransmisores por diversos mecanismos como la inhibición presináptica de los canales de Ca<sup>+2</sup> dependientes de voltaje, canales de K<sup>+</sup> presináptico o señalización de AMPc, de manera que no puede unirse con neurotransmisores como GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), glutamato o acetilcolina(2,3,5). Además, 2-AG y AEA pueden actuar de manera no retrógrada, activando los CB<sub>1</sub> postsinápticos o los receptores TRPV1, respectivamente, lo mismo que los endocannabinoides pueden mediar la actividad presináptica y postsináptica mediante



activación de estos receptores presentes en las membranas de astrocitos (5). Grosso modo, el sistema endocannabinoide modula los potenciales sinápticos excitatorios o inhibitorios, participando en la regulación de distintas funciones cerebrales como la cognición o la emoción, entre otras. Por tanto, una desregulación de este sistema se relaciona con algunos trastornos neuropsiquiátricos como el estrés y la ansiedad(2,5).

Sin embargo, el CBD no actúa de manera directa sobre el sistema endocannabinoide dado que presenta baja afinidad por los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, pero modula directamente otros sistemas celulares como los canales TRPV1, GPR55, amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), receptores PPAR o receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>(1,6). Así, el CBD puede contribuir a un aumento en la liberación de endocannabinoides, bien alterando su metabolismo o su recaptación, de manera que estos se presenten como mensajeros secundarios que participen en la neuromodulación, actuando de manera preventiva frente a un exceso de actividad neuronal(1,2,6). Por tanto, aunque no se conocen los mecanismos de acción del CBD sobre el sistema endocannabinoide, se asocia su actividad a una disminución de los efectos de la ansiedad por modulación de otras dianas moleculares y otros receptores presentes en el SNC cuya actividad se puede relacionar con la modulación del sistema endocannabinoide(1,2,6,7), así, por ejemplo, algunas evidencias confirman efectos proneurogénicos en hipocampo (aumento de la neurogénesis), directamente relacionado con sus efectos ansiolíticos(7). Algunos estudios reflejan que la unión del CBD con receptores 5-HT<sub>1A</sub> impulsa efectos neuroprotectores, antidepresivos y ansiolíticos(1,4). En un estudio clínico, a pacientes con trastornos de ansiedad (la mayoría hombres) y de sueño se les suministró CBD, que tras unos meses notificaron mejoras por una disminución en las puntuaciones de ansiedad, lo que coincide con otros estudios que también avalan el efecto ansiolítico del CBD(4). Un estudio en ratones sometidos a estrés crónico medía la neurogénesis en hipocampo tras el tratamiento con CBD a dosis de 30mg/kg donde se observó que el CBD evitó los efectos ansiogénicos del estrés crónico y aumentó la proliferación neuronal en hipocampo, además, se observó un aumento de AEA, lo que coincide con otros experimentos que demostraban el efecto inhibitor del CBD sobre FAAH, la enzima que hidroliza AEA, lo que explicaría el aumento de su concentración (8), por lo que se predijo que los efectos ansiolíticos de CBD pueden deberse a una activación de neurotransmisores del sistema endocannabinoide, que activa los receptores CB<sub>1</sub> pudiendo reclutar proteínas implicadas

en la remodelación dendrítica y neurogénesis(6,9). Otras investigaciones en ratones observaron tanto a nivel celular como conductual efectos ansiolíticos del CBD y también destacaron propiedades antidepresivas del CBD, sin embargo, en cuanto a la proliferación neuronal, comprobaron que los efectos del CBD dependía de la dosis, de manera que a dosis altas, el CBD no aumentaba la neurogénesis(11). Estudios en humanos, con pruebas de ansiedad como la prueba simulada de hablar en público, observaron también que el CBD disminuía la ansiedad(4).

Los trastornos de ansiedad o depresión pueden ser causados por un estrés vital temprano (ELS), es decir, por la exposición a situaciones adversas durante el periodo postnatal, como puede ser el maltrato físico, abuso emocional o sexual o negligencias emocionales físicas(12,13). Distintos estudios hasta el momento han notificado que esto puede conllevar a ciertas alteraciones neurobiológicas y neuroendocrinas que predisponen al desarrollo de distintos trastornos psicopatológicos como los ya mencionados(13), que además puede asociarse a otras patologías médicas como enfermedades cerebrovasculares, diabetes o algunas formas de cáncer(14). En modelos animales, para inducir ELS se realiza el método de separación materna donde se establece un protocolo de la duración y del tiempo en el que permanecen separados de la madre(12). Por otro lado, se indica que existe un periodo crítico, y la gravedad de las afecciones que pueda tener por haber sido expuesto a ELS durante el periodo neonatal dependerá de la duración, la frecuencia y el momento(14–16). Se destaca que las posibles diferencias en cuanto a la neuroplasticidad generada por ELS puede ser debido a los periodos de desarrollo de las regiones cerebrales implicadas, concluyendo que el hipocampo podría ser el área más vulnerable a ELS (15).

A nivel basal, la respuesta de estrés fisiológico es regulada por el eje HPA (Hipotálamo-pituitario-adrenal) que involucra una cascada de señalización hasta la liberación final de corticoides (principalmente cortisol en humanos y corticosterona en roedores)(15,17). El eje HPA y sus centros reguladores en el SNC (amígdala, hipocampo y corteza prefrontal -PFC-) se ven afectados en su desarrollo funcional y estructural tras la exposición a ELS(12,15). Algunos estudios encontraron que individuos con trastornos mentales que presentaron ELS tenían un volumen disminuido de la sustancia gris de la PFC dorsolateral y ventromedial, del hipocampo y de la amígdala en la etapa adulta(14,16). Estudios en animales con separación materna también avalaron la

hiperactividad de la amígdala, junto con una respuesta aumentada del eje HPA, y una alteración en la retroalimentación negativa regulada por el hipocampo y la PFC(12,15). La actividad de la amígdala en la respuesta al estrés resulta importante ya que presenta neuronas liberadoras de CRH (hormona liberadora de corticotropina) induciendo la respuesta del PVN, al mismo tiempo que la CRH liberada por este estimula la amígdala para aumentar la ansiedad(15). En cuanto al hipocampo, se asoció una reducción en la densidad dendrítica de las neuronas de la región CA1 y CA3 cuando los eventos estresantes surgen en roedores entre PD2 y PD20(15). Estas alteraciones en las estructuras neuronales de dichas regiones implican una alteración de las funciones cognitivas y los comportamientos emocionales y sociales(15,18,19).

Algunos estudios destacan que existen diferencias en la respuesta al estrés entre sexos, tanto en relación con la función del eje HPA como en las conductas. Algunos autores sugieren que individuos con depresión difieren en la reactividad al cortisol según el sexo, siendo mayor en los hombres que en las mujeres(17). En el caso de roedores se ha observado que las hembras muestran una respuesta al estrés significativamente mayor que los machos, indicado por los altos niveles de corticosterona tras la exposición a varios factores estresante, lo que puede deberse a una supresión del eje HPA en los hombres por la activación de la testosterona después de la pubertad(20). Estudios conductuales en roedores indicaron también diferencias entre sexos, observando que las hembras llevan a cabo estrategias pasivas que los machos, por ejemplo en el test de natación forzada o suspensión por la cola, observaron mayor tiempo de inmovilidad en hembras(20). A nivel fisiológico, se plantea que estas diferencias pueden ser origen de la interacción entre los ejes HPA y HPG (hipotálamo-pituitario-gonadal), de manera que el estrés pueda estar modulado por las hormonas sexuales(17). Algunos estudios demostraron el efecto de estas en las diferencias sexuales en la capacidad de respuesta al estrés mediante la regulación de los sistemas de neurotransmisores, incluida la expresión e internalización del receptor 5-HT, norepinefrina y CRF(20). Sin embargo, los mecanismos subyacentes a dichas diferencias sexuales en cuanto al estrés y la ansiedad todavía no están claros. Lo mismo que el efecto del CBD como ansiolítico ha sido estudiado mayoritariamente en machos, razón por la cual el objetivo de este trabajo se centra en determinar los efectos que tendría en hembras, dada las diferencias existentes respecto a la respuesta frente a estímulos estresantes.

Se plantea como hipótesis que el CBD también puede provocar una disminución de los efectos ansiogénicos y de las conductas de tipo depresivo causados por el estrés que genera la separación materna temprana en hembras, mediante la modulación de la actividad neuronal de las regiones cerebrales implicadas en dichos aspectos emocionales. Para ello, se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar en ratones hembra la actividad de distintas regiones cerebrales cuando han sido sometidos a estrés temprano, en este caso, mediante separación materna.
- Evaluar la actividad de las distintas regiones cerebrales para el suministro del tratamiento con cannabidiol (CBD) o de un suero salino (vehículo - VEH).
- Evaluar la posible existencia de una relación estadística entre los cambios de actividad neuronal por estrés y el suministro del tratamiento.
- Comparar los datos obtenidos de la actividad citocromo oxidasa con los datos de conducta.
- Establecer relaciones con los datos de otros autores para definir si se han observado diferencias de la eficacia del tratamiento de la ansiedad con CBD en machos y hembras.

## **2. Material y métodos**

### **2.1. Animales**

Se utilizaron 39 ratones hembra CD1, progenie de ratones macho y hembra adultos utilizados como reproductores. Los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales estándares: a temperaturas de  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ , humedad  $55 \pm 10\%$ , manteniendo un ciclo circadiano de 12:12 horas y con comida y agua *ab libitum*. La limpieza de las jaulas se realizaba periódicamente cada semana, exceptuando los días postparto, hasta el décimo día. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices nacionales (RD 53/2013) y de la UE (Directiva 2010-63EU) que regulan el uso y cuidado de animales de experimentación y fueron aprobados por el comité de ética local, Parque de Investigación Biomédica de Barcelona (CEEA-PRBB).

### **2.2. Condiciones de cría**

Los ratones hembra se dividieron en dos grupos, de manera que uno de los grupos (N=20) fue sometido a separación materna (grupo MSEW), mientras que el otro (N=19) tuvo unas condiciones de cría naturales (grupo SN). El día de parto para cada camada se asignó como día postnatal PD0, y cada una de ellas fueron asignadas en un grupo u otro de manera aleatoria (21). Para el grupo MSEW, durante los días PD2 a PD5 las madres fueron separadas de sus crías durante cuatro horas y, posteriormente, en el periodo PD6–16 se duplicó el tiempo de separación (8 horas). Durante las horas en las que las crías fueron separadas de su madre estas permanecieron en sus jaulas con un aporte de calor para mantener la termorregulación (manta térmica a  $32\text{-}34^{\circ}\text{C}$ ), además, estas crías fueron destetadas en PD17. Por otro lado, el grupo SN permaneció sin separarse de sus madres hasta el destete (PD21). Finalmente, los ratones hembra se alojaron en jaulas con 4-5 animales.

### **2.3. Tratamiento**

Cada uno de estos dos grupos (MSEW y SN) fueron sometidos a un tratamiento con CBD (dosis de 20 mg/kg) i.p. o bien con suero salino (VEH), obteniendo los siguientes grupos: SN-VEH, SN-CBD, MSEW-VEH y MSEW-CBD. El tratamiento fue sostenido durante un periodo de diez días consecutivos (PD50-PD60). Tras cinco días de la última inyección se sometieron a pruebas de comportamiento. El CBD se disolvió en la solución del vehículo que consiste en etanol / cremophor ® EL (*Kelliphor*; Sigma-Aldrich,

Darmstadt, Alemania)/agua destilada (1:1:18). El volumen de inyecciones fue de 0,1 ml por 10 g de peso corporal del ratón. El CBD fue generosamente proporcionado por Phytoplant Research S.L. (Córdoba, España).

## **2.4. Pruebas de Conducta**

### **2.4.1. Laberinto en cruz elevado (Elevated Plus Maze)**

Los cuatro grupos (N=10) se sometieron a la prueba de conducta de tipo ansioso en el laberinto en cruz elevado (EPM) cinco días después (PD65) de finalizar el suministro del tratamiento (CBD o VEH) (22,23). Los datos fueron recogidos automáticamente mediante software de análisis automático del comportamiento SMART 2.5 (Panlab s.l.u., Barcelona, España) (ver anexo 1).

### **2.4.2. Prueba de suspensión de la cola (Tail Suspension Test)**

En el día PD66 se procedió a realizar la prueba de suspensión por la cola en ratones (23). La actividad de estos ratones fue registrada por video y un observador desconocedor de las condiciones experimentales. De esta manera, se contabilizó el tiempo que el animal permaneció inmóvil a lo largo de la prueba (ver anexo 1).

### **2.4.3. Histoquímica cuantitativa de la citocromo c oxidasa (CCO)**

Los ratones hembra utilizados para este experimento fueron sacrificados al siguiente día, PD67, y sus cerebros fueron extraídos rápidamente y congelados en isopentano, mantenidos a  $-40^{\circ}\text{C}$  para la histoquímica. Más tarde, se obtuvieron una serie de secciones de cortes cerebrales coronales de un grosor de  $30\ \mu\text{m}$  para cada sujeto mediante el uso de un microtomo de criostato a  $-20^{\circ}\text{C}$ , cada una de las secciones fueron colocadas en portaobjetos y se procesaron para la histoquímica cuantitativa de CCO, siguiendo el método descrito por Gonzales-Lima y Jones (1994). También se prepararon secciones de homogeneizado cerebral con actividad conocida de CCO medida mediante espectrofotometría, de manera que fueron utilizados como estándares de calibración para cada baño de tinción de CCO. La tinción histoquímica con CCO se realizó siguiendo el protocolo descrito en Conejo NM, González Pardo, H, Gonzalez-Lima F, Arias JL, 2009 (24,25).

Para poder realizar comparaciones teniendo en cuenta las variaciones de tinción que puedan existir entre las secciones cerebrales de baños distintos, se tomaron las medidas

de los estándares de homogenización calculando curvas de regresión entre el grosor de la sección y la actividad de CCO previamente determinada mediante ensayo espectrofotométrico.

Para medir la intensidad de tinción histoquímica de CCO se realizó un análisis de densitometría óptica mediante una estación de trabajo de análisis de imágenes mediante un software específico. Se obtuvieron lecturas de la densidad óptica relativa (ROD) para las siguientes regiones cerebrales de interés (doce lecturas por cada región, tomando 3x3 en secciones consecutivas) (24,25) usando para su identificación el atlas cerebral de ratón (Allen Institute for Brain Science, versión 2, 2011; <http://atlas.brain-map-org/>): corteza infralímbica (ILA), corteza prelímbica (PL), corteza cingulada anterior (ACAd), Núcleo Accumbens Core y Shell (ACB), núcleo del lecho estriado (BST), Caudado-Putamen (CP), núcleo paraventricular hipotalámico (PVH), hipocampo (HP) dorsal CA1 y CA3 y giro dentado (DG), amígdala basal (BA), amígdala lateral (LA), amígdala central (CeAm), amígdala medial (MeA), amígdala cortical (CoA), hipocampo ventral (CA1, CA3 y giro dentado).

Las lecturas de ROD (densidad óptica relativa), convertida en unidades de actividad CCO (mol de citocromo c oxidasa/min/g peso húmedo del tejido) por el sistema de densitometría digital MCID Elite (Linton, Reino Unido), para cada sujeto se realizaron sin conocer el grupo experimental al que pertenecían.

#### **2.4.4. Análisis estadísticos de los resultados**

Para las pruebas de conducta se realizó un análisis ANOVA de dos factores con las variables tratamiento y condiciones de estrés para las medidas obtenidas en las pruebas EPM y TST. Para ello se utilizó el software IBM SPSS Statistics 23.0.

Tras realizar las medias de los 12 datos por región y sujeto, se procedió a agrupar los datos de actividad de CCO de cada sujeto en el grupo que correspondiera para realizar un análisis estadístico ANOVA de dos factores, tomando como factores fijos las condiciones de estrés (niveles: con separación materna y sin separación materna) y tratamiento (cannabidiol o vehículo). Se analizaron los datos para cada una de las regiones analizando la relación que puede existir entre los dos factores (estrés y tratamiento) estableciendo que existe una relación estadísticamente significativa si  $p < 0,05$ . Cuando se obtiene que existe efecto significativo de algún factor principal o bien de la interacción

entre los dos factores, se realizó un análisis a posteriori mediante el método de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.



### 3. Resultados:

#### 3.1. Experimento: Efectos ansiolíticos y antidepresivos del CBD

Los datos recogidos de las pruebas de conducta fueron realizados por el grupo de investigación en Neurobiología del Comportamiento dirigido por la profesora Dña. Olga Valverde de la Universidad Pompeu Fabra.

##### Efectos ansiolíticos del CBD en ratones SN y MSEW

El ANOVA bidireccional reveló un efecto *del tratamiento* en el tiempo pasado en los brazos abiertos ( $F_{1,35}=14,75, p<0,001$ ; Figura 1B) y entradas totales en brazos abiertos ( $F_{1,35}=18,2; p<0,001$ ; Figura 1C). El análisis mostró que el CBD aumentó todas las variables tanto en SN como en MSEW, teniendo un papel ansiolítico en ratones hembra. Sin embargo, no se encontró ni efecto de *crianza* ni interacción entre variables. Cuando se analizó la distancia recorrida en la EPM, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 1D).

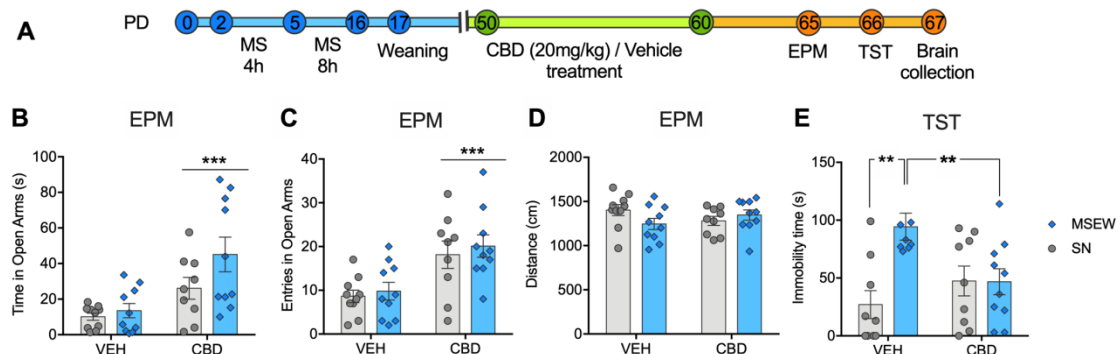


Figura 1. Comportamientos similares a la ansiedad y a la desesperación en ratones MSEW y SN después del tratamiento con CBD. (A) Línea de tiempo experimental del Experimento 1. Las barras grises (nido estándar, SN) y azules (separación materna con destete temprano, MSEW) representan (B) el tiempo pasado en brazos abiertos, (C) el número de entradas en brazos abiertos y (D) la distancia recorrida en el laberinto más elevado (EPM), y (E) el tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de cola (TST;  $n=8-10$ ). CBD, cannabidiol; EM: separación materna; PD, Día Posparto.  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$  para la comparación de los grupos tratados con CBD y VEH. Todos los datos se representan como la media  $\pm$  error.

##### Efecto antidepresivo del CBD en ratones hembra MSEW

El ANOVA bidireccional reveló un efecto *de crianza* ( $F_{1,36}=7,66; p<0,01$ ) y la interacción *tratamiento* $\times$ *crianza* ( $F_{1,36}=7,96; p<0,01$ ; Figura 1E). El análisis indicó que los ratones hembra de MSEW pasaron más tiempo inmóviles que los animales de SN. El análisis *post-hoc* con la corrección de Bonferroni mostró que los animales MSEW-VEH permanecieron mayor tiempo inmóviles que los ratones SN-vehículo ( $p < 0,01$ ). Por otra

parte, reveló que el CBD redujo el tiempo de inmovilidad solo en MSEW en comparación con su grupo de control VEH ( $p < 0,01$ ), lo que indica un papel antidepresivo solo en ratones MSEW.

### **Actividad CCO**

Como muestra la tabla 1, se observaron efectos del tratamiento en el hipocampo dorsal CA3 ( $F(1,34)=6,225$ ;  $p=0,018$ ) y en el DG dorsal ( $F(1,34)=5,346$ ;  $p=0,027$ ). Se encontraron interacciones entre el tratamiento y las condiciones de estrés estadísticamente significativas en el hipocampo dorsal CA1( $F(1,34)=9,054$ ;  $p=0,005$ ) y CA3( $F(1,34)=15,397$ ;  $p < 0,001$ ). En el DG dorsal también se encontró interacciones entre ambos factores estadísticamente significativas ( $F(1,34)=5,346$ ;  $p=0,027$ ). También hubo interacción significativa en el hipocampo ventral CA1( $F(1,35)=4,194$ ;  $p=0,048$ ) y CA3( $F(1,35)=6,266$ ;  $p=0,017$ ) y en el DG ventral ( $F(1,35)=5,883$ ;  $p=0,021$ ). Se encontró, además, interacciones significativas en la amígdala, en concreto en las regiones basal ( $F(1,33)=9,224$ ;  $p=0,005$ ), lateral ( $F(1,33)=13,842$ ;  $p < 0,001$ ) y cortical( $F(1,32)=4,668$ ;  $p=0,038$ ).

REGIONES	VEH		CBD		ESTRÉS	TRATAMIENTO	INTERACCIÓN
	SN	MSEW	SN	MSEW			
Corteza infralímbica	27.307 ± 0.772	21.858 ± 0.772	23.504 ± 0.813	22.222 ± 0.772	ns	ns	ns
Corteza prelímbica	23.553 ± 0.905	22.429 ± 0.905	24.893 ± 0.954	22.970 ± 0.905	ns	ns	ns
Corteza Cingulada	23.857 ± 0.908	22.870 ± 0.908	25.187 ± 0.957	23.010 ± 0.908	ns	ns	ns
Núcleo Accumbens (Core)	25.214 ± 0.809	25.113 ± 0.809	24.796 ± 0.853	24.386 ± 0.809	ns	ns	ns
Núcleo Accumbens (Shell)	27.390 ± 1.196	28.397 ± 1.196	28.805 ± 1.261	26.682 ± 1.196	ns	ns	ns
BNST	20.440 ± 0.600	20.339 ± 0.600	21.483 ± 0.632	19.324 ± 0.600	ns	ns	ns
CPU	22.254 ± 0.677	21.835 ± 0.677	22.124 ± 0.714	21.608 ± 0.677	ns	ns	ns
PVN	18.018 ± 1.060	19.665 ± 1.006	18.159 ± 1.060	18.581 ± 1.202	ns	ns	ns
Hipocampo Dorsal Ca1	19.861 ± 0.972	22.520 ± 1.025	21.135 ± 1.025	17.782 ± 0.972	ns	ns	*
Hipocampo Dorsal Ca3	20.392 ± 1.059	26.736 ± 1.116	21.946 ± 1.116	19.754 ± 1.059	ns	*	*
Giro Dentado dorsal	27.798 ± 1.205	32.850 ± 1.270	28.609 ± 1.270	26.315 ± 1.205	ns	*	*
Amígdala Basal	26.512 ± 1.971	29.228 ± 1.971	31.468 ± 2.078	24.228 ± 1.971	ns	ns	*
Amígdala lateral	16.843 ± 0.946	21.784 ± 0.998	18.868 ± 1.058	16.456 ± 0.946	ns	ns	*
Amígdala central	21.323 ± 1.218	24.873 ± 1.284	22.764 ± 1.362	21.241 ± 1.218	ns	ns	ns
Amígdala medial	20.877 ± 1.627	24.526 ± 1.716	21.990 ± 1.820	20.565 ± 1.627	ns	ns	ns
Amígdala cortical	18.303 ± 1.103	23.032 ± 1.163	20.396 ± 1.233	20.086 ± 1.163	ns	ns	*
Hipocampo Ventral Ca1	25.662 ± 1.546	28.610 ± 1.546	27.584 ± 1.630	24.112 ± 1.546	ns	ns	*
Hipocampo Ventral Ca3	28.023 ± 1.629	30.908 ± 1.629	31.474 ± 1.717	26.093 ± 1.629	ns	ns	*
Giro Dentado Ventral	26.512 ± 1.971	29.228 ± 1.971	31.468 ± 2.078	24.490 ± 1.971	ns	ns	*

Tabla 1. Actividad CCO. Medida de las medias  $\pm$  error estándar para cada región. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con un asterisco (\*), mientras que si no existen se señala como “ns”. Para determinar si hay o no diferencias significativas, los valores de p deben ser menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Las pruebas *post-hoc* de interacciones significativas indicaron que el grupo MSEW-CBD tenía actividad CCO significativamente menor que el grupo MSEW-VEH en el hipocampo dorsal CA1 ( $p = 0,002$ ) y CA3 ( $p < 0,001$ ), el DG dorsal ( $p < 0,001$ ), la amígdala basal ( $p < 0,001$ ), lateral ( $p < 0,001$ ) y en el hipocampo ventral CA1 ( $p = 0,047$ ) y CA3 ( $p = 0,044$ ). Además, la actividad CCO fue significativamente mayor para el grupo

MSEW-VEH que para el grupo SN-VEH en el hipocampo CA3 dorsal ( $p < 0,001$ ), el DG dorsal ( $p = 0,007$ ), la amígdala basal ( $p = 0,01$ ), lateral ( $p = 0,001$ ) y cortical ( $p = 0,006$ ). En el hipocampo CA1 dorsal ( $p = 0,023$ ), el hipocampo CA3 ventral ( $p = 0,029$ ) y el DG ventral ( $p = 0,02$ ) se observó que la actividad CCO era significativamente mayor para el grupo SN-CBD que para el grupo MSEW-CBD.

#### 4. Discusión

La exposición temprana a estrés por separación materna conlleva cambios neurobiológicos estructurales y funcionales en distintas regiones cerebrales que subyacen a alteraciones conductuales y trastornos psicológicos como trastornos de la ansiedad o depresión (12,14,16,17,26).

En cuanto a los datos conductuales obtenidos, en el EPM se observó que la actividad exploratoria de los animales se incrementaba para ambas condiciones de cría cuando se trataron con CBD, de manera que se obtuvo un papel ansiolítico el CBD. Esto coincide con otros estudios que han identificado como el CBD disminuye los niveles de ansiedad en ratones que han sido sometidos a separación materna ya que también han notificado un mayor número de entradas a brazos abiertos en EPM y mayor tiempo de exploración de los brazos abiertos (3,9,11,18). Por otro lado, en la prueba TST los datos obtenidos indicaron diferencias entre ratones MSEW-VEH y SN-VEH, donde los primeros mantuvieron mayor tiempo de inmovilidad. Además, en ratones MSEW tratados con CBD se redujo el tiempo de inmovilidad en comparación con ratones SN-CBD, de manera que se puede observar un efecto antidepresivo en hembras MSEW. Otros estudios sobre los efectos del estrés temprano han señalado la inmovilidad en el TST como una conducta de tipo depresiva, mientras que investigaciones que valoran el uso de CBD anotan también sus propiedades antidepresivas habiendo observado una disminución del tiempo de inmovilidad(3,11,18).

La actividad CCO en hipocampo CA3 dorsal, el giro dentado dorsal, y el complejo amigdalino (núcleos BA, LA, CoA) aumenta en ratones sometidos a separación materna frente al grupo control específico, lo que coincide con las alteraciones conductuales observadas. El hipermetabolismo en estas regiones también ha sido informada por otros autores, que también destacan otras regiones como la región CA1 del hipocampo o la corteza prefrontal (15,17,19), pero, sin embargo, en nuestro estudio no se han obtenido diferencias significativas que indiquen mayor o menor actividad tras una exposición temprana al estrés, como una menor actividad de la corteza prefrontal o el núcleo accumbens(15,26,27). Sin embargo, la literatura sobre roedores hembra es limitada, y dada las diferencias en la respuesta al estrés entre especies y cepas expresada por otros autores, esto puede deberse a la actividad de los esteroides neuroactivos(28), ya que

ciertos estudios informan de su influencia en la respuesta al estrés, por ejemplo, en un estudio comparativo de ratas hembras y machos sometidos a separación materna en el que se estudió los niveles de expresión de MR (receptor de mineralcorticoides) se encontraron niveles más altos de MR en PFC e hipocampo dorsal en machos(29) que se considera un efecto compensador, ausente en hembras, lo que indicaría una liberación de corticoesteroides mayor inducida por estrés(29). Otros estudios indican mayor actividad inflamatoria en regiones cerebrales en machos que en hembras, por ejemplo, se han encontrado mayor concentración de citocinas y disminuida la actividad mitocondrial en ratas macho en PFC e hipocampo(26), por lo que se ha sugerido que los estrógenos y progesterona cumplen un papel antiinflamatorio(12,26,28,29).

Por otro lado, el tratamiento con CBD en ratones MSEW disminuyó la actividad de CCO en hipocampo dorsal (CA1, CA3 y DG), amígdala basal y lateral e hipocampo CA1 y CA3 ventral. Estos datos coinciden también con los datos conductuales, donde el tratamiento con CBD atenuaba los comportamientos de tipo ansioso y depresivo. En el caso de hipocampo dorsal (CA3 y DG) y amígdala basal y lateral, podríamos suponer que se ha normalizado la actividad de la región tras el tratamiento, sin embargo, también observamos otras regiones donde la actividad no había sido significativamente diferente entre ratones MSEW y SN, pero resulta disminuida tras el tratamiento con CBD. Esto concuerda con otros estudios donde el CBD en sujetos ansiosos había reducido también la actividad de hipocampo y amígdala, en concordancia de una disminución de los comportamientos de tipo ansioso, por tanto, podríamos decir que nuestros estudios confirman el papel ansiolítico del CBD en estas regiones para ratones hembra sometidos a estrés temprano (8,9,11). Sin embargo, otros datos de actividad CCO indican que existe una diferencia también de actividad para el tratamiento con CBD entre ratones MSEW y SN. Estas diferencias mostraron una actividad menor para los ratones MSEW en el hipocampo dorsal CA1 y en hipocampo ventral (CA3 y DG), por tanto, podría indicar un efecto ansiolítico y antidepresivo solo en hembras MSEW, que también se comunicó en la prueba TST.

Este hipermetabolismo registrado de CCO coincide con algunos estudios anteriores que informan sobre la actividad mitocondrial en las neuronas en individuos ansiosos (distintos modelos animales y humanos) donde se observaba alteraciones en el metabolismo energético, con una excesiva producción de energía y procesos de

fosforilación oxidativa, que se han mostrado en distintas regiones cerebrales. De esta producción excesiva surgen además los niveles altos de ROS (especies reactivas de oxígeno), por tanto, los niveles de estrés oxidativo se incrementan pudiendo llegar a producir la apoptosis de la célula(6,30–32). Así, varios estudios sugieren que los trastornos emocionales pueden tener una relación con las disfunciones mitocondriales(31,33). Esto podría tener relación también con otros estudios que encontraban una disminución del volumen dendrítico en las regiones afectadas. Si tenemos en cuenta la literatura sobre la actividad del CBD sobre la CCO, se detectó que la CCO era inhibida por el cannabidiol, que actuaba como neuroprotector contra el estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno(34,35). Sin embargo, los mecanismos de actuación del CBD sobre las membranas mitocondriales deben aún investigarse, ya que se conoce la presencia de receptores CB<sub>1</sub>(34), cuya activación por CBD reduce la actividad mitocondrial, pero también puede implicar otros mecanismos, por ejemplo, algunos artículos mencionan un bloqueo de la señalización apoptótica por CBD regulando la homeostasis de Ca<sup>+2</sup>(35).

En este estudio podemos considerar algunas limitaciones, como el número de animales, ya que se trata de un tamaño de muestra pequeño dado la intención de utilizar el menor número posible, o el estado de las muestras, dado que el tejido cerebral fue transportado desde la Universidad de Pompeu Fabra hasta la Universidad de Oviedo, trayecto en el cual pudo haberse roto la cadena de frío de manera que la conservación de los tejidos no fuera la óptima. En la misma línea, si tenemos en cuenta las secciones seleccionadas, en varias regiones hubo problemas para tomar las medidas ROD, ya que parte de las muestras estaban rotas u oscuras, como fue claro ejemplo el caso del hipocampo y giro ventral. Además, este trabajo no considera las diferencias en las concentraciones hormonales que se producen a lo largo del ciclo estral, lo cual podría alterar los resultados ya que se conoce que los estrógenos y progesterona influyen en la modulación de la respuesta al estrés(26,28,29).

En cuanto al número de pruebas realizadas, solo se ha medido el metabolismo energético mediante técnica histoquímica de CCO, sin embargo, se deberían realizar otras pruebas que permitan comprobar los niveles de estrés oxidativo, la expresión de ADN mitocondrial que otros autores han señalado que se ve aumentada en animales que han sido sometidos a separación materna y se ha asociado a trastornos emocionales (31). Por

otro lado, también podría ser útil investigar con dosis de CBD diferentes, ya que esta dosis ha sido determinada como estándar habiendo evaluado la dosis con mejores efectos en machos. Podríamos tener en cuenta otras pruebas para indicar otros efectos del CBD que también se asocian a sus características ansiolíticas y antidepresivas como el efecto positivo sobre la neurogénesis en el hipocampo, o la expresión de BDNF que otros trabajos afirman que aumenta con el cannabidiol (8,10), o bien se podría detectar con otras técnicas histoquímicas la densidad de receptores CB1 o 5-HT1A. Otros autores han indicado que el CBD tiene efecto indirecto o directo, respectivamente, sobre estos, modulando la actividad del sistema endocannabinoide. Otras medidas podrían informar de la concentración de endocannabinoides como AEA, sobre la cual actúa indirectamente inhibiendo el enzima FAAH que la hidroliza.



## 5. Conclusiones

Tras este estudio podemos concluir con lo siguiente:

- Las consecuencias adversas del estrés por separación materna se atenúan con el CBD.
- Aumentan las conductas exploratorias de los ratones hembra tratados con CBD, que se relaciona en nuestra investigación con una disminución de los comportamientos de tipo ansioso.
- Disminuye el tiempo de inmovilidad en TST para ratones sometidos a separación materna y tratados con CBD, indicando una disminución de las conductas de tipo depresivas.
- La separación materna induce un aumento de metabolismo energético en hipocampo dorsal (CA3 y DG), complejos amigdalinos (núcleos basal, lateral y cortical), en relación posiblemente con sus efectos adversos sobre respuestas emocionales de la exposición a estrés temprano.
- El CBD disminuye el metabolismo energético de hipocampo dorsal (CA1, CA3 y DG), amígdala basal y lateral e hipocampo ventral en ratones hembra, lo que sugiere una acción específica del CBD sobre regiones implicadas en procesos emocionales y cognitivos.

## 6. Referencias

1. Ligresti A, De Petrocellis L, Di Marzo V. From phytocannabinoids to cannabinoid receptors and endocannabinoids: Pleiotropic physiological and pathological roles through complex pharmacology. *Physiol Rev.* 2016;96(4):1593–659.
2. Stasiłowicz A, Tomala A, Podolak I, Cielecka-Piontek J. Cannabis sativa L. As a natural drug meeting the criteria of a multitarget approach to treatment. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):1–31.
3. Zlebnik NE, Cheer JF. Beyond the CB1 Receptor: Is Cannabidiol the Answer for Disorders of Motivation? *Annu Rev Neurosci.* 2016;39(February):1–17.
4. Shannon S, Lewis N, Lee H, Hughes S. Cannabidiol in Anxiety and Sleep: A Large Case Series. *Perm J.* 2019;23:18–041.
5. Araque A, Castillo PE, Manzoni OJ, Tonini R. Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. *Neuropharmacology* [Internet]. 2017;124:13–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.06.017>
6. Calapai G, Mannucci C, Chinou I, Cardia L, Calapai F, Sorbara EE, et al. Preclinical and Clinical Evidence Supporting Use of Cannabidiol in Psychiatry. Evidence-based Complement Altern Med. 2019;2019(Figure 1).
7. Luján MÁ, Castro-Zavala A, Alegre-Zurano L, Valverde O. Repeated Cannabidiol treatment reduces cocaine intake and modulates neural proliferation and CB1R expression in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology* [Internet]. 2018;143(June):163–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.09.043>
8. Luján M, Valverde O. The Pro-neurogenic Effects of Cannabidiol and Its Potential Therapeutic Implications in Psychiatric Disorders. *Front Behav Neurosci.* 2020;14(June):1–11.
9. Campos AC, Ortega Z, Palazuelos J, Fogaça M V., Aguiar DC, Díaz-Alonso J, et al. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: Involvement of the endocannabinoid system. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013;16(6):1407–19.

10. Luján MÁ, Castro-Zavala A, Alegre-Zurano L, Valverde O. Repeated Cannabidiol treatment reduces cocaine intake and modulates neural proliferation and CB1R expression in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology*. 2018;143(September):163–75.
11. Schiavon AP, Bonato JM, Milani H, Guimarães FS, Weffort de Oliveira RM. Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2016;64:27–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.017>
12. Nishi M. Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors: Implications of Early Maternal Separation in Rodents. *Int J Mol Sci*. 2020;21(19).
13. Carr CP, Martins CMS, Stingel AM, Lemgruber VB, Juruena MF. The role of early life stress in adult psychiatric disorders: A systematic review according to childhood trauma subtypes. *J Nerv Ment Dis*. 2013;201(12):1007–20.
14. Lippard ETC, Nemeroff CB. The Devastating Clinical Consequences of Child Abuse and Neglect: Increased Disease Vulnerability and Poor Treatment Response in Mood Disorders. *Am J Psychiatry* [Internet]. 2020;177:20–36. Available from: <https://www.acf.hhs.gov/cb/research-data-technology/statistics-research/child-maltreatment>.
15. Van Bodegom M, Homberg JR, Henckens MJAG. Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Front Cell Neurosci*. 2017;11(April):1–33.
16. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(6):434–45.
17. Tiwari A, Gonzalez A. Biological alterations affecting risk of adult psychopathology following childhood trauma: A review of sex differences. *Clin Psychol Rev*. 2018;66(January):69–79.
18. Ros-Simó C, Valverde O. Early-life social experiences in mice affect emotional behaviour and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Pharmacol Biochem*

- Behav [Internet]. 2012;102(3):434–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2012.06.001>
19. Chen Y, Baram TZ. Toward understanding how early-life stress reprograms cognitive and emotional brain networks. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41(1):197–206.
  20. Bale TL, Epperson CN. Sex differences and stress across the lifespan. *Nat Neurosci*. [Internet] 2015;18(10):1413–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.4112>
  21. Gracia-Rubio I, Valverde O, Martínez-Laorden E, Moscoso-Castro M, Milanés MV, Laorden ML. Maternal separation impairs cocaine-induced behavioural sensitization in adolescent mice. *PLoS One*. 2016;11(12):1–20.
  22. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007;2(2):322–8.
  23. Gracia-Rubio I. Neurobiological links between depression and drug dependence. TDX (Tesis Dr en Xarxa). 2016;297.
  24. Gonzalez-Lima F, Cada A. Cytochrome oxidase activity in the auditory system of the mouse: A qualitative and quantitative histochemical study. *Neuroscience*. 1994;63(2):559–78.
  25. Conejo NM, González-Pardo H, Gonzalez-Lima F, Arias JL. Spatial learning of the water maze: Progression of brain circuits mapped with cytochrome oxidase histochemistry. *Neurobiol Learn Mem* [Internet]. 2010;93(3):362–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2009.12.002>
  26. González-Pardo H, Arias JL, Gómez-Lázaro E, Taboada IL, Conejo NM. Sex-specific effects of early life stress on brain mitochondrial function, monoamine levels and neuroinflammation. *Brain Sci* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Jun 25];10(7):1–17. Available from: [/pmc/articles/PMC7408325/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3448325/)
  27. Kawakami SE, Quadros IMH, Machado RB, Suchecki D. Sex-dependent effects of maternal separation on plasma corticosterone and brain monoamines in response to chronic ethanol administration. *Neuroscience*. 2013 Dec 3;253:55–66.

28. Sze Y, Brunton PJ. Effects of prenatal stress on neuroactive steroid responses to acute stress in adult male and female rats. *J Neuroendocrinol*. 2021;33(1):1–19.
29. Bonapersona V, Damsteegt R, Adams ML, van Weert LTCM, Meijer OC, Joëls M, et al. Sex-Dependent Modulation of Acute Stress Reactivity After Early Life Stress in Mice: Relevance of Mineralocorticoid Receptor Expression. *Front Behav Neurosci*. 2019;13(August):1–15.
30. Filiou MD, Sandi C. Anxiety and Brain Mitochondria: A Bidirectional Crosstalk. *Trends Neurosci* [Internet]. 2019;42(9):573–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.07.002>
31. Zitkovsky EK, Daniels TE, Tyrka AR. Mitochondria and early-life adversity. *Mitochondrion* [Internet]. 2021;57(January):213–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.01.005>
32. Teresa Daniels, M.D.a, b, Elizabeth Olsen, M.D.a, b, Audrey R. Tyrka MDP. Stress and Psychiatric Disorders: The Role of Mitochondria. *Annu Rev Clin Psychol*. 2020;16:165–86.
33. Picard M, McEwen BS. Psychological Stress and Mitochondria: A Conceptual Framework. *Psychosom Med*. 2018;80(2):126–40.
34. Fišar Z, Singh N, Hroudová J. Cannabinoid-induced changes in respiration of brain mitochondria. *Toxicol Lett*. 2014;231(1):62–71.
35. Singh N, Hroudová J, Fišar Z. Cannabinoid-Induced Changes in the Activity of Electron Transport Chain Complexes of Brain Mitochondria. *J Mol Neurosci*. 2015;56(4):926–31.

## **Anexo 1: Pruebas de conducta**

### **Laberinto elevado en cruz (EPM)**

El laberinto elevado en cruz es una prueba conductual que se utiliza para determinar los comportamientos de ansiedad en roedores (ratas y ratones). Se refiere a una prueba corta de cinco minutos en la que el animal se coloca en el centro de una plataforma de cuatro brazos dispuestos en cruz, dos de los cuales son cerrados y otros dos abiertos. Durante los 5 minutos se registran el número de entradas a los brazos abiertos, el tiempo que pasa en ellos y la distancia recorrida mediante un sistema grabador. El comportamiento en esta tarea (es decir, la actividad con los brazos abiertos) refleja un conflicto entre la preferencia del roedor por las áreas protegidas (en este caso, los brazos cerrados) y su naturaleza exploratoria en entornos nuevos. A pesar de ello, esta prueba es útil para medir los efectos ansiolíticos de distintos fármacos. El aumento del tiempo de brazos abiertos y / o del número de entradas en los brazos abiertos sirve para determinar el comportamiento ansiolítico de roedores, al mismo tiempo que sirve la medida de la actividad motora espontánea (entradas de brazos totales y / o cerradas) (22).



Figura 2. Laberinto elevado en cruz. Fuente: Instituto de Neurociencias de la Universidad de Oviedo.

### **Prueba de suspensión por la cola (TST)**

La prueba de suspensión por la cola se utiliza para evaluar conductas de desesperación o de tipo depresivas en ratones. Consiste en sujetar a un ratón a 1cm del extremo de la cola mediante cinta adhesiva en una plataforma a 50cm de altura durante

un periodo de seis minutos. Esta prueba se basa en la evidencia de que un ratón que se encuentra en una situación de la cual no puede escapar, como es estar suspendido por la cola a una altura de 50 cm, la reacción inicial del animal será intentar escapar, sin embargo, posteriormente terminará por quedarse inmóvil, lo que indicaría una conducta de desesperación. El tiempo que el animal permanece inmóvil mide el índice de desesperación, que se considera una conducta de tipo depresiva. Por tanto, esta prueba es utilizada para evaluar la eficacia de tratamientos antidepresivos, de manera que se considera que si disminuye el tiempo que pasa inmóvil el animal entonces el tratamiento reduce las conductas de tipo depresivo (23).



Figura 3. Test de suspensión por la cola. (Fuente: Gracia-Rubio I. Neurobiological links between depression and drug dependence. TDX (Tesis Dr en Xarxa). 2016;297)