



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efectos del fitocannabinoide cannabidiol sobre la excreción de sodio en ratas Wistar

Heidy Viviana Yepes Gómez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamentode Ciencias Fisiológicas
Bogotá D.C., Colombia
2024

Efectos del fitocannabinoide cannabidiol sobre la excreción de sodio en ratas Wistar

Heidy Viviana Yepes Gómez
Medica Veterinaria Universidad Antonio Nariño

Tesis de investigación como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Fisiología

Directora:

Zulma Dueñas Lic. Biol. MSc. PhD

Co director:

Jhon Betancourt M.V. U. Caldas Msc U. Córdoba

línea de investigación:

Modelos animales; estrés y comportamiento; vínculo materno; neurobiología del estrés

Grupo de investigación:

Neurobiología y Comportamiento

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas

Bogotá D.C., Colombia

2024

La contemplación y admiración de lo vivo es un regalo que nos da Dios cada día.

“Un científico en su laboratorio no es solo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios y a la Virgencita por permitirme culminar este importante ciclo en mi desarrollo académico, ellos fueron, son y seguirán siendo el motor de mi vida

A la Universidad Nacional de Colombia por abrirme las puertas hacia la investigación y acogerme como una hija más.

Por supuesto agradezco a la Maestría en fisiología y por motivarme a ser mejor cada día, al Profe Miguel Martínez quien creyó en mi proyecto de investigación desde el primer momento, motivándome a seguir construyendo mi camino como fisióloga, gracias por su legado (Q.D.P).

A la secretaria Diana Arias por su empatía y colaboración durante todo este tiempo cursado en la maestría, a la secretaria Adelaida por su amabilidad y buena disposición, a Roció González como suelo decirle cariñosamente “mi Rochi” por ese abrazo maternal que recibía cada vez que llegaba al departamento de fisiología; gracias a cada una de ellas porque me hacían sentir en casa.

Desde luego quiero agradecer a mis padres y hermano, quienes me motivaron a seguir adelante durante toda la maestría, por sus trasnochos, sus consejos, sus esfuerzos, su dedicación y la infinita paciencia que tuvieron conmigo durante este proceso, por creer en mí desde el momento cero.

A la profesora Zulma Dueñas, por depositar en mí su voto de confianza y permitirme desarrollar la tesis, agradezco su paciencia y comprensión durante este periodo.

También agradezco inmensamente al Doctor Jhon Betancourt quien me abrió las puertas de VETCANN, y me permitió conocer y enamorarme del maravilloso universo del sistema endocannabinoide.

Agradezco al profesor Oscar Leonardo Gómez Duarte, por inculcarme el amor a la fisiología desde mi pregrado.

A la Doctora Francisca Medina, por permitirme conocer su trabajo, y establecer un dialogo fisiológico de la importancia del sistema endocannabinoide en cada célula y la complejidad del Endocannabinoidoma.

Por supuesto quiero agradecer al semillero de investigación de cannabis y derivados (SICAD), en especial al profe Luis Carlos, el profe Luis Ignacio, el doctor Andrés Turizo, al ingeniero Juan Manuel Galindo y a mi amiga y colega la doctora Diana Marcela Noval, quienes desde su disciplina se tomaron el tiempo, paciencia y dedicación de enseñarme todo acerca de los beneficios terapéuticos del cannabis y la importancia de esta planta en la fisiología.

A mis amigas de tesis en Especial Milena Lamprea, María Paula Ulloa y Angie Tarazona, quienes me apoyaron en la metodología de la tesis y me motivaron cada día para seguir adelante.

A mis compañeros de la Maestría por su apoyo y escucha incondicional. Por supuesto a mis amigos de la universidad, a los capellanes, al grupo del legón de María y al grupo Sin Medida por cada una de sus oraciones.

A esos amigos que durante el curso de la maestría me acompañaron y aportaron en mi crecimiento personal y profesional: Sandra Milena Lamprea, Juan David Ramírez, Cesar Espitia, Carlos Alberto Torres, Mariel Paternina, Sergio Quintana, Steeven Flórez, Angela Gómez y Giselle Bonilla.

También quiero agradecer al equipo de trabajo del AH neurología veterinaria por su motivación y consejos.

Finalmente quiero agradecer a mi gran amiga Diana Lozada quien siempre estuvo presente para darme una palabra de aliento, aportando en mi crecimiento, personal, profesional y espiritual

Resumen

Efectos del fitocannabinoide cannabidiol sobre la excreción de sodio en ratas Wistar

La excreción de sodio a nivel renal en modelo murino, inducida por el CBD, está mediada por la unión del ligando en este caso el fitocannabinoide con los receptores para cannabis. Esta interacción modula el Endocannabinoidoma a nivel renal, específicamente en la reabsorción de sodio, modificando en cierta medida la tasa de filtración glomerular. En referencia a lo previamente explicado, este trabajo tuvo como objetivo identificar los efectos del fitocannabinoide cannabidiol a diferentes dosis, sobre la reabsorción de sodio a nivel renal. Metodología: Se están utilizaron 30 ratas macho Wistar, adultas (3 meses de edad), distribuidos en 4 grupos, grupo control, grupo vehículo, grupo al os que se les aplicó vía intraperitoneal CBD disuelto en acetite de oliva extra virgen a diferentes dosis (15, 30 y 50 mg/Kg) 48 horas previo a la toma de la muestra. El método utilizado para tomar la orina fue recolección directa puntual, que consiste en realizar un estímulo táctil sobre la espalda del animal, colocando un vaso precipitado de 5ml cerca de la zona perineal. Las muestras se almacenaron a -20°C, hasta su análisis por espectrometría de masas y análisis estadístico (ANOVA unifactorial; software spss, $p=0.05$). Resultados: los datos obtenidos indican que al aumentar la dosis de cannabidiol, 48 horas después de su aplicación, se evidencia un incremento de la excreción de sodio, Probablemente por una disminución de la actividad de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ a nivel del túbulo proximal. Conclusión: Estos resultados apoyan la hipótesis que sugiere que el CBD es un antagonista de los receptores CB1 y agonista de los receptores TRPV1 a nivel renal, aumentando la excreción de sodio a nivel renal.

Palabras clave: Reabsorción de sodio a nivel renal, Endocannabinoidoma, filtración glomerular, receptor CB1, CBD

Abstrac

Effects of the phytocannabinoid cannabidiol on sodium excretion in Wistar rats

The excretion of sodium at the renal level in the murine model, induced by CBD, is mediated by binding of the ligand in this case the phytocannabinoid to the receptors for cannabis. This interaction modulates the Endocannabinoidome at the renal level, specifically in sodium reabsorption, modifying to some extent the glomerular filtration rate. In reference to the previously explained, this study aimed to identify the effects of the phytocannabinoid cannabidiol at different doses, on sodium reabsorption at the renal level. Methodology: Thirty adult male Wistar rats (3 months of age) were used, distributed in 4 groups, control group, vehicle group, to which were administered intraperitoneally CBD dissolved in extra virgin olive oil at different doses (15, 30 and 50 mg/Kg) 48 hours prior to sampling. The method used to collect urine was direct collection, which consists of performing a tactile stimulus on the back of the animal, placing a 5ml precipitated vessel near the perineal area. Samples were stored at -20°C until analysis by mass spectrometry and statistical analysis (single-factorial ANOVA; spss software, $p=0.05$). Results: the data obtained indicate that when increasing the dose of cannabidiol, 48 hours after its application, there is evidence of an increase in sodium excretion, probably due to a decrease in the activity of the Na⁺/K⁺ATPase pump at the level of the proximal tubule. Conclusion: These results support the hypothesis that CBD is an antagonist of CB1 receptors and agonist of TRPV1 receptors at the renal level, increasing sodium excretion at the renal level.

Keywords: Renal sodium reabsorption, Endocannabinoidome, glomerular filtration, CB1 receptor, CBD

Contenido

	Pág
Lista de figuras	X
Lista de Tablas	XI
Lista de abreviaturas	XII
Introducción	1
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Anatomía renal comparada del roedor y del canino.....	5
1.2 Fisiología renal.....	9
1.3. Bomba Na⁺/K⁺ATPasa a nivel renal	12
1.4. Sistema endocannabinoide	17
1.4.1. Endocannabinoidoma	18
1.4.2. Caracterización de los receptores CB1 y CB2 acoplados a proteínas G	21
1.4.3. Caracterización del receptor TRPV1 (Receptor de potencial transitorio V1)	23
1.4.4. Producción de ligandos endocannabinoides a partir de ácidos grasos	23
1.4.5. Sistema endocannabinoide a nivel renal.....	24
1.4.6. Interacción del sistema endocannabinoide con la bomba Na ⁺ /K ⁺ ATPasa y la hemodinámica renal	26
1.4.7. Fitocannabinoide cannabidiol (CBD)	28
1.5. Métodos para determinar la tasa de filtración glomerular	30
1.5.1. Método de espectrometría de masas.....	33
2. JUSTIFICACIÓN	34
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
4. OBJETIVOS	38
4.1. Objetivo general	38
4.2. Objetivos específicos	38
5. PROCEDIMIENTOS Y METODOLOGÍA.....	39

5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	39
5.1.1. Unidades experimentales	39
5.1.2. Procedimientos	40
5.1.3. Material Necesario para recolección directa puntual en vaso precipitado	40
5.1.4. Sujeción del sujeto de estudio durante la toma de la muestra	41
5.1.5. Protocolo de toma de muestra	41
5.1.6. Administración del CBD.....	41
5.1.7. Envío de orina a laboratorio para medición de sodio.....	42
5.2. Definición de variables	44
5.3. Análisis estadístico.....	45
5.4. Consideraciones éticas	45
6. RESULTADOS.....	47
6.1. SODIO EN ORINA	52
6.2. GRAFICA DE MEDIAS.....	54
7. DISCUSIÓN.....	55
8. CONCLUSIONES.....	62
9. RECOMENDACIONES Y PRODUCCIÓN ACADÉMICA	63
9.1. Productos académicos.....	64
.....	64
.....	65
A. Anexo: Certificado de trazabilidad del CBD	66
10. REFERENCIAS	68

Lista de figuras

	Pág
Ilustración 1. Comparación entre la nefrona del canino y el murino.....	8
Ilustración 2. Comparación histológica del tejido renal entre la rata Wistar y el canino	11
Ilustración 3. Ciclo de la bomba Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	14
Ilustración 4. Endocannabinoidoma	19
Ilustración 5. Estructura del receptor CB1 ligado a proteínas G.....	22
Ilustración 6. Fisión mitocondrial	27
Ilustración 7. Evaluación de la tasa de filtrado glomerular mediante el sodio.....	32
Ilustración 8. Técnica de espectrometría de masas.....	33
Ilustración 9. Diseño experimental y cronología de grupos de trabajo.....	43
Ilustración 10. Cajas y bigotes.....	52
Ilustración 11. Cajas y bigotes de valores de excreción de sodio a nivel renal, 48 horas	53
Ilustración 12. Gráfica de medias	54
Ilustración 13. cascada de señalización del receptor CB1	60

Lista de Tablas

Tabla 1. Anatomía Renal del murino y el canino.....	7
Tabla 2. Distribución de los receptores cannabinoides en el tejido renal de rata, ratón, humano y porcino.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 3. Ventajas y desventajas de los métodos para medir la filtración glomerular.....	31
Tabla 4. Definición operacional y escala de medición de variables.....	44
Tabla 5. Tipo y definición conceptual de variable.....	44
Tabla 6. Resultados de sodio.....	47
Tabla 7. Estadísticos descriptivos para cada variable.....	48
Tabla 8. Prueba de Shapiro-Wilk	49
Tabla 9. Prueba de homogeneidad de varianzas.....	50
Tabla 10. ANOVA.....	50
Tabla 11. Prueba te Tukey.....	51

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
2-AG	2-araquidonil glicerol
AEA	Anandamida
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
Ca ²⁺	Calcio
CaMK1	Ca ²⁺ /proteína quinasa dependiente de calmodulina 1
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1
CB2	Receptor cannabinoide tipo 2
CBD	Cannabidiol
CBDA	Ácido cannabidiólico
CBP	reguladores del elemento respuesta del AMPc
CREB	Enlace de elemento de respuesta al AMPC (factor de transcripción)
CRTC	Coactivadores transcripcionales reguladores
DA1	Receptor de dopamina tipo 1
DAG	Diacilglicerol
DAG α	Diacilglicerol α
DAG β	Diacilglicerol β
DRP1	Fosforilación de la proteína 1
FAAH	Amida hidrolasa de ácidos grasos
GPR 18	Receptor ligado a proteína G 55
GPR 55	Receptor ligado a proteína G 55
HAT	Histona acetil transferasa
K ⁺	Potasio
KID	Dominio inducible por quinasa
LPA	Fosfolipasa A
LPA1	Fosfolipasa A1
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAGLK	Monoacilglicerol quinasa
Na ⁺	Sodio
Na ⁺ /H	Cotransportador sodio/hidrogeno
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	Bomba sodio potasio ATPasa

NAPE-PLD	N-acilfosfatidiletanolamida- fosfolipasa D
PKA	proteínquinasa A
PKC	proteínquinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PME1	Proteína fosfatasa metiltransferasa 1
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PP2B[calmodulina	proteína fosfatasa 2B dependiente de Ca^{2+} /calmodulina
SGLT1	Transportador de sodio-glucosa tipo 1
SGLT2	Transportador de sodio-glucosa tipo 2
SK1	Quinasa 1 inducible por sal
TFG	Tasa de filtración glomerular
THC	Δ -9-tetrahidrocannabinol
THCA	Ácido tetrahidrocannabinólico
TRPV1	Receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1

Introducción

La situación legal del uso médico y científico de cannabis y sus derivados en Colombia se encuentra regulada por la ley 1787 del 2016. Dentro de este marco regulatorio, se determina el acceso seguro e informativo del empleo médico y científico del cannabis y sus derivados. Por otro lado, el Invima en cumplimiento a la normatividad antes mencionada, regula la licencia y fabricación de los derivados de cannabis con fines científicos y medicinales. Por los anterior, los médicos veterinarios en el territorio colombiano optan por utilizar el cannabis medicinal para el tratamiento de enfermedades degenerativas, especialmente en pacientes caninos (1,2)

Un porcentaje considerable (aproximadamente el 75%) de pacientes caninos que padece enfermedades neurodegenerativas, similares a la de los humanos (3,4), están consumiendo fitocannabinoide cannabidiol (CBD) como plan terapéutico coadyuvante. Hasta el momento, no se han reportado efectos colaterales o terapéuticos de las diferentes dosis del CBD a nivel renal, puntualmente sobre la reabsorción de sodio en los mamíferos. Por ello, al utilizar un modelo animal (ratas Wistar) que comparten funciones fisiológicas a nivel renal con los caninos, además de ser una población homogénea, facilita la interpretación de los resultados.

El sistema endocannabinoide se expuso por primera vez, entre 1960-1990 por el doctor Raphael Mechoulam (5,6) . Este sistema cuenta con receptores para endocannabinoides conocidos como receptor para cannabis tipo 1 (CB1) y receptor para cannabis tipo 2 (CB2) (6–9). Estos receptores están ligados a proteínas G, donde interactúan con endocannabinoides sintetizados a partir del ácido araquidónico y diferentes ácidos grasos en la membrana celular (10). Los endocannabinoides principales son anandamida (AEA) y 2 araquidonil glicerol (2AG), estos son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, derivados de los fosfolípidos de membrana (11), que se liberan a demanda cuando aumentan los niveles de calcio (12,13) . Los endocannabinoides y sus receptores fueron aislados en primer lugar en el tejido neuronal por el Doctor Mechoulam, en el que se describió la presencia de una señalización retrograda.

Es decir, la AEA y el 2AG se sintetizan y liberan a demanda de la membrana celular de la neurona postsináptica, por el aumento de calcio en el espacio intersináptico. Luego, los endocannabinoides interactúan con los receptores CB1 y CB2 ubicados en la membrana presináptica, con el propósito de disminuir la síntesis, almacenamiento y liberación de ciertos neurotransmisores (7). También, el Doctor Raphael Mechoulam describió las enzimas que sintetizan y degradan a la AEA y al 2AG. En el caso de la anandamida, las enzimas responsables de su biosíntesis son N -acilfosfatidiletanolamida-fosfolipasa D (NAPE-PLD), fosfatidiletanolamina, y para su degradación las enzimas a cargo son la enzima hidrolítica de ácidos grasos (FAAH), diferentes lipooxigenasas (LOX) y ciclooxigenasas-2 (cox2) (14).

Las enzimas que están involucrada en la biosíntesis del 2AG son la fosfolipasa C (PLC), la fosfolipasa A (LPA), la fosfolipasa A1 (LPA1), el diacilglicerol (DAG), el diacilglicerol lipasa (DAGL) tanto α como β (DAGL α y DAGL β). Por su parte, las enzimas responsables de la degradación del 2AG son monoacilglicerol lipasa (MAGL), la FAAH y la monoacilglicerol quinasa (MAGLK) (11).

En la década de los 2000, el Doctor Vi Marzo, junto con el doctor Mechoulam y colaboradores aíslan más receptores que interactúan con los endocannabinoides (15,16). Algunos de estos receptores, son metabotrópicos ligados a proteínas G (GRP 55, GRP 18, GRP118), denominados receptores huérfanos, debido a que en la actualidad aún no se conocen sus ubicaciones y funciones específicas (10,17–20). Luego, se aislaron canales iónicos conocidos como receptores de potencial transitorio tipo 1 o receptor Vaniloideos tipo 1 (TRPV1), y el receptor nuclear activado por proliferadores de peroxisoma α (21–23).

Posteriormente, el Doctor Vi Marzo en el siglo XXI, dio el nombre de Endocannabinoidoma a la compleja señalización bioquímica desencadenada por la interacción de los endocannabinoides con sus receptores, su síntesis, degradación y transporte en las diferentes membranas celulares de los organismos que poseen este sistema (23).

El ácido cannabidiólico (CBDA), es el segundo componente natural más abundante presente en la planta de cannabis, después del ácido tetrahidrocannabinólico (THCA) (22). Cuando se descarboxila el CBDA se convierte en cannabidiol, conocido por ser el componente farmacológicamente activo de la planta de cannabis sativa (24). Este CBD, interactúa con los receptores del sistema endocannabinoide y con otros receptores, como lo son el receptor de 5-

hidrositriptamina 1 A (5-HT_{1A}), receptores de serotonina, receptores de dopamina D₂, receptores de adenosina A₁, receptores opioides, canales de sodio y canales de calcio (25).

El CBD al interactuar con los receptores GPR55, CB₁ y CB₂ se comporta como antagonista; por otro lado, al interactuar con los receptores TRPV₁ y el receptor nuclear se comporta como agonista. Esta unión a los diferentes receptores en el túbulo proximal modifica el Endocannabinoidoma a nivel renal, puntualmente en la reabsorción de sodio (26,27)

La distribución del sistema endocannabinoide a nivel renal se ha descrito tanto en humanos como en roedores; en humanos, varía levemente con respecto al de los roedores (28). Los receptores CB₁ en humanos se encuentran distribuidos en el túbulo contorneado proximal, túbulo contorneado distal y células intercaladas del túbulo colector (17,29). Por otro lado, en roedores el receptor CB₁ se localiza en las arteriolas eferentes, podocitos glomerulares, extremidades ascendentes gruesas del ASA de Henle, glomérulos, células epiteliales tubulares, y células mesangiales cultivadas (17,29). En cambio, la distribución de los ligandos y receptores CB₂ a nivel renal no difiere entre humanos y roedores (28).

En la corteza renal, se encuentran niveles similares de AEA y 2AG, mientras que en la medula los niveles de AEA duplican a los de 2AG (28). Por otro lado, la distribución de los receptores CB₂ a nivel renal, se encuentran en la corteza renal, podocitos, células del túbulo proximal y células mesangiales (26,28). La AEA es producida y metabolizada por las células mesangiales y endoteliales, uniéndose al receptor CB₁ para bloquear la producción de óxido nítrico sintasa y estimular la producción de óxido nítrico en el ASA de Henle (17,26). El óxido nítrico, a su vez, inhibe los canales de calcio-hidrogeno (Na^+/H^+), sodio/potasio, (Na^+/K^+), y 2 de cloro (Cl) - . Por lo tanto, estos mecanismos regulan el flujo sanguíneo renal, debido a que permiten la vasodilatación de las arteriolas aferentes yuxtglomerulares y la reabsorción de solutos, alterando la tasa de filtración glomerular (30,31). En la actualidad, se desconoce la distribución del sistema endocannabinoide a nivel renal en la especie canina.

La bomba sodio potasio ATPasa (Na^+/K^+ -ATPasa), se encuentra ubicada en la membrana basolateral de las células tubulares, su principal función es la reabsorción de sodio, manteniendo un gradiente de Na^+ a través del epitelio (26,27,32,33). El antagonismo del receptor CB₁ en la bomba produce una disminución en la activación de esta, regulando de esta

manera la reabsorción de sodio a nivel renal.

Como se mencionó anteriormente, los estudios del sistema endocannabinoide a nivel renal son pocos y el uso de fitocannabinoides en medicina veterinaria va en aumento. Por lo anterior, es necesario evidenciar la relación que tiene el CBD con la excreción de sodio, lo que permite comprender la importancia fisiológica del Endocannabinoidoma, en la reabsorción de sodio a nivel renal, y adicionalmente, en un futuro al desarrollo de estrategias terapéuticas en caninos.

1.MARCO TEÓRICO

1.1. Anatomía renal comparada del roedor y del canino

El sistema urinario cuenta con un órgano vital, el riñón (34); el mantenimiento del equilibrio hídrico, ácido base y electrolitos del organismo depende esencialmente de este órgano. De igual manera, el riñón está involucrado en el control de la osmolaridad, la secreción de desechos metabólicos y sustancias nocivas; adicionalmente, participa en la producción de hormonas con funciones multivariadas como la renina, calcitriol, la eritropoyetina, entre otras (35,36). La unidad funcional renal se denomina nefrona, compuesta por el glomérulo y un sistema tubular, dentro del glomérulo se encuentra el penacho glomerular el cual está constituido por tres capas: endotelio fenestrado, membrana basal glomerular y podocitos renales.

En los caninos el glomérulo está compuesto por arteriolas aferentes y eferentes, las primeras están conformadas por la mayoría de los capilares fenestrados del penacho glomerular, y las segundas se encargan de transportar la sangre filtrada a las nefronas yuxtglomerulares, para finalmente drenar la sangre al sistema venoso (37).

Al igual que en los roedores, en los caninos los riñones son de estructura lisa; sin embargo, durante el desarrollo embrionario el canino tiene un riñón multilobular, estos lóbulos discretos se fusionan (las pirámides renales son un vestigio de la lobulación embrionaria), por ello, el riñón del canino posee más similitudes con el riñón del humano que con el del roedor (38). Por otro lado, la médula está compuesta por pirámides renales, que se fusionan para formar la papila renal, que se extiende desde la pelvis renal hasta el uréter (existen pseudopapilas), por lo anterior, se infiere que los riñones de los caninos son unipapilares (39).

En los caninos los riñones están cubiertos por peritoneo parietal, estos están localizados en la parte dorsal del abdomen, retroperitonealmente, el riñón derecho es más

craneal ubicado entre la vértebra T13 a L 2, próximo al lóbulo caudado del hígado y cerca de la vena cava caudal (39). El riñón del canino mide aproximadamente 6-9 cm de largo, 4 a 5 cm de ancho y 3-4 cm de grosor; pesa entre 25-35 g. El tejido adiposo blanco también conocido como cápsula adiposa (ya que hace parte de la cápsula fibrosa) reviste el área perineal y la pelvis renal. Por su parte, la producción de orina del canino varía entre 0.5-2ml/Kg/h (40)

Características Morfológicas del sistema urinario del canino

- En el riñón del canino existen aproximadamente 500.000 nefronas.
- El diámetro glomerular de un perro es de 170 μm .
- La longitud del uréter depende del tamaño del animal, varía entre 12-16 cm en un canino de 35 libras, el uréter derecho es un poco más largo que el izquierdo debido a la posición del riñón derecho; en el macho los uréteres se encuentran dorsales a los vasos testiculares y en las hembras se encuentran dorsales a la arteria y vena ovárica (40).
- La vejiga urinaria varía de forma, tamaño y posición, dependiendo el contenido de orina, por ejemplo, la vejiga de un perro de 25 libras es capaz de almacenar entre 100 a 120 lt de orina; cuando está relajada la vejiga mide 17.5 cm de diámetro y cuando se contrae mide 2cm de diámetro. En la cavidad abdominal la vejiga está en contacto con el intestino delgado y colon descendente craneal (40).

En los roedores, los vasos rectos se fusionan para formar haces vasculares gigantes que ayudan a incrementar su capacidad, con el fin de aumentar la concentración de orina. Las glándulas adrenales, al igual que en los caninos se encuentran ubicadas en los polos craneales y son unipilares. La producción de orina del murino varía entre 8.25-16.5ml (41).

Características morfológicas

- Los riñones se ubican retroperitonealmente, su tamaño varía dependiendo del sexo (de 125-170 g en machos vs 115-255 g en hembras)
- Los uréteres, son muy pequeños, retroperitoneales y entran a la vejiga por el

trígono

- La vejiga urinaria se encuentra ubicada en la cavidad abdominal inferior ventral al colon. Su orientación permite acumulación de proteínas y detritus en el ápice
- El asa de Henle de las nefronas es predominantemente larga, en comparación a los del canino y contienen bastantes mitocondrias (42).

Características	Murinos	Caninos
Riñones	Bilateral, unilobular, liso	Bilateral, unilobular, pero puede ser multilobular, liso
Localización	Retroperitoneal, el derecho más craneal y próximo al hígado	Retroperitoneal, el derecho más craneal y próximo al hígado
Papilas	Unipapilares	Unipapilares
tejido adiposo blanco	Perineal	En pelvis renal y perineal
tejido adiposo pardo	En pelvis renal y perineal	Usualmente no hay
Uréteres	Muy pequeños, retroperitoneales y entran a la vejiga en el trígono	Varían dependiendo el tamaño del animal, entran a la vejiga en el trígono
Vejiga	En cavidad abdominal inferior, ventral al colon	En cavidad abdominal, en contacto con el intestino delgado y colon descendente craneal
Nefrona	Predominan las asas largas, con numerosas mitocondrias en el asa de Henle	Predominante cortas, sus asas de Henle carecen de mitocondrias

Tabla 1. Anatomía Renal del murino y el canino. Tomada y modificada de (39,41)

En la figura 1 se ilustra las similitudes y diferencias previamente mencionadas de las nefronas en las ratas Wistar y de los caninos.

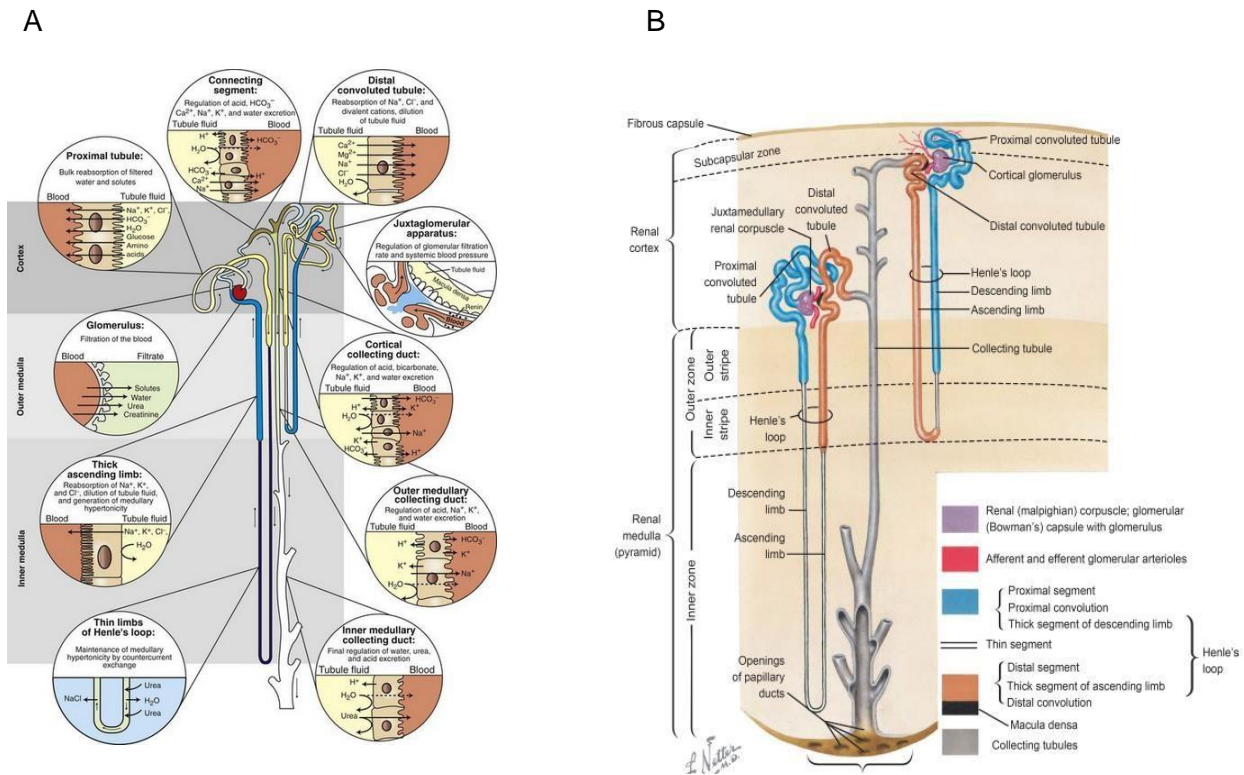


Ilustración 1. Comparación entre la nefrona del canino y el murino. Se evidencia las similitudes de la Unidad funcional renal (nefrona) del canino y el murino. **A** Nefrona del canino. **B** Nefrona del murino. Tomada y modificada de:(39,41,43).

1.2 Fisiología renal

Las nefronas están compuestas por glomérulos cuya función principal es el filtrado, un túbulo contorneado proximal donde se reabsorbe el 100% de la glucosa y se estima que el 60%-80% de las sustancias filtradas se reabsorben en este nivel. Así mismo, la reabsorción de solutos es consecuencia de diversos mecanismos de transporte, entre estos, el transporte activo primario, activo secundario mediado por transportadores y difusión pasiva.

La reabsorción de solutos en el túbulo proximal está mediada principalmente por el transporte activo, mediante la bomba sodio potasio ATPasa (Na^+/K^+ ATPasa), ésta permite la reabsorción de sodio (Na^+). Por su lado, la reabsorción de glucosa es facilitada por transporte pasivo secundario mediado por SGLT1 y SGLT2 (SODIUM Glucose Transporter). La reabsorción de bicarbonato en el túbulo proximal es posible por el cotransportador sodio/hidrogeno (Na^+/H^+) (32,33).

La mácula densa se localiza en la porción distal de la rama gruesa ascendente del asa de Henle, entre las arteriolas aferentes y eferentes y paralelo a la región mesangial extraglomerular: estas cuatro estructuras forman el aparato yuxtaglomerular (37,41). A diferencia del túbulo proximal cuyas células son ricas en mitocondrias, la rama delgada descendente del asa de Henle presenta un epitelio plano y está desprovisto de mitocondrias, por lo tanto, el transporte activo en este segmento es nulo. De igual manera, el transporte en este segmento es de tipo pasivo, característica que favorece el aumento de la concentración de la orina. En cambio, el epitelio de la rama ascendente gruesa del asa de Henle y el túbulo contorneado distal está compuesto de numerosas mitocondrias, pues se lleva a cabo el transporte activo, por medio de la bomba Na^+/K^+ ATPasa y el cotransportador que favorece el transporte de sustancias en contra del gradiente de concentración (37).

El túbulo colector está compuesto por diferentes tipos de células especializadas, que varían según la especie. Estas se clasifican en células intercaladas, que están compuestas de vesículas intracitoplasmáticas y mitocondrias, por su parte, las células principales, contienen menos vesículas intracitoplasmáticas y mitocondrias. Así mismo, las células principales de los animales en la microgravedad conforman el conducto colector inicial, conducto colector cortical,

y el conducto colector medular. En contraste, las células intercaladas se presentan en menor proporción a lo largo del túbulo colector en humanos y roedores. Por otro lado, en el túbulo distal y en el túbulo colector, la angiotensina II y la aldosterona son las encargadas de la reabsorción de electrolitos (37,41). En la figura 2 se ilustra una comparación del tejido histológico renal de la rata Wistar y el canino, se observan similitudes entre los glomérulos, las cortezas y las medulas renales.

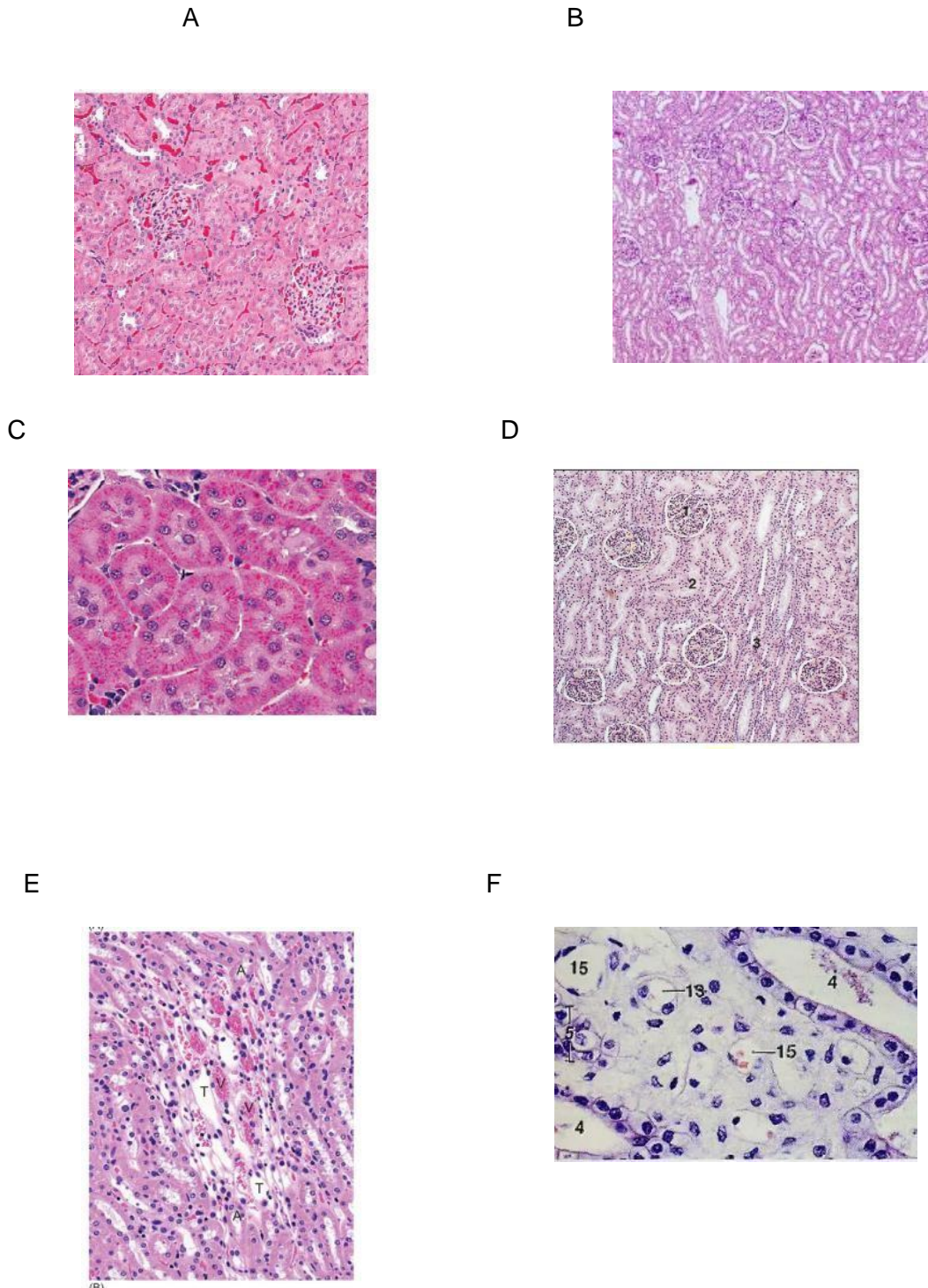


Ilustración 2. Comparación histológica del tejido renal entre la rata Wistar y el canino. Tomada y modificada de (41,44,45). **A** Glomérulo de la rata Wistar 10x. **B** Glomérulo del canino 10x. Se observan similitudes en las estructuras tubulares y glomerulares, se aprecia la capsula de Bowman y capilares glomerulares. En efecto, el glomérulo de los mamíferos es un lecho vascular bastante desarrollado, su principal función es permitir la

filtración de pequeñas moléculas como: agua, azúcar, electrolitos y proteínas de pequeño peso molecular. **C** Corteza renal de rata Wistar 36x. Se observan nefronas corticales, el túbulo contorneado distal, parte de la capsula de Bowman, túbulos y capilares renales. **D** Corteza renal del canino 6x. Se observa el laberinto cortical, túbulos contorneados dístales y proximales, capilares peritubulares y pociiones del Asa de Henle. Adicionalmente, en el túbulo contorneado distal se presenta el mayor porcentaje de reabsorción de Na^+ y otros solutos como glucosa, algunas proteínas de bajo peso molecular, por ello, su gasto energético es muy alto. **E** Medula renal de Rata Wistar 10x. Se visualizan nefronas yuxtamedulares, pirámides renales, conductos colectores de excreción de orina, papilas renales, y túbulos distales del asa de Henle. **F** Medula renal del canino 250x. se aprecian túbulos colectores, segmentos gruesos y delgados del ASA de Henle.

1.3. Bomba Na^+/K^+ ATPasa a nivel renal

La bomba Na^+/K^+ ATPasa es una proteína integral heterodímera, que utiliza la hidrólisis de ATP para movilizar tres moléculas de Na^+ al espacio extracelular y dos moléculas de K^+ al espacio intracelular (46). Esta bomba está conformada por tres subunidades, la subunidad alfa (α), la subunidad beta (β) y la subunidad gama (γ), cada una de estas subunidades posee una estructura diferente, vinculada a una función dentro de la bomba (33).

La subunidad α de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, presenta como función principal el cambio conformacional de la bomba, esta subunidad se compone de diez segmentos transmembrana, donde los amino carboxilos terminales están dirigidos hacia el citoplasma. Así mismo, el asa citoplasmática une los segmentos 4 y 5, cada uno de estos segmentos posee dos dominios, el dominio nucleótido (N) y el dominio de fosforilación (P). El dominio N liga el ATP en el lado citosólico, mientras que el dominio P cataliza la transferencia del grupo γ -fosforil de la membrana (24). De igual forma el asa citoplasmática une los segmentos 2-3 y contiene el tercer dominio, denominado actuador (A), este dominio es el responsable de generar cambios conformacionales en el segmento transmembrana, como resultado aparecen 2 sitios de unión para el K^+ en la cara extracelular de la bomba y tres sitios de unión para el sodio en la cara intracelular (46)

Por otro lado, la subunidad β posee un dominio transmembrana, su extremo carboxilo terminal es altamente glicosilado y está en contacto con la parte extracelular.

Igualmente, esta subunidad participa en la correcta inserción de la subunidad α en la membrana celular, regula la afinidad de los sitios de unión para los iones y el transporte de estos (46). En cambio, la subunidad γ es más pequeña que la subunidad β , su extremo carboxilo terminal está del lado citoplasmático; esta permite la afinidad óptima de los sitios de unión de la subunidad α a la membrana (46).

El funcionamiento de la bomba consta de 7 pasos tal como se ilustra en la figura 3:

1. Tres iones de Na^+ del interior de la célula se unen a la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ (37,46) .
2. Se genera una hidrólisis de ATP, esto resulta en ADP + fosfato (desfosforilación), con el fin de proveer energía que permite cambiar la conformación de la bomba (37).
3. Después del cambio conformacional de la bomba, los iones de Na^+ son bombeados al espacio extracelular (46) .
4. Posteriormente, los sitios de unión para el Na^+ se inactivan con el objetivo de evitar que este ion se vuelva a unir a la bomba (37,46).
5. Dos iones de K^+ se ensamblan en el espacio extracelular de la bomba (47).
6. Esta unión genera una desfosforilación de la bomba por parte del K^+ con la finalidad de regresar a la bomba a su forma original (46).
7. Por último, se liberan los dos iones de K^+ al citosol, produciendo la disminución de la afinidad de la bomba para este ion (46).

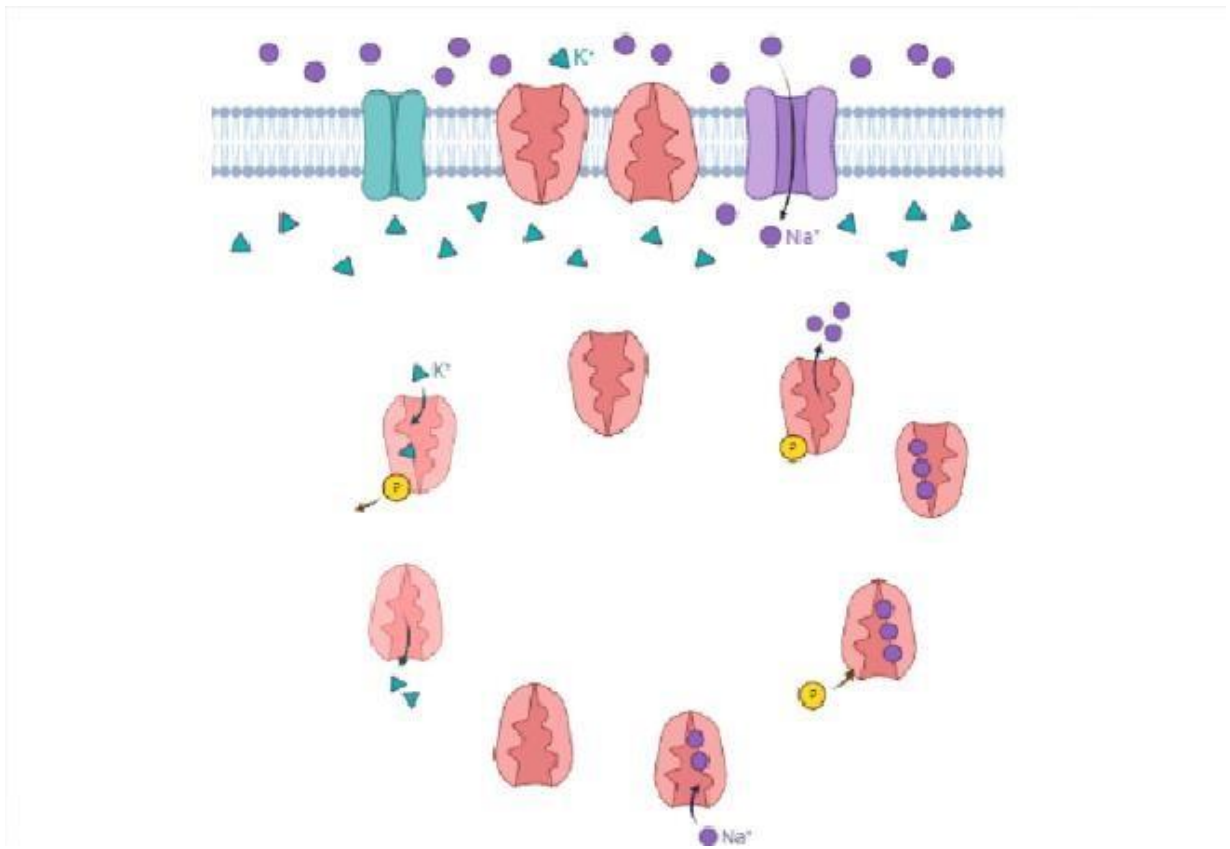


Ilustración 3. Ciclo de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa. Tomada y modificada de (37)

En el túbulo contorneado proximal, aproximadamente el 60-80% de las cargas filtradas son reabsorbidas principalmente por funcionamiento de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa (48). La activación de la bomba en este segmento depende de varios mecanismos, uno de ellos es la presencia de la norepinefrina, pues esta sustancia es sintetizada por los nervios renales con el objetivo de interactuar con los receptores adrenérgicos α del túbulo proximal, activando de forma aguda la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa, por lo tanto, aumenta rápidamente la reabsorción de la orina y disminuye la diuresis (47). De igual manera, otro mecanismo es la activación del Ca²⁺ intracelular, cuya función es desfosforilar la bomba a través de la proteína 2 β dependiente de Ca²⁺/calmodulina.

También, la activación de la bomba del túbulo proximal está mediada por la estimulación de los receptores CB1, mediante Fito cannabinoides y endocannabinoides (46,48)

Al igual que la activación de la bomba, la inactivación de esta también está mediada por diversos mecanismos. El primero, es el aumento de los niveles de dopamina que interactúa con los receptores DA1 del túbulo proximal, promoviendo la fosforilación e inactivación de la bomba como consecuencia de una endocitosis de la misma (48). Otro mecanismo involucrado, es el aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular en el túbulo, lo que produce una activación de la proteinquinasa C responsable de la fosforilación de la subunidad $\alpha 1$ de la bomba, como consecuencia se produce la endocitosis de esta.

Por último, el antagonismo de los receptores CB1 inducen una inactivación de la bomba Na^+/K^+ ATPasa en el túbulo proximal de la nefrona (48).

En los mamíferos existen 2 genes que regulan la bomba: el gen $atp1\alpha 1$ y el gen $atp1\beta 1$, responsables de codificar las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ en el retículo endoplasmático con la finalidad de formar heterodímeros α/β . La regulación de la activación e inactivación genética de la bomba está mediada por diversos mecanismos:

1. Proteína de unión a los reguladores del elemento respuesta del AMPc (CBP).

El aumento de AMPc fosforila los reguladores del elemento respuesta de unión al AMPc (CREB: cAMP response element binding), a través de la proteinquinasa A (PKA) dentro del dominio inducible por quinasa (KID), permitiendo la unión de CBP a CREB, produciendo el aumento de la actividad de la bomba (48).

2. Interacción entre CBP y CREB.

Provoca acetilación de histonas debido a la activación de la Histona acetiltransferasa (HAT) de CBP, esto permite que se abra la estructura de la cromatina y se active la transcripción (46,48).

3. Coactivadores transcripcionales reguladores (CRTC).

Los CRTC, se unen a los CREB en el dominio bZP generando la unión al ADN y la dimerización de CREBP, sin embargo, no existe una activación constante de CREB por parte de CRTC, por esta razón CRTC es fosforilado por la quinasa 1 inducible por sal (SK1) y trasladado al citoplasma (37,46,48).

4. CRTC fosforilado en el citoplasma.

Se produce un aumento de Ca^{2+} en el citoplasma activando la proteína fosfatasa 2B dependiente de Ca^{2+} (PP2B[calmodulina]), también se produce un aumento de AMPc citoplasmático. Así mismo, PP2B [calmodulina] fosforilan CRTC en el citoplasma, con el fin de trasladarlo a núcleo donde interactúa con CREB y activa la subunidad de $\beta 1$ a través del gen $\text{atp1}\beta 1$ y la subunidad $\alpha 1$ a través del gen $\text{atp1}\alpha 1$. De igual manera, CBP, CRTC y CREB estimulan las subunidades α y β activando la bomba Na^+/K^+ ATPasa (37).

5. Ca^{2+} /proteína quinasa dependiente de calmodulina 1 (CaMK1).

Su principal función es disociar la proteína fosfatasa metiltransferasa 1 (PME1) del complejo de la bomba. Posteriormente, activa la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y desfosforila la bomba, generando su activación (47,48).

6. Proteína fosfatasa metiltransferasa 1 (PME1).

Inactiva PP2A, bloqueando la desfosforilación de la subunidad $\alpha 1$ de la bomba, como consecuencia se produce endocitosis de esta (48).

7. Proteína fosfatasa 2A (PP2A).

Desfosforila la subunidad α de la bomba, y en consecuencia se produce un cambio conformacional de la bomba activándola para continuar con el ciclo (48).

1.4. Sistema endocannabinoide

La historia del uso medicinal del cannabis se remonta hace aproximadamente 12000 años cerca de las montañas de Asia Central (49). Así mismo, los registros del uso del cannabis medicinal aparecen antes de la Era común en China, Egipto y Grecia (8).

Algunos usos medicinales de la planta registrados en la época se enfocaban en reducir el dolor, las náuseas, la ansiedad, inducir la relajación muscular, mejorar el apetito, el sueño y como sedante (50). Sin embargo, a pesar de que a mediados del siglo XIX y principios del siglo XX el Médico J. Russel Reynolds en 1890 resumió más de 30 años de experiencia con el cannabis (51), éste fue desplazado por el descubrimiento de otros fármacos sedantes como los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y las restricciones de ley en Estados Unidos. Esta ley de la Marihuana se estableció en 1973, eliminando el cannabis de la farmacopea y declarándola droga ilegal en la década de los 70 (50).

No fue hasta 1964, que el Doctor Raphael Mechoulam caracterizó la planta mediante el trabajo con humanos voluntarios, que fueron su objeto de estudio, impulsando la exploración de un nuevo sistema receptor denominado el sistema endocannabinoide (50). Este sistema, está conformado por varios endocannabinoides, los más conocidos son la anandamida (AEA) y 2-araquidonil glicerol (2-AG). Igualmente, los dos receptores principales de cannabinoides como el receptor para cannabinoide CB1 presente principalmente en el sistema nervioso central y el sistema digestivo, y el receptor CB2 presente en sistema nervioso periférico y responsable de la inmunomodulación.

Además, otros receptores como el receptor de potencial transitorio vaniloide de tipo 1 (TRPV1) el GPR55 y GPR 18, estos últimos denominados de esta manera, ya que al igual que los receptores CB1 y CB2 se encuentran ligados a proteínas G (52). También, el sistema endocannabinoide lo conforman enzimas que degradan y sintetizan los endocannabinoides como FAAH (Fat Amino Acid Hidrolase). Así mismo, la señalización de este sistema es retrograda, es decir, la señalización inicia en las neuronas postsinápticas expulsando los endocannabinoides, que se liberan en el espacio sináptico y viajan a las terminales presinápticas, actuando sobre los receptores CB1 y CB2 con el propósito de disminuir la liberación de neurotransmisores por parte de la neurona presináptica (53).

Posteriormente, Devante y colaboradores caracterizaron el receptor CB1 en cerebros de ratas y humanos (53).

1.4.1. Endocannabinoidoma

Se denomina endocannabinoidoma, a la complejidad de la interacción de los compuestos bioquímicos de la planta con el sistema endocannabinoide, dicho de otra manera, comprende los procesos moleculares y bioquímicos desencadenados por la interacción de fitocannabinoides con la variedad de receptores para cannabis (CB1, CB2, TRPV1, GPR55 y GPR18) y la interacción de estos receptores con las enzimas que sintetizan y degradan los endocannabinoides 2-AG y AEA. (54). También, abarca la síntesis a demanda de los cannabinoides endógenos dependientes del calcio, y la expresión de los receptores dependientes de los diferentes estímulos, en diferentes partes del organismo vivo. En la figura 3, se ilustra la interacción de los fitocannabinoides con los receptores del sistema endocannabinoide y las señalizacionesenzimáticas, con la liberación de segundos mensajeros.

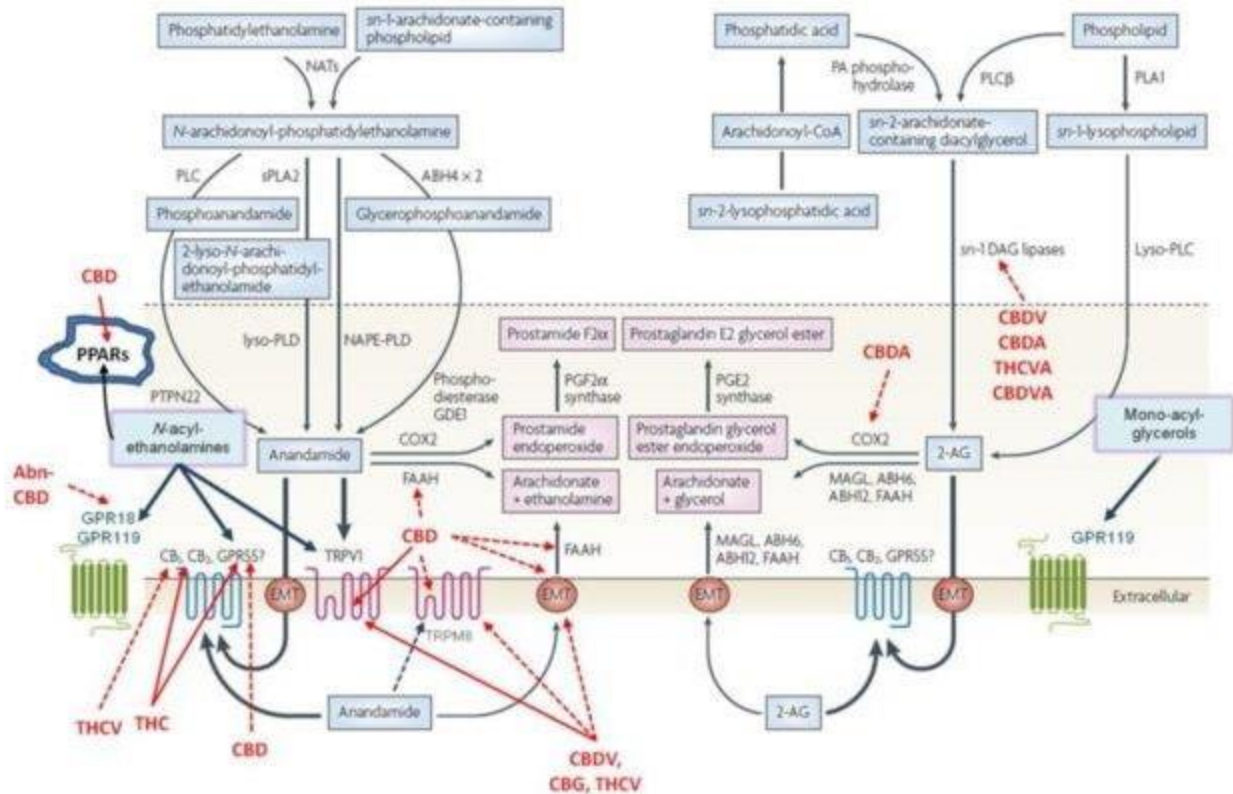


Ilustración 4. Endocannabinoide. Tomada de: (54).

En la figura 4, se ilustra las diferentes rutas biosintéticas activadas por los fitocannabinoides para la síntesis y degradación de endocannabinoides. De igual manera, se ilustra la activación de receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas α y γ , y también se observan la inhibición de los canales de calcio tipo T (Cav3). Adicionalmente, se ilustra los precursores biosintéticos del 2-AG que interactúan con sus Dianas por ejemplo la proteína quinasa C (PKC), el receptor GPR55, receptores de ácido lisofosfatídico. De la misma manera, los productos metabólicos de las reacciones enzimáticas para la síntesis y degradación de los endocannabinoides interactúan con diferentes receptores. En el caso de las etanolaminas de prostaglandinas y los ésteres de glicerol de prostaglandina tienen sus propios receptores. Por el contrario, las lipoxigenasas y el citocromo p450 oxigenasa aún activan receptores CB1 y CB2.

El sistema endocannabinoide, se descubrió después de hallar la estructura del fitocannabinoide psicoactivo Δ -9-tetrahidrocannabinol (THC). Además, el receptor

cannabinoide 1 (CB1) se encontró durante el rastreo de los receptores de las células dianas para el THC (22,54).

La planta de cannabis sativa produce naturalmente tetrahidropiranos, ciclohexanos y terpenos (3). Estos compuestos forman estructuras carboxílicas que están conformadas por hidrocarburos aromáticos, formadas por 3 anillos y un ciclo (12).

El sistema endocannabinoide está conformado por enzimas, ligandos y receptores. Las enzimas más estudiadas son la hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MAGL). Por otro lado, los ligandos endocannabinoides que se describen con frecuencia son la anandamida (AEA) y el 2-araquidonil glicerol (2-AG). Por último, los receptores endocannabinoides más estudiados son el receptor cannabinoide 1 (CB1), el receptor cannabinoide 2 (CB2) y el receptor de potencial transitorio v1 TRPV1, los dos primeros son receptores metabotrópicos ligados a proteínas G y el último el inotrópico (55–57).

La estructura y funcionalidad de los receptores CB y TRPV1 son similares en todos los mamíferos, sin embargo, la afinidad del receptor CB2 al ligando es 30 veces menor que la afinidad de los receptores CB2 del humano y la rata. Por lo tanto, esto depende principalmente de la expresión en la membrana celular y el tipo de señalización implicada (22).

La localización anatómica de los receptores CB1 en el canino se ha determinado mediante inmunohistoquímica, descubriéndose ampliamente en tejido cerebral (58). Por su lado, las partes anatómicas macroscópicas y microscópicas del tejido cerebral en el que se expresan los receptores CB1, son el hipocampo, mesencéfalo, cerebelo, bulbo raquídeo, médula espinal, globo pálido, astrocitos, y en el sistema nervioso periférico se localiza en células de Schwann y ganglios de la raíz dorsal (58).

Al comparar el tejido nervioso de los caninos jóvenes con el de los caninos gerontes, se demostró que, en los caninos mayores de 10 años la expresión del receptor CB1 es menor comparado con los perros jóvenes, similar a los que pasa en las ratas gerontes (58).

1.4.2. Caracterización de los receptores CB1 y CB2 acoplados a proteínas G

Los receptores cannabinoides CB1 y CB2 son clasificados como receptores acoplados a proteínas G. El receptor CB1, se expresa ampliamente en el tejido cerebral, sin embargo, también se ha visto la expresión de este receptor en otros tejidos como la piel, el intestino y los riñones de diferentes mamíferos (10,59). Por otra parte, el receptor CB2 se encuentra en menor proporción en el tejido cerebral, pero si está presente de manera significativa en el sistema inmunológico, piel y tejido renal (9,60).

El receptor CB1 se acopla a la proteína G tanto en el tejido cerebral, como en el tejido renal (12,61–63). La señalización que desencadenan los receptores cannabinoides depende del acoplamiento a la subunidad de la proteína G y los diferentes fármacos que estimulan esta cascada de señalización (60); por ejemplo, la unión a la subunidad $G\alpha$ inhibe a la producción de Adenil ciclasa, por ende, produce la disminución en la producción de AMPc.

El receptor CB1, experimenta cambios conformacionales drásticos a nivel extracelular e intracelular al ser activado. Por el contrario, el receptor CB2 experimenta cambios conformacionales en la parte intracelular, al ser activado por agonistas (52).

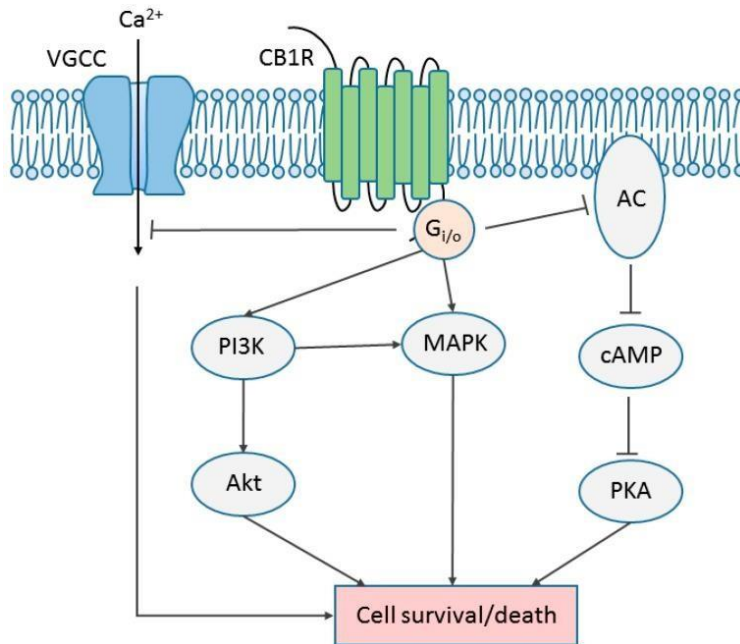


Ilustración 5. Estructura del receptor CB1 ligado a proteínas G. Tomada y Modificada de: (52).

En la figura 5, se ilustra tanto la estructura del receptor cannabinoide 1 ligado a proteínas G en forma de serpentina con los 7 dominios transmembrana.

1.4.3. Caracterización del receptor TRPV1 (Receptor de potencial transitorio V1)

El receptor TRPV1, se encuentra localizado en la pared pélvica renal, hace parte de las fibras nerviosas, que forman esta red transversal que inervan la pelvis renal (28,62,64).

Por su lado, este receptor ionotrópico se activa por estimulación química, como cambios de pH, variaciones de temperatura (calor) y metabolitos lipídicos. Su principal función es modular la excreción renal, la diuresis y la nutrición bilateral por el aumento de la tasa de filtración y la liberación de sodio en los túbulos proximales y distales. Por lo tanto, el receptor TRPV1 cumple un papel fundamental en la regulación y homeostasis del sodio a nivel renal (21).

1.4.4. Producción de ligandos endocannabinoides a partir de ácidos grasos

La AEA y el 2-AG, se consideran los principales ligandos y mediadores del sistema endocannabinoide, derivados del ácido araquidónico. Además, debido a la similitud que existe entre la AEA y los compuestos lipídicos, es probable que algunos complejos enzimáticos del citocromo P450 estén implicados en el metabolismo de la AEA (62).

Tanto la AEA como el 2 AG, se generan en respuesta de una elevación de calcio intracelular o debido a la expresión de los receptores CB (65), de igual manera, su síntesis depende de las enzimas (fosfolipasa C, fosfolipasa A y diacilglicerol). En 1992 se identificó por primera vez la anandamida en el cerebro como ligando endógeno del receptor CB1 (66)). A diferencia de los neurotransmisores, los cannabinoides endógenos no son almacenados en vesículas y su mecanismo de liberación aún no está claro; sin embargo, se sabe que las enzimas FAAH y MAGL son las responsables de su degradación (57,58,66).

La AEA y el 2AG, se consideran ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga derivados de los fosfolípidos de membrana (62). Como se mencionó anteriormente, estos endocannabinoides son liberados a demanda por aumento en los niveles de calcio (Ca^{2+}). En concreto, en el tejido nervioso los endocannabinoides anteriormente mencionados se sintetiza a demanda en la membrana celular de la neurona posináptica, luego son liberados al espacio intersináptico, donde interactúan con los receptores CB1 y CB2 ubicados en la membrana presináptica, con el fin de disminuir el almacenamiento y liberación de neurotransmisores (57,58,67).

Las enzimas responsables de la biosíntesis de la AEA son N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipasa D (NAPE-PLD) y la fosfatidiletanolamina. Por otro lado, las enzimas que tienen como función la biosíntesis del 2 AG, son la fosfolipasa C (PLC), la fosfolipasa A (LPA) la fosfolipasa A1 (LPA 1), el diacilglicerol (DAG), y el diacilglicerol lipasa tanto α como β (DAG α y DAG β). Las enzimas responsables de degradar AEA son la enzima hidrolítica de ácidos grasos (FAAH), diferentes lipoxigenasas (LOX) y las cicloxigenasas-2 (cox-2). Por el contrario, las enzimas que participan en la degradación de 2 AG son monoacilglicerol lipasa (MAGL), la FAAH y la monoacilglicerol quinasa (MAGLK) (62).

1.4.5. Sistema endocannabinoide a nivel renal

La distribución del sistema endocannabinoide a nivel renal ha sido ampliamente estudiada en el riñón del humano, cerdo y rata (9,28,61,67,68). Sin embargo, no se han reportado estudios de la distribución de este sistema en el riñón del canino. Por otra parte, la localización de los receptores CB1 en el riñón del humano difiere con respecto al riñón de la rata (13). Por ejemplo, en el humano los receptores CB1 se encuentran distribuidos en el túbulo contorneado proximal, túbulo contorneado distal y células intercaladas del conducto colector (65,68,69), en cambio, en los roedores los receptores CB1 se hallan en las arteriolas aferentes, arteriolas eferentes, podocitos glomerulares, extremidades ascendentes gruesas del Asa de Henle, glomérulos, células epiteliales tubulares y células mesangiales cultivadas (29,45).

La distribución de los ligandos endocannabinoides, a nivel renal es la misma en

roedores y en humanos (13). Así mismo, en la corteza renal se encuentran niveles similares de AEA y 2 AG, mientras que en la médula renal los niveles de AEA duplican los niveles de 2 AG (62). Aunque, no existen controversias de la distribución de los receptores CB2 (65), existen evidencias de que la distribución de los receptores CB2 en el riñón de la rata y el humano no presentan diferencias significativas (29,69). Los receptores CB2 se localizan en la corteza renal, podocitos, células del túbulo proximal y células mesangiales (27).

Receptor	Localización general	Localización específica	Especie
CB1	Tejido	Renal	Humanos, ratas, ratones
	Región	Arteriolas	Ratas
		Glomérulos	Ratas, ratones
		Túbulos	Humanos, ratas, ratones
		Asa de Henle	Ratas
		Conductos colectores	Humanos
		Intersticio	Humanos, ratas
	Células	Podocitos	Ratas, ratones
		Células mesangiales	Ratas
		Células epiteliales del túbulo proximal	Humanos, ratones, porcinos
		Células epiteliales del túbulo proximal	Humanos y ratones
		Células intercaladas	Humanos
	CB2	Tejido	Renal
Región		Corteza	Ratas
Tipo celular		Podocitos	Ratas
		Células del túbulo proximal	Ratas, humanos
		Células mesangiales	Ratas

Tabla 2. Distribución de los receptores cannabinoides en el tejido renal de rata, ratón, humano y porcino. Tomada y modificada de (65).

La anandamida, es producida y metabolizada por las células mesangiales y endoteliales (28), se une al receptor CB1 (receptor metabotrópico ligado a proteína G_i) bloqueando la producción de óxido nítrico sintasa y estimulando la producción de óxido nítrico en el Asa gruesa de Henle (17). En cambio, el óxido nítrico inhibe los canales sodio/hidrogeno (Na^+/H^+), sodio/potasio (Na^+/K^+), y 2 de cloro (Cl^-). De esta manera, estos mecanismos regulan el flujo sanguíneo renal, ya que permiten la vasodilatación de las arteriolas aferentes yuxtglomerular y la reabsorción de solutos, alterando la tasa de filtración glomerular (30,31,67,70).

1.4.6. Interacción del sistema endocannabinoide con la bomba

Na⁺/K⁺ATPasa y la hemodinámica renal

Los riñones, son el segundo órgano con más consumo de oxígeno (O_2) (48). Por su lado, el túbulo contorneado proximal constituye aproximadamente la mitad de la masa renal y utiliza la mayor parte de O_2 ; su principal función es reabsorber entre el 60-80% de solutos que pasan a través de la nefrona, mediante transportadores de membrana especializados dependientes de ATP. De manera que, en la obtención del ATP se requiere una fosforilación oxidativa mitocondrial, por ello, una alteración de la mitocondria puede producir daños a nivel renal (26,37,48).

La regulación de la fosforilación de la proteína 1 (DRP1) relacionada con la dinamina, esta mediada directamente por receptores CB1 a nivel renal; esta proteína es la encargada de producir fisión mitocondrial, este mecanismo esta mediado por la fosforilación de DRP1 en el dominio S616 y la desfosforilación de esta en el dominio S637 (71). Esto quiere decir, que los mecanismos que inhiben la fisión mitocondrial dependiente de DRP1 están relacionado con el aumento de la proteína quinasa A (PKA), cuya función es promover la fosforilación en el dominio S637 de DRP1, inhibiendo la fisión mitocondrial. Igualmente, cuando se estimula el

receptor CB1 en lamembrana, disminuyen los niveles de PKA, por lo tanto, se produce fragmentación mitocondrial descontrolada, produciendo lesiones a nivel renal (71).

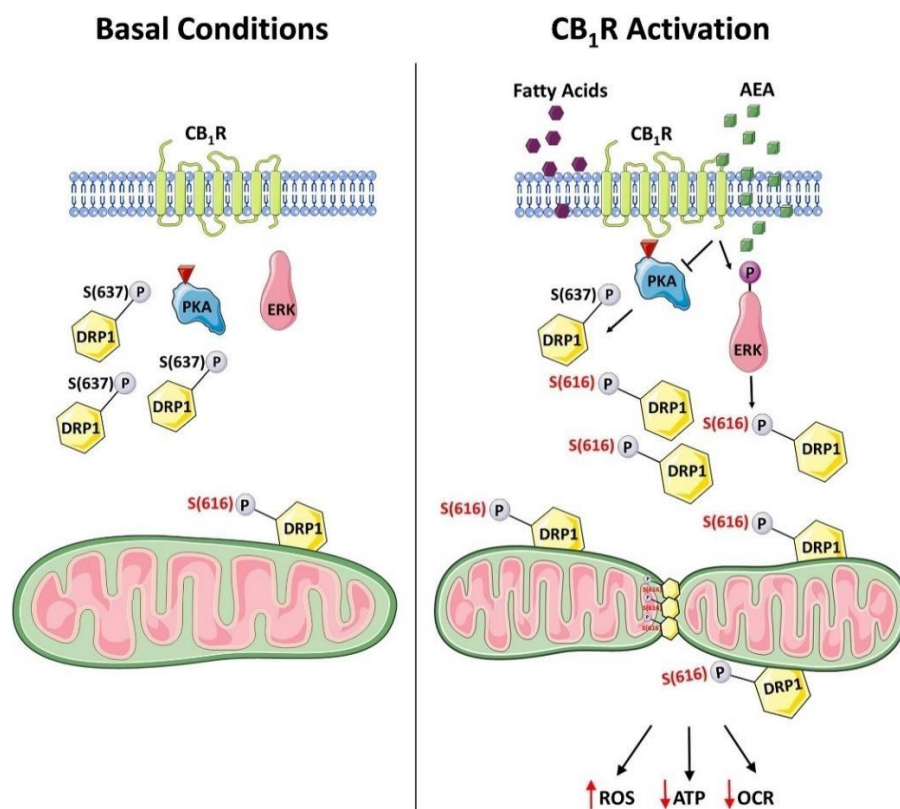


Ilustración 6. Fisión mitocondrial. Tomada de (73).

El receptor CB1, al ser estimulado por endocannabinoides como la AEA, fitocannabinoides como el THC y cannabinoides sintéticos como el WIN, modula en el túbulo proximal los niveles de AMPc y los niveles de PKA, favoreciendo la activación de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa mediante la activación de PP2A, (puede también disminuir la activación de la misma dependiendo del ligando) además promueve la fisión mitocondrial como se mencionó anteriormente (72,73). Por lo tanto, al bloquear el receptor CB1 en el túbulo contorneado proximal, se disminuye significativamente la actividad de la bomba y se detiene la fisión mitocondrial, recuperando la estructura de la mitocondria, ocasionando la disminución de las especies reactivas de oxígeno en este tejido (71,72,74).

1.4.7. Fitocannabinoide cannabidiol (CBD)

El ácido cannabidiólico (CBDA), es el segundo componente presente de manera natural más abundante de la planta de cannabis, después del ácido tetrahidrocannabinólico (THCA) (50). Cuando se descarboxila el CBDA se convierte en cannabidiol, también conocido como el componente farmacológicamente activo de la planta de cannabis sativa (24). Por lo tanto, este CBD interactúa con los receptores del sistema endocannabinoide y con otros receptores, como el receptor de 5-hidroxitriptamina 1 A (5-HT_{1A}), receptores de serotonina, receptores de dopamina D₂, receptores de adenosina A₁, receptores opioides, canales de sodio y canales de calcio (25).

La interacción del CBD con los receptores endocannabinoides se comporta de la siguiente manera:

- Actúa como antagonista del receptor CB₁, reduciendo las potencias del TCH y 2AG, expuesto en un ensayo de unión Guanosina trifosfato gamma S (GPT γ S) en membranas de cerebro de ratón (79). Así mismo, como modulador alostérico negativo, reduce alostéricamente la señalización del receptor CB₁ en las células HEK 293^a (25).
- Se comporta como antagonista del receptor CB₂, disminuyendo la potencia del agonista WIN55212, analizado en un ensayo de membranas celulares, donde se sobre expresaban los receptores CB₂ (75).
- Procede como antagonista del receptor GPR55, disminuyendo la potencia del agonista CP55940 en membranas celulares donde se sobre expresan los receptores GPR55 (76).
- Se comporta como agonista de los canales TRPV₁, aumentando los niveles de calcio citosólico, del mismo modo que lo hace el agonista completo de capsaicina en las células derivadas de riñón humano HEX293 (77)
- Actúa como agonista de los receptores nucleares activados por peroxisoma; el bloqueo del receptor del peroxisoma con el antagonista selectivo W9662, redujo significativamente los efectos del CBD sobre la gliosis reactiva en cultivos astro gliales de rata (78). También, es importante destacar que el receptor nuclear activado por peroxisomas está

estrechamente relacionado con el metabolismo de la glucosa y la señalización de la insulina en el músculo esquelético y el hígado (25).

La interacción del CBD con diferentes receptores que no hacen parte del sistema endocannabinoide, se comportan de la siguiente manera:

- Como agonista del receptor 5-HT_{1A}, desplazando la unión de [³H]8-OH-DPAT aumentando la actividad de la proteína G en la línea celular de ovario de hámsteres chinos, que sobre expresan el receptor (5).
- En el receptor de dopamina (D₂), se desenvuelve como agonista parcial, inhibiendo la unión de la domperidona radiomarcada a los receptores D₂, con constante de disociación de 11mmol/L en membranas estriales de rata (79).
- Actúa como agonista del receptor de adenosina A₁, generando efectos antiarrítmicos inducidos por isquemia debido a reperfusión en ratas(80).
- Procede como modulador alostérico de los receptores opioides, acelerando la disociación de [³H]DAMGO en los receptores tipo Mu y acelerando la disociación de [³H]-NTI en los receptores tipo delta (81).
- Se comporta como inhibidor de los canales de sodio dependientes de voltaje e inhibidor de los canales de calcio tipo I dependientes de voltaje (82,83).

Aunque no existen estudios específicos de la función del CBD en el transporte de Na⁺ a nivel renal, estaría contemplada la posibilidad que al interactuar directamente en el túbulo contorneado proximal (estructura responsable en mayor medida de la reabsorción de Na⁺ mediante la bomba Na⁺/K⁺ATPasa) aumente la excreción de sodio a nivel renal. Por lo tanto, esto se debe probablemente a que CBD bloquea el receptor CB₁, que es responsable de activar la bomba Na⁺/K⁺ATPasa en el túbulo proximal.

1.5. Métodos para determinar la tasa de filtración glomerular

La tasa de filtración de glomerular es un parámetro importante, que permite medir la función renal y estadificación de la enfermedad renal crónica (84), aunque existen varios métodos para medirla, las ayudas diagnosticas más utilizadas son: cuantificación de creatinina y urea, aclaramiento de creatinina en 24 horas, proteína beta trace (PBT o BPT), cisteína y medición de sodio en orina.

El aumento de la creatinina nivel sanguíneo se empieza a evidenciarse cuando el 75% del tejido renal se encuentra perdido, a causa de la enfermedad renal crónica (84). Por lo tanto, se concluye que los parámetros anteriores se consideran como diagnóstico tardío de la injuria renal crónica (35,84,85).

El aclaramiento de creatinina en 24 horas, se determinan por la siguiente ecuación:

$$\text{Clearance de Creatinina} = \frac{\text{Cr orina} * \text{Vol. urinario}}{\text{Cr sangre}}$$

Donde clearance de creatinina se mide por mililitro/minuto (ml/min), creatinina en orina se determina en miligramos/decilitro (mg/dl), volumen de orina se cuantifica en mililitros (ml) y creatinina en sangre determinada en mg/dl.

A pesar de que la creatinina se toma en orina durante 24 horas, no sería el parámetro ideal para evaluar la TFG (36) , debido que los niveles de dicho metabolito se pueden modificar por diversos factores, como la masa muscular, la dieta, el porcentaje de deshidratación, diversos fármacos metabolizados a nivel renal, entre otros (34).

Se puede evaluar la TFG, mediante las proteínas de bajo peso molecular como la beta trace proteína (BPT) y la cistina C. Por su lado, la BPT se produce de manera constante en las

células gliales del sistema nervioso, esta proteína se reabsorbe y cataboliza en el glomérulo luego de ser filtrada, pero no se excreta por el túbulo renal (36). Así mismo, cuando se presenta una alteración en la TFG, la BPT se acumula, incrementando su concentración plasmática (36,86). Por otro lado, la cisteína es secretada por la mayoría de las células a nivel sistémico; esta proteína se filtra libremente en el glomérulo y es reabsorbida y catabolizada por las células epiteliales tubulares, sin embargo, no es excretada (85).

La función principal del túbulo contorneado proximal es la reabsorción de sodio, aproximadamente el 90% de oxígeno es usado en esta porción de la nefrona para esta función (87). Igualmente, a pesar de que la excreción de sodio mide parcialmente la TFG, la fracción excretada de sodio es más específica para medir la función tubular y se debe tener precaución con el balance total de sodio, en el momento de interpretar los resultados (88).

En el cuadro 2, se ilustra las ventajas y desventajas de cada una de estas ayudas diagnósticas.

Método Diagnóstico	Ventajas	Desventajas
Creatinina y urea	Fácil acceso, prueba económica, técnica fácil y levemente invasiva para obtener los parámetros	Diagnóstico tardío de enfermedad renal crónica
Aclaramiento de creatinina en 24 horas	Indicador más temprano de enfermedad renal crónica, en comparación a la medición de urea y creatinina en sangre	Los niveles se modifican por metabolismo muscular, dieta, y porcentaje de deshidratación, además para su cuantificación en Ratas senecesitan de jaulas Metabólicas
BPT y cisteína	Método no invasivo, fácil acceso y diagnóstico	Secreción y reabsorción en túbulos, costo elevado por la jaula metabólica
FICT-sinistrina	Indicador de precisión de la TFG, no se reabsorbe, ni metaboliza o excreta en los túbulos renales, sus niveles no se alteran por metabolismo muscular, por enfermedades o uso de fármacos, detector temprano de enfermedades renales, no es invasivo	Elevado costo de parche transdérmico y software
Niveles de Sodio (Na ⁺) en orina	Prueba económica, tiempo de procesamiento corto, parcialmente invasivo para obtener el parámetro	Indicativo específico de función tubular, se debe conocer el balance total de Na ⁺

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los métodos para medir la filtración glomerular. Tomada y modificada de (85,88).

Como se ilustra en la figura 4, el sodio además de medir la tasa de filtración glomerular también sirve como parámetro para determinar la estructura tubular.

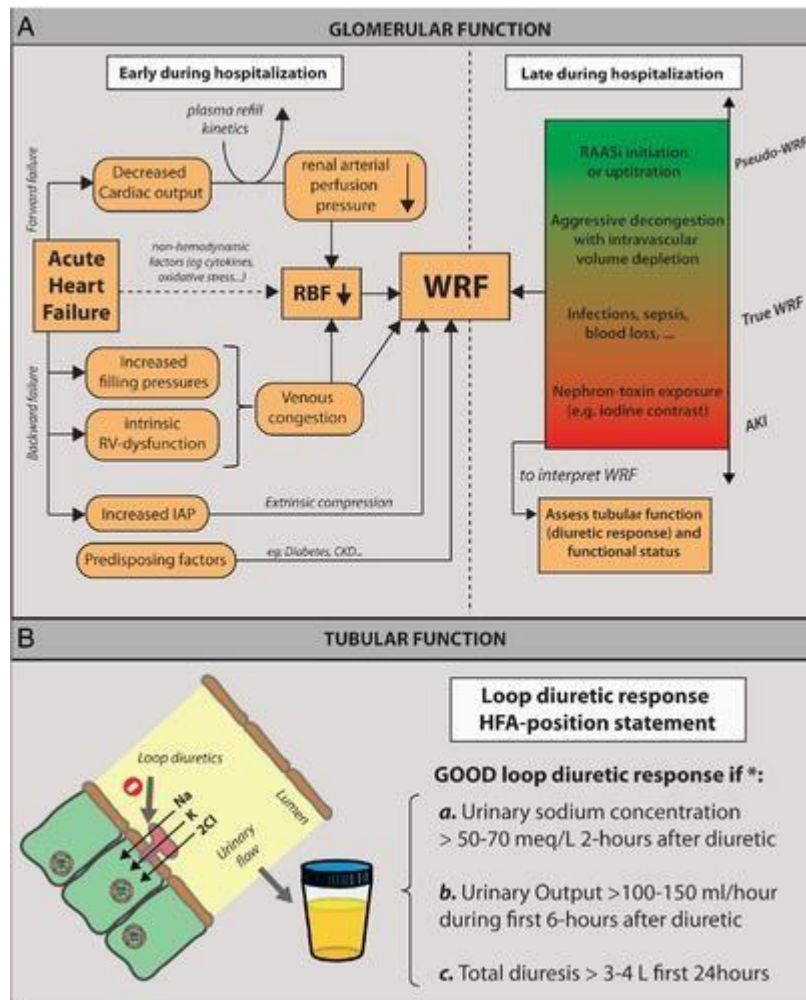


Ilustración 7. Evaluación de la tasa de filtrado glomerular mediante el sodio. Tomada y modificada de (89).

1.5.1. Método de espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica de análisis cuantitativo (masa molecular o concentración), y cualitativo (estructura) de las moléculas ionizadas previamente convertidas en iones, su principal ventaja es el bajo costo y alta productibilidad, elevada sensibilidad y precisión de los resultados analíticos. De igual manera, las moléculas de interés, en este caso el Na^+ en orina, no requiere separación previa, la solución problema se somete a una fuente de ionización adquiriendo carga positiva y negativa. Luego, los iones atraviesan el analizador de masas hasta alcanzar diferentes partes del lector, cuando los iones entran en contacto con el lector, se generan señales que son registradas y representan un espectro de masas, que muestra la cantidad relativa de señales en función de la relación masa/carga (49,90).

Las cuatro etapas para analizar sodio en orina mediante esta muestra comprenden: ionización de la muestra, aceleración de los iones por campo eléctrico, dispersión de los iones según masa/carga, detección de sodio y producción de la señal eléctrica correspondiente (49).

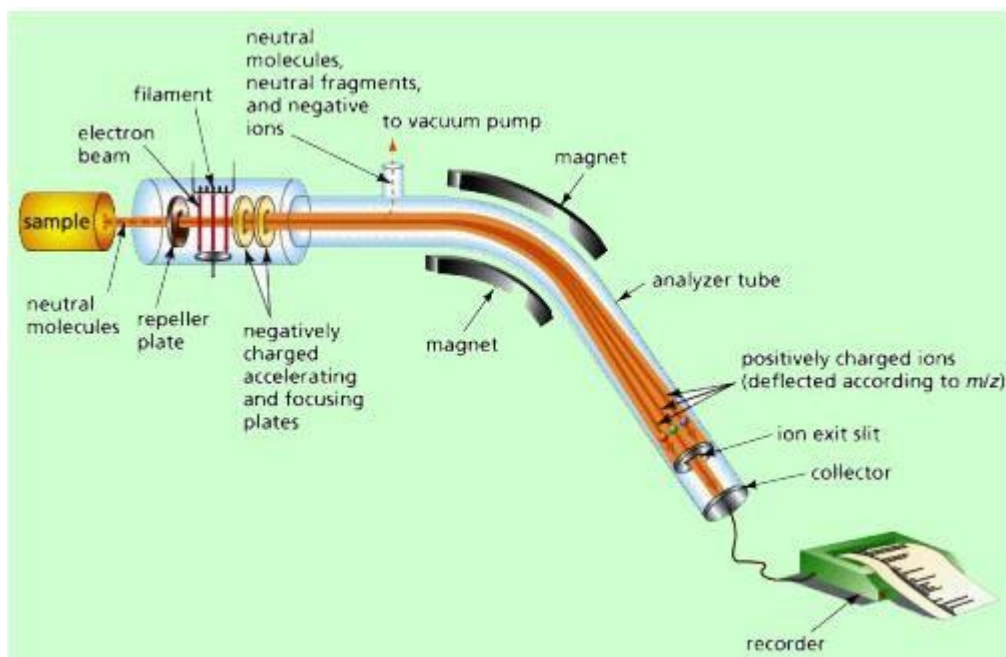


Ilustración 8. Técnica de espectrometría de masas. Tomada de (90).

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en el área de la neurología veterinaria se está implementando medicina cannábica como un coadyuvante para el manejo de epilepsias y enfermedades neurodegenerativas, principalmente en caninos (3,61,91,92). El sistema endocannabinoide en el sistema nervioso de los pacientes caninos y felinos se ha estudiado ampliamente en los últimos años, realizando la caracterización de endocannabinoides y de los receptores CB1 y CB2 (93). Teniendo en cuenta que cada vez se emplea con mayor frecuencia las terapias con cannabis (94), se considera relevante, pertinente y necesario identificar si el cannabidiol tiene algún efecto sobre la fisiología renal, como principal sistema de eliminación. Debido a que es difícil encontrar una población homogénea de animales (caninos) que estén medicados con cannabidiol y que no cursen con ninguna patología renal, es necesario utilizar un modelo murino, cuyo sistema renal es similar al del canino, donde es posible evaluar con precisión los efectos de los fitocannabinoides a nivel de la tasa filtración glomerular, a través de la reabsorción de sodio (39,41).

Existen pocos reportes bibliográficos en roedores (26–28,55,68,95–97), que evidencian el rol del sistema endocannabinoide sobre la homeostasis y el funcionamiento renal, no existen estudios específicos que muestren las interacciones fisiológicas del Fitocannabinoide cannabidiol con el sistema endocannabinoide renal y las alteraciones sobre la reabsorción de sodio a nivel renal en caninos, murinos y humanos.

En el territorio colombiano según la ley 1787 del 2016 en su artículo primero (1), título 11 se crea un marco regulatorio que permite el acceso seguro e informativo al uso médico y científico del cannabis y sus derivados; dentro de esta misma ley, en el artículo 2.8.11.1.3. Se adoptan definiciones en sus numerales 5, 6, 7, 10 y 11 para el cannabis, el cannabis psicoactivo, el cannabis no psicoactivo, los derivados del cannabis psicoactivo y los derivados de cannabis no psicoactivo. Así mismo, en el artículo 6 de la presente ley en su párrafo primero (1), el Invima (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos) regula la licencia y fabricación de los derivados de cannabis con fines medicinales y científicos basándose en el decreto 780

de 2016 del ministerio de salud y protección social, haciendo énfasis en el título 11 capítulo 1 ARTÍCULO De igual manera, el decreto 811 del 2021 amplía el uso medicinal de cannabis y derivados.

Esta regulación legal y los beneficios terapéuticos del cannabis en Latinoamérica, especialmente en Colombia, ha motivado a los médicos veterinarios por implementar el uso del cannabis y sus derivados para el manejo terapéutico de diversas enfermedades neurológicas en pequeñas especies, principalmente en caninos, como enfermedad discal degenerativa, Meningoencefalitis de origen desconocido, epilepsia idiopática, distemper canino, entre otras (1,2,10,98).

Estudiar el sistema endocannabinoide a nivel renal, no solo contribuirá a la comprensión de la importancia fisiológica del endocannabinoidoma en nefrología y sus diferentes funciones, también, ayudará a entender cuál es su rol en la generación de la enfermedad renal y como implementar nuevas estrategias terapéuticas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El aumento de cannabis como uso terapéutico en pequeñas especies especialmente en caninos va en ascenso (2), debido a la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas (epilepsias idiopáticas, meningoencefalitis de origen desconocido, enfermedad articular degenerativa, síndrome cognitivo senil, entre otras).

Aproximadamente, el 75% (3) de pacientes caninos con estas enfermedades están consumiendo fitocannabinoide cannabidiol (CBD) como plan terapéutico coadyuvante; sin embargo, no existen reportes de los efectos colaterales o terapéuticos de este fitocannabinoide a nivel renal en especies caninas (99).

La función del sistema endocannabinoide en el tejido renal no se comprende en su totalidad (26). Así mismo, una de las principales funciones a nivel renal es la reabsorción de iones en el túbulo proximal, este túbulo, es el segmento de la nefrona responsable de la reabsorción del 70 al 80% del filtrado, de este filtrado, aproximadamente el 70% de sodio se reabsorbe en esta porción mediante transporte activo, modulado por la actividad de la bomba sodio/ potasio ATPasa (Na^+/K^+ ATPasa) en las células LLC-PK1(27).

Para comprender cómo funciona el sistema endocannabinoide a nivel renal se han realizado algunas investigaciones (27,28,64,65,100), su objetivo de estudio es describir la distribución del sistema endocannabinoide en el tejido renal y su rol en salud y enfermedad. De igual manera, los modelos animales utilizados para los diferentes estudios fueron ratas, ratones y porcinos, sin embargo, también se describió el sistema endocannabinoide en el tejido renal humano (64,101). Adicionalmente, las enfermedades renales donde se reporta actividad del sistema endocannabinoide son la nefropatía diabética, enfermedad renal relacionada con la obesidad, fibrosis renal, injuria renal aguda e injuria renal crónica (28).

Sin embargo, se requieren más estudios para determinar cuál es el rol específico de los

endocannabinoides y los receptores en el tejido renal en la salud y la enfermedad. De igual manera, aun se discute cómo interactúan los endocannabinoides y fitocannabinoides con los receptores en el tejido renal (68). Por último, faltan más estudios para describir el mecanismo mediante el cual tanto los endocannabinoides como los fitocannabinoides son capaces de alterar el flujo renal, la reabsorción de solutos y disminuir o aumentar la tasa de filtración glomerular (TFG).

Aunque no existen reportes bibliográficos de los efectos del CBD en la reabsorción de sodio en caninos, esta especie presenta una distribución significativa en el tejido nervioso y en diferentes órganos como la piel huesos y tracto gastrointestinal (2,58), además el mecanismo mediante el cual se reabsorbe sodio a nivel renal es similar al mecanismo de ratas y humanos (26,27,39). Por lo anterior, se puede inferir que el tejido renal, específicamente en el túbulo proximal debería existir sistema endocannabinoide que regule el transporte de sodio.

Con base en estos antecedentes, surge la siguiente pregunta que se espera responder durante el desarrollo del proyecto: ¿Cuál es el efecto del fitocannabinoide cannabidiol sobre la excreción de sodio en el tejido renal?

La hipótesis que se plantea es la existencia de cambios en la excreción de sodio post administración del fitocannabinoide cannabidiol (CBD) a diferentes dosis, 48 horas después de administrar el fármaco, tiempo que demora el CBD en metabolizarse y excretarse a nivel renal (55,68,95).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Analizar los efectos del fitocannabinoide cannabidiol (CBD) sobre la excreción de sodio en orina, mediante la técnica de espectrometría de masas, 48 horas después de la administración del CBD.

4.2. Objetivos específicos

- Identificar si a dosis altas (50 mg/Kg) de CBD se altera la excreción de sodio en ratas Wistar.
- Evaluar los valores de excreción de sodio entre la población de ratas control y las ratas expuestas al CBD.
- Determinar si hay diferencias en la excreción de sodio, en ratas sometidas a la administración intraperitoneal del CBD a dosis de 15mg/Kg-50mg/Kg.

5. PROCEDIMIENTOS Y METODOLOGÍA

Para llevar a cabo este trabajo, se realizó un estudio de tipo experimental completo, donde se utilizaron ratas Wistar a las que se les aplicó el fitocannabinoide cannabidiol (CBD) full spectrum (donado por la empresa ICAN de la Ciudad de México) a dosis de 15-50mg/Kg ; estas dosis se estandarizaron de esta manera de acuerdo con la metodología utilizada en el estudio de Hložek y colaboradores en el 2017 donde evaluaron el perfil farmacocinético de diferentes fitocannabinoides entre ellos el CBD administrados por vía subcutánea en ratas Wistar con el objetivo de determinar cambios comportamentales (102) (. Posteriormente, se midieron los niveles de excreción de sodio en orina, obteniendo esta, mediante el método de recolección directa puntual en vaso precipitado (103), post administración del CBD.

El estudio que se llevó a cabo es un estudio experimental con casos y controles.

5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El siguiente gráfico, ilustra la distribución que presentaron los sujetos durante la administración del medicamento fitocannabinoide cannabidiol (CBD), el vehículo y grupo control.

5.1.1. Unidades experimentales

Se trabajó con treinta (30) ratas macho, adultas, de la especie *Rattus Norvegicus*, cepa Wistar. Los sujetos se obtuvieron del bioterio central de la facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Adicionalmente, las ratas fueron mantenidas en un ambiente con atenuación de ruido, humedad al 40-45%, temperatura entre 20 y 21 °C. La sala cuenta con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, y a los animales se les suministró alimento y agua ad libitum.

Para determinar el número de unidades de experimentación para trabajar, se tuvo en

cuenta el método de ecuación recursiva. Este método, se utiliza cuando el objetivo principal del experimento es encontrar diferencias entre los grupos, como es el caso del presente estudio (104). La fórmula que se empleó para estimar el número de sujetos fue $(e = n-g)$ donde:

e = Grados de libertad del análisis de varianza; el cual debe estar entre 10-30

n = Número total de animales (30)

g = Número de grupos (5)

5.1.2. Procedimientos

Los niveles de sodio en orina se midieron 48 horas posterior a la administración del CBD. La orina se recolectó de manera directa en vaso precipitado, tal como se ilustra en el diseño experimental (figura 9). De igual manera, estas mediciones se realizaron mediante el método de espectrometría de masas en el laboratorio veterinario mycrovet. Adicionalmente, se tuvo un grupo control, al cual no se le suministró fitocannabinoide cannabidiol y se evaluaron niveles de sodio en orina.

Para obtener las muestras de orina se realizó el siguiente protocolo:

5.1.3. Material Necesario para recolección directa puntual en vaso precipitado

- Vaso precipitado de poliestireno de 5 ml
- Guantes
- Micropipeta
- Tubo eppendorf

5.1.4. Sujeción del sujeto de estudio durante la toma de la muestra

- Se tomó el animal por la cola, luego se realizó un estímulo táctil suave sobre la espalda del animal, tal como se ilustra en la imagen en el diseño experimental.
- El investigador número 2 sostenía el vaso precipitado, cerca de la zona perineal (figura 9).
- Se recolectó aproximadamente entre 0.1-0.5ml de orina, (algunos animales excretaban la orina en 5 segundos, mientras que otros tardaban aproximadamente 1 minuto).

5.1.5. Protocolo de toma de muestra

- Se colocó el animal sobre la mesa de laboratorio, previamente desinfectada
- Se sujetó al animal de la cola con una mano y con la otra se realizó un estímulo táctil sobre la espalda
- El investigador número 2 sostuvo el vaso precipitado de 5ml, durante 1 minuto aproximadamente o menos, hasta que el animal excretara orina
- Se obtuvo un volumen aproximado entre 0.1-0.5ml de orina
- Con micropipeta se pipeteo la orina y se depositó en tubo eppendorf, las muestras se mantuvieron en frío y posteriormente se congelaron.

5.1.6. Administración del CBD

Se distribuyeron 5 grupos de 6 roedores de la siguiente manera:

- Grupo 1 Dosis mínima: Administración de CBD por vía intraperitoneal a una dosis de 15mg/Kg de peso vivo, aproximadamente 0.06ml
- Grupo 2 Dosis estándar: Administración de CBD por vía intraperitoneal a dosis de 30mg/Kg de peso vivo, aproximadamente 0.1ml
- Grupo 3 Dosis máxima: Administración de CBD por vía intraperitoneal de 50 mg/Kg de peso vivo, aproximadamente 0.15ml
- Grupo 4: Administración del vehículo (aceite de oliva extra virgen 1 ml) por vía

intraperitoneal

- Grupo 5: Grupo control

5.1.7. Envío de orina a laboratorio para medición de sodio

- Las muestras se tomaron 48 horas después de inyectar el medicamento o vehículo
- Se depositó la orina en el tubo eppendorf cubriéndolo de la luz
- Las muestras se colocaron en una nevera portátil, y se transportaron a la nevera del laboratorio del departamento de fisiología, donde estuvieron congeladas hasta su análisis
- Todas las muestras se enviaron el mismo día al laboratorio mycrovet, para análisis de sodio, mediante la técnica de espectrometría de masas.

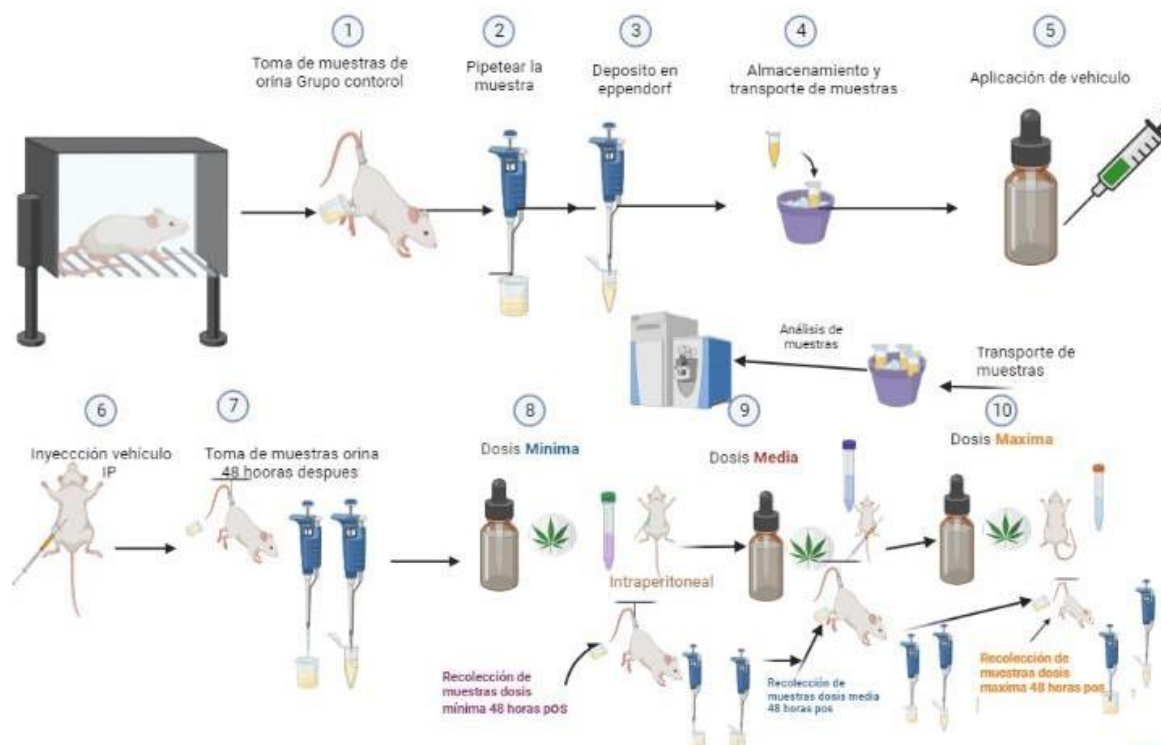


Ilustración 9. Diseño experimental y cronología de grupos de trabajo. Tomada de Biorender. Adaptada por la autora.

Se establecieron cinco (5) grupos, cada uno con 6 ratas adultas, a cada grupo se le aplicó dosis diferentes de CBD por vía intraperitoneal. La concentración del producto es de 100mg/ml diluido en aceite de oliva extra virgen. En concreto, se administró el medicamento o vehículo 48 horas antes de la medición de sodio, además los sujetos fueron sometidos a sujeción manual, para la obtención de las muestras de orina, mediante el método de recolección directa puntual en vaso precipitado.

La administración del vehículo y el fármaco (CBD) se realizó por vía intraperitoneal. Adicionalmente, se estableció un grupo control (a este grupo no se les administró ni el vehículo ni el CBD), un grupo a los que solo se les aplicó el vehículo, y 3 grupos más, a los que se les administró diferentes dosis de CBD como se ilustra en la figura 9.

5.2. Definición de variables

Tabla 4. Definición operacional y escala de medición de variables.

Variable	Definición operacional	Escala de medición
Tratamiento (Administración de cannabidiol)	Se administró el medicamento CBD, que viene en vehículo de aceite de oliva, por vía intraperitoneal a dosis variables en grupos diferentes Grupo 1: 15mg/Kg, Grupo 2: 30 mg/Kg, grupo 3:50 mg/Kg	Cuantitativa Continua
Momento (antes del tratamiento, 48 horas después del tratamiento)	Se administró el vehículo o tratamiento, 48 horas antes de tomar niveles de sodio	Cuantitativa Continua
Vehículo (Administración de aceite de oliva)	Se administró 1ml de aceite de oliva vía intraperitoneal	Cuantitativa continua
Excreción de sodio en orina	48 horas después de administrar el tratamiento o el vehículo en diferentes grupos de sujetos: Grupo control a los que no se les aplicó nada, grupo a los que se les administró el vehículo, y grupo de unidades experimentales se les aplicó el medicamento a diferentes dosis. Luego, se tomó la muestra y se almacenó en un tubo eppendorf, para su respectivo traslado al laboratorio	Cuantitativa continua

Tabla 5. Tipo y definición conceptual de variable.

5.3. Análisis estadístico

Tanto para el análisis de los datos como análisis estadístico se utilizó el programa SPSS. Para cada grupo se halló la media y la desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial, y el test de normalidad de Shapiro Wilk, con prueba de homocedasticidad; los factores fijos son el tratamiento, el vehículo y el momento. Posteriormente, se realizó pruebas post hoc, como la prueba de Tuckey. El umbral de significancia establecido fue del 5% ($P < 0.05$).

5.4. Consideraciones éticas

El presente estudio fue avalado por el comité de ética de la facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 7 de abril del 2022 (Acta 15 -2022).

Los experimentos que se realizaron durante este trabajo se desarrollaron teniendo en cuenta la ley 84 de 1989, capítulo VI: *del uso de animales vivos en experimentos e investigación*. De igual manera, los experimentos se rigieron por la reglamentación estipulada en la resolución N° 0008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la administración en salud, cumpliendo especialmente lo mencionado en el título V: *investigación biomédica con animales*.

Este estudio, se basó en revisiones bibliográficas referentes a la administración de cannabis y la evaluación de la función renal en modelos animales y su importancia en el avance médico veterinario. De igual forma, para el desarrollo de este estudio se seleccionó y se obtuvieron legalmente las ratas de cepa Wistar, además, se tuvo presente el número mínimo requerido para obtener resultados que representaron validaciones estadísticas y científicamente aceptables. Así mismo, los animales se mantuvieron en adecuadas condiciones sanitarias, cumpliendo la reglamentación sanitaria vigente (el número de animales a utilizados

se describió en el apartado de Metodología). Todos los desechos generados se dispusieron de acuerdo con la norma y en el caso de los anatomopatológicos, se almacenaron en bolsa roja para su posterior incineración. Además, este estudio fue de riesgo mínimo y no duplicativo por su carácter científico.

Para optimizar los recursos de los individuos y para futuros proyectos de investigación, los sujetos de experimentación fueron sacrificados y perfundidos para conservar tejido renal y cerebral, con el objetivo de ser empleados para futuros estudios. Así mismo, se utilizó anestesia farmacológica y se procedió a perfundir, para la sedación y la anestesia se le suministró una dosis de ketamina al 10% (400 mg/Kg) y xilacina al 2 % (5mg/Kg) 10 veces mayor a la dosis terapéutica para cada individuo, generando un plano anestésico profundo. (105).

Para la perfusión, una vez los sujetos alcanzaron un plano anestésico profundo, se ubicaron en posición dorsoventral y se ubicó el esternón, luego se realizó una incisión en la cavidad torácica a la altura del esternón y se cortó lateralmente hasta la línea media clavicular derecha e izquierda; fracturando costillas y ascendiendo hasta segundo-tercer espacio intercostal.

Posteriormente, al hacerse visible el corazón, se procedió a introducir la aguja de perfusión con el flujo de solución salina en el ventrículo izquierdo, inmediatamente se cortó la aurícula derecha para permitir la salida de sangre y demás fluidos. Al mismo tiempo, el goteo fue regulado por gravedad y se permitió fluir la solución salina durante 15 minutos aproximadamente (volumen de 250ml). Al finalizar, se realizó la fijación de los tejidos, mediante inyección de paraformaldehído al 4% por 20 minutos (unos 150ml).

Finalizado el proceso de fijación, se realizó la decapitación post-mortem. Por último, se resalta que en este proyecto se evitó con mucho empeño el sufrimiento de los sujetos.

6. RESULTADOS

El estudio incluyó 30 ratas Wistar, divididas en 5 grupos, cada uno conformado de 6 unidades experimentales distribuido de la siguiente manera: grupo control (no se aplicó nada), grupo vehículo (se aplicó aceite de oliva a 1ml), grupo de dosis mínima (se aplicó 15mg/Kg de CBD, 0.06ml), grupo de dosis media (se aplicó 30mg/Kg de CBD, 0.1ml) y grupo de dosis máxima (se aplicó 50mg/Kg CBD, 0.15ml). De igual manera, a cada una de las unidades experimentales se les tomó muestra de orina, en caso del grupo vehículo, dosis mínima, media y máxima se recolectó la orina 48 horas después de la aplicación intraperitoneal del vehículo y CBD. Por su parte, el análisis de sodio se realizó por medio de la técnica de espectrometría de masas, los resultados se muestran en la tabla 6.

Control	Vehículo	Dosis min	Dosis media	Dosis Max
158,5 mmol/l	79 mmol/l	151,3 mmol/l	181,6 mmol/l	217,9 mmol/l
73,7 mmol/l	61,2 mmol/l	115,5 mmol/l	202,4 mmol/l	183,5 mmol/l
63,9 mmol/l	89,3 mmol/l	199,8 mmol/l	141,8 mmol/l	201,2 mmol/l
81,5 mmol/l	144 mmol/l	140,9 mmol/l	182,4 mmol/l	231,5 mmol/l
55,8 mmol/l	62,7 mmol/l	105 mmol/l	158,5 mmol/l	245,4 mmol/l
120,2 mmol/l	50,3 mmol/l	82,4 mmol/l	206,9 mmol/l	205,3 mmol/l

Tabla 6. Resultados de sodio. muestra los resultados de los niveles de sodio de acuerdo con la distribución de los grupos.

La tabla 7 resume los estadísticos descriptivos (media varianza y desviación estándar) de cada uno de los grupos

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media		Desviación estándar	Varianza	Asimetría	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar
Sodio mmol/L	30	50,30	245,40	139,7800	10,96034	60,03225	3603,871	,029	,427
CBD mg/dl	30	,00	50,00	19,2000	3,50645	19,20560	368,855	,541	,427
N válido (por lista)	30								

Tabla 7. Estadísticos descriptivos para cada variable.

Para determinar la normalidad de la distribución de los datos de realizó la prueba de Shapiro-Wilk (tabla 8)

		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	GI	Sig.
Sodio Orina	CONTROL	,970	6	,889
	VEHICULO ml	,848	6	,150
	DOSIS MÍNIMA	,967	6	,874
	DOSIS MEDIA	,935	6	,618
	DOSIS MÁXIMA	,986	6	,977

Tabla 8. Prueba de Shapiro-Wilk. Con una $p > 0.05$ no se puede rechazar la H_0 , lo que significa que los datos presentan una distribución normal.

Por su parte, para determinar la homocedasticidad de los datos se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas tabla 9

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
sodioOrina	Se basa en la media	,788	4	25	,544
	Se basa en la mediana	,453	4	25	,769
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,453	4	19,085	,769
	Se basa en la media recortada	,730	4	25	,580

Tabla 9. Prueba de homogeneidad de varianzas. Con una $p > 0.05$ no se puede rechazar la H_0 , por lo tanto, las variables presentan homocedasticidad

La prueba estadística que se utilizó en este estudio para el análisis de los datos fue ANOVA, en la que se observó una diferencia estadísticamente significativa (tabla 10).

ANOVA

sodioOrina					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	76904,751	4	19226,188	17,410	,000
Dentro de grupos	27607,517	25	1104,301		
Total	104512,268	29			

Tabla 10. ANOVA. Se observa una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ al aplicar ANOVA, lo que indica que existen diferencias en al menos 2 de los grupos analizados

Para determinar que grupos presentan diferencias estadísticamente significativas, se realizó una prueba post hoc, y prueba de Tukey (tabla 11)

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: sodioOrina							
	(I) DosisCBD	(J) DosisCBD	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	CONTROL	VEHICULO ml	11,1833	19,1859	,976	-45,163	67,530
		DOSIS MINIMA	-40,2167	19,1859	,253	-96,563	16,130
		DOSIS MEDIA	-86,6667*	19,1859	,001	-143,013	-30,320
		DOSIS MAXIMA	-121,8667*	19,1859	,000	-178,213	-65,520
	VEHICULO ml	CONTROL	-11,1833	19,1859	,976	-67,530	45,163
		DOSIS MINIMA	-51,4000	19,1859	,086	-107,747	4,947
		DOSIS MEDIA	-97,8500*	19,1859	,000	-154,197	-41,503
		DOSIS MAXIMA	-133,0500*	19,1859	,000	-189,397	-76,703
	DOSIS MINIMA	CONTROL	40,2167	19,1859	,253	-16,130	96,563
		VEHICULO ml	51,4000	19,1859	,086	-4,947	107,747
		DOSIS MEDIA	-46,4500	19,1859	,143	-102,797	9,897
		DOSIS MAXIMA	-81,6500*	19,1859	,002	-137,997	-25,303

Tabla 11. Prueba te Tukey. Se observa diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$, entre grupo control y dosis media, entre grupo control y dosis alta. Diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$, entre grupo vehículo y dosis media, entre grupo vehículo y dosis alta. Se observa diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$, entre grupo dosis mínima y dosis alta.

6.1. SODIO EN ORINA

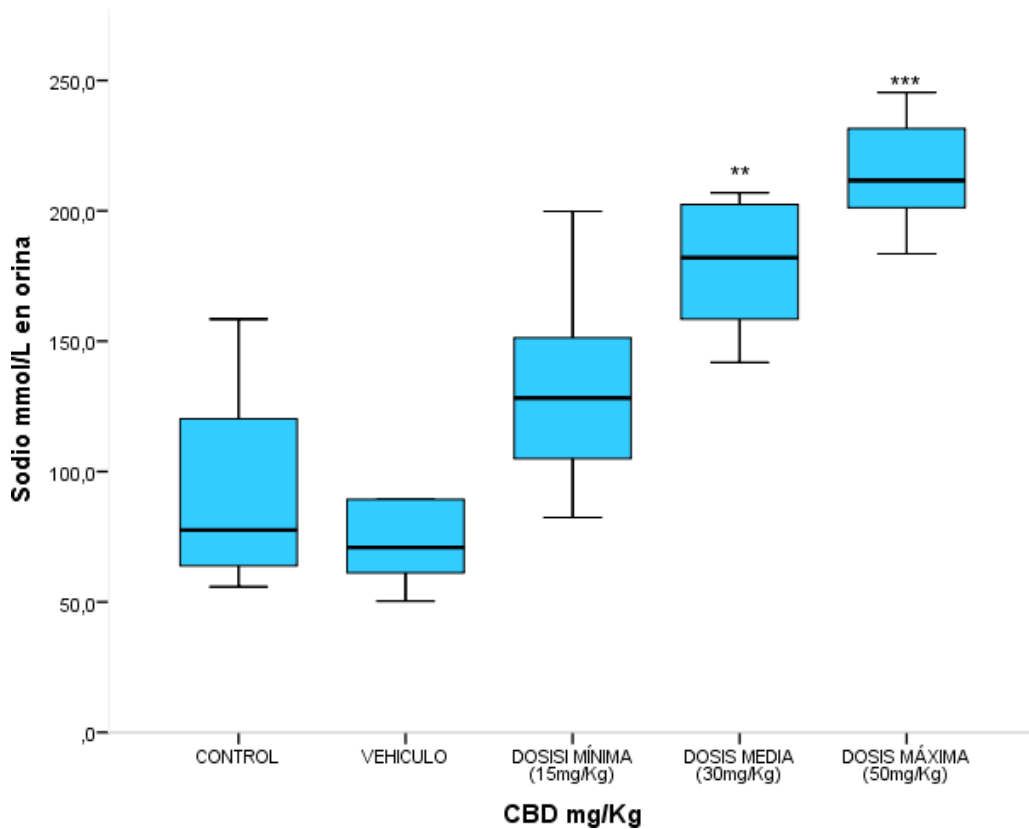


Ilustración 10. Cajas y bigotes. Cajas y bigotes de valores de excreción de sodio a nivel renal, 48 horas postadministración del CBD a diferentes dosis o vehículo. Las mediciones de sodio se registraron en 5 grupos (control, vehículo, dosis mínima, dosis media y dosis máxima). Por lo tanto, la parte superior e inferior de cada cuadro representa los percentiles 25 y 75 respectivamente, la línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana, y los bigotes representan los valores mínimo y máximo. De manera similar, los * representan las diferencias estadísticas ** ($p < 0.001$), *** ($P < 0.0001$). Se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control (sin dosis de CBD) y el grupo de dosis media (30 mg/Kg de CBD), entre control y grupo de dosis máxima (50 mg/Kg de CBD), también se observa este comportamiento entre el grupo vehículo (1ml de aceite de oliva) y dosis media, entre el grupo vehículo y dosis máxima. Finalmente, se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de dosis mínima (15 mg/Kg de CBD) y el grupo de dosis máxima.

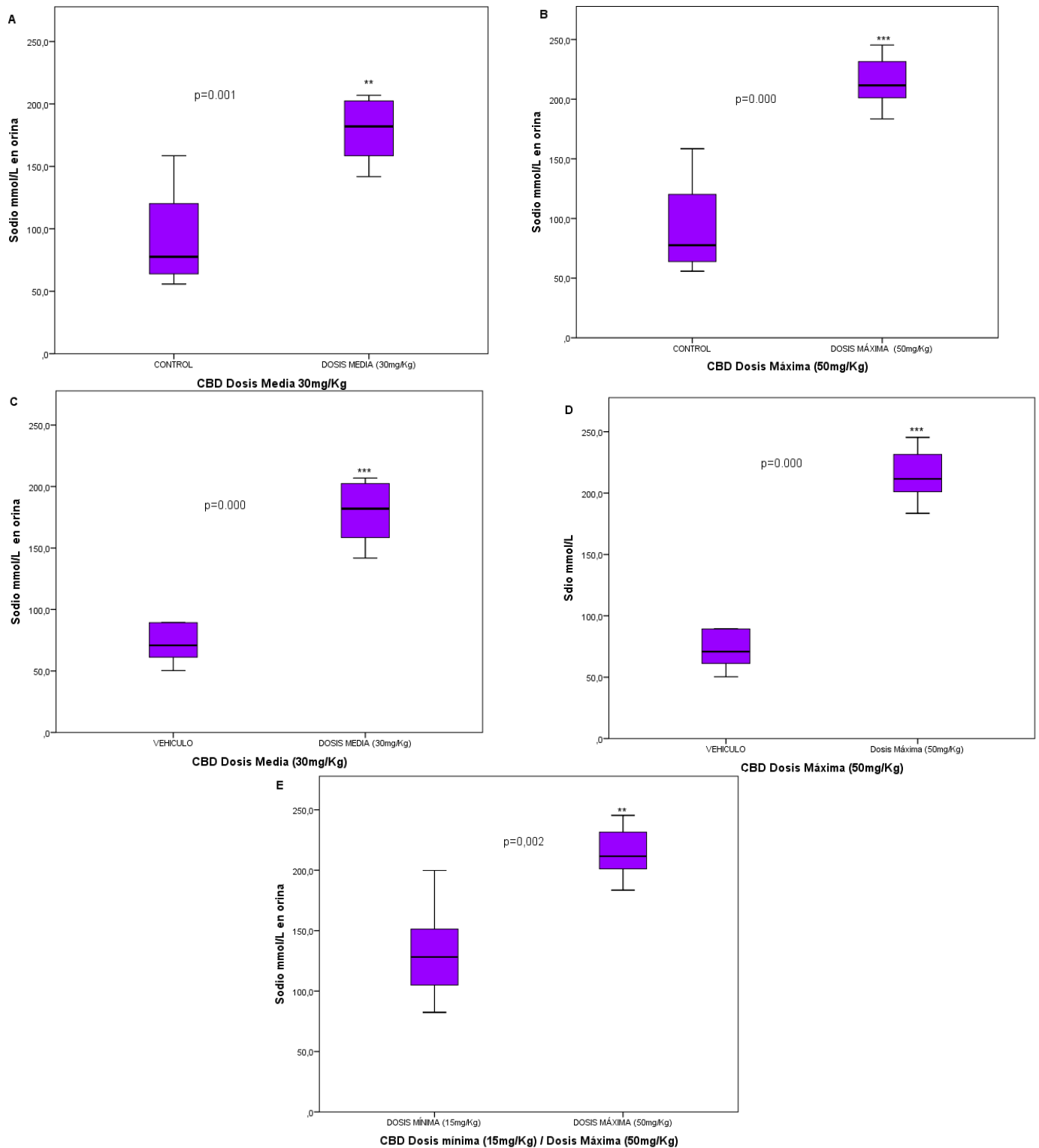


Ilustración 11. Cajas y bigotes de valores de excreción de sodio a nivel renal, 48 horas post administración del CBD a diferentes dosis o vehículo. **A** Grafica comparativa del grupo de dosis media vs el control. ($p=0.001$) entre el grupo control y el grupo de dosis media. **B** Grafica comparativa entre el grupo control con respecto al grupo de dosis

máxima ($p=0.000$) **C** Grafica comparativa entre el grupo vehículo y el grupo de dosis media ($p=0.000$). **D** Grafica comparativa entre el grupo vehículo y el grupo de dosis máxima ($p=0.000$). **E** Grafica comparativa ($p=0.002$) entre el grupo de dosis media con respecto al grupo de dosis máxima.

6.2. GRAFICA DE MEDIAS

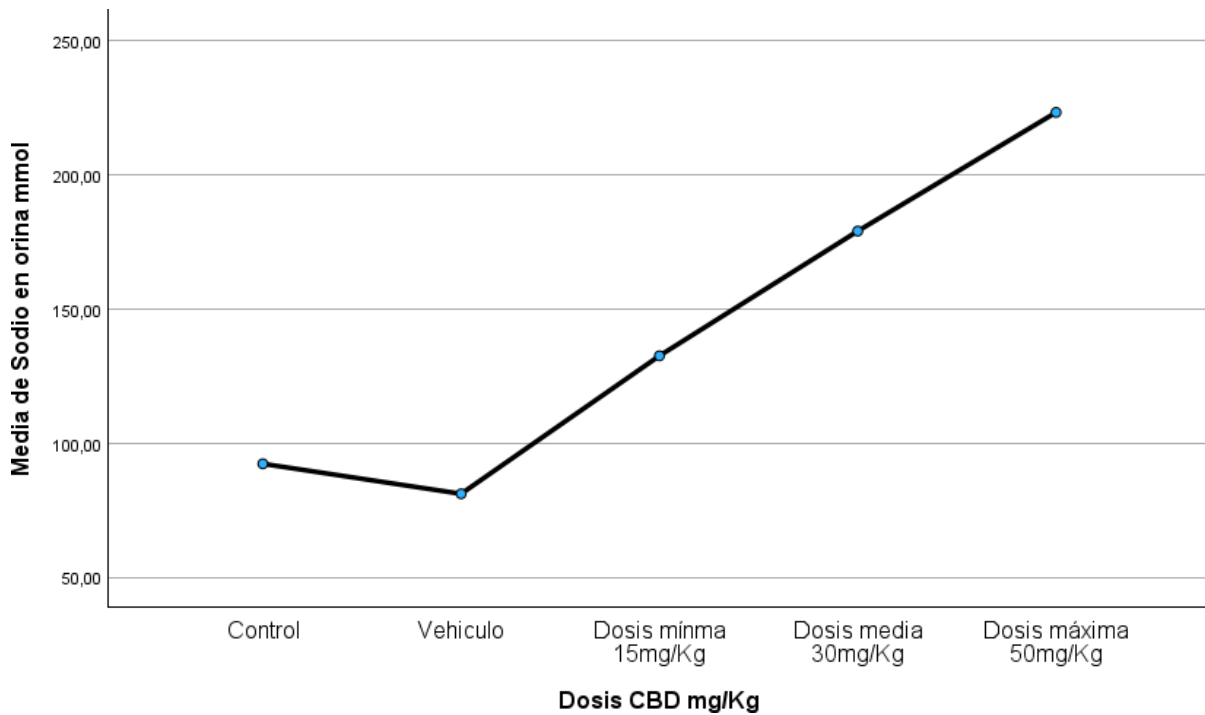


Ilustración 12. Gráfica de medias. Se evidenció un aumento de las medias de excreción de sodio con respecto al aumento de dosis de CBD.

7. DISCUSIÓN

El uso de productos a base de cannabis en medicina veterinaria, principalmente en caninos, se ha incrementado en los últimos años (3,4,99,106,107). Así mismo, en diversos estudios (11,26,27) se ha demostrado que antagonistas del receptor CB1, inhiben la activación de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ en los túbulos renales, alterando posiblemente la excreción de sodio, este mecanismo probablemente sea similar en el túbulo proximal del canino, dado que la distribución del sistema endocannabinoide a nivel renal es similar en los mamíferos estudiados (16,25,75,108); sin embargo no existen reportes que tipifiquen la distribución del sistema endocannabinoide en el tejido renal de esta especie .

El CBD se considera uno de los medicamentos más seguros, debido a que los mamíferos poseen una distribución baja de receptores endocannabinoideos en el tronco encefálico (51). Además, no se ha establecido una dosis letal LD_{50} para este fármaco, sin embargo, se sugiere que esta podría ser de 5000 mg/Kg (109). El CBD es un antagonista de los receptores CB1 y CB2 (78,79), y se comporta como agonista de los receptores TRPV1 (77). Por su lado, en los túbulos renales, los receptores CB1 tienen como función la activación de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$. Comprendiendo, que los antagonistas del receptor CB1 bloquean de manera indirecta esta bomba. Cuando se incrementa la expresión de este receptor, es indicador de injuria del túbulo renal (26). Por ello, los antagonistas de este receptor se emplean como posibles focos terapéuticos en lesiones renales (26,27). Por el contrario, los receptores TRPV1 (77,110) aparentemente son los responsables de inactivar la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ en los túbulos, aumentando probablemente la excreción de sodio a nivel renal (21,27).

La bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, es una proteína integral de membrana heterodímera compuesta por tres subunidades α , β y γ (37,47). La subunidad α permite el cambio conformacional de la bomba, mientras que la subunidad β facilita la correcta inserción de la subunidad α a la membrana celular, regula la afinidad de los sitios de unión para los iones y regula el transporte. Por otro lado, la subunidad γ facilita la correcta afinidad de los sitios de unión de la subunidad α a la membrana (46).

La bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, utiliza hidrólisis de ATP para movilizar 3 moléculas de Na^+ al espacio extracelular y 2 moléculas de K^+ al compartimiento intracelular. Por su lado, la enzima adenilato ciclasa, produce niveles de AMPc que activan la PKA. Tanto el AMPc como las PKA son los responsables de activar la bomba, mediante el estímulo de la proteína de unión a elementos reguladores de AMPc (CRE) (48), coactivadores transcripcionales regulados del elemento respuesta del AMPc (CBB) y los coactivadores transcripcionales regulados (48). Este mecanismo mediado por uno de los sitios de unión al receptor CB1 a nivel renal (71). Como se mencionó anteriormente, los receptores CB1 ubicados en el túbulo contorneado proximal, son los responsables de la activación de la bomba, mediado por la vía del AMPc, como resultado, el sodio que se encuentra en el túbulo se moviliza a la circulación (reabsorción de Na^+) y el K^+ , se moviliza desde la circulación hasta el túbulo renal (71).

La regulación de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, en el túbulo contorneado proximal está mediada por diversas proteínas, por ejemplo, la quinasa 1 inducible por sal (SIK1) (35), la principal función de esta proteína es bloquear la transcripción, inhibiendo los coactivadores transcripcionales regulados del elemento respuesta del AMPc (CREB), lo que estimula la señalización del factor 2 del potenciador de miocitos (MEF2), activando el factor nuclear de genes regulados por células T activadas (NFAT). Es decir, CREB, MEF2 y NFAT desencadenan efectos reguladores que alteran la tasa de transcripción de la subunidad α de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ (48,111).

Otras proteínas involucradas en la regulación de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, son la Ca^{2+} /proteína quinasa dependiente de calmodulina (CaMK1), la proteína fosfatasa metiltransferasa (PME1) y la proteína fosfatasa A2 (PPA2). En el caso de la CaMK1 fosforila y activa SIK1, debido al aumento de sodio en la luz de la nefrona, generando un aumento de Ca^{2+} intracelular, como consecuencia, se presenta la fosforilación de PME1 por parte de SIK1, la disociación de PME1 del complejo de la bomba y por último la activación de PP2A encargada de la desfosforilación de la subunidad α_1 de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, activándola de manera aguda (111) la PP2A, desfosforila la subunidad α_1 de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ y la activa de manera aguda (48). Por otro lado, la principal función de PME1 es inactivar PPA2, bloqueando la desfosforilación de la subunidad α_1 de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, generando endocitosis de esta. Este mecanismo podría explicar una de las posibles vías del aumento de la excreción de sodio a nivel renal en el presente estudio. Por otra parte, una disminución significativa del

AMPC y PKA debido al antagonismo del receptor CB1 por parte del CBD (25,75), podría disminuir la reabsorción de sodio en el túbulo proximal, por consecuencia aumenta la excreción de sodio (112), como se observa en los resultados expuestos anteriormente de este estudio. Esto disminuye la activación de la bomba pudiendo ser un posible foco terapéutico en pacientes con enfermedad renal crónica; sin embargo, es necesario determinar el tono endocannabinoide a nivel renal en el canino.

En el presente estudio, de acuerdo con la gráfica de los resultados de medias, se evidencia un incremento, entre la dosis de CBD (eje x) y niveles de excreción de sodio en orina (eje y). Es decir, que después de 48 horas de la administración del fitocannabinoide cannabidiol (CBD) en ratas Wistar, disminuye la reabsorción de sodio a nivel del túbulo proximal, de manera significativa por una disminución en la actividad de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, pues se sugiere, que el CBD es un antagonista de los receptores CB1 a nivel renal. Janaik y colaboradores demostraron que al bloquear el receptor CB1 en el túbulo contorneado proximal disminuían las lesiones provocadas por isquemia y reperfusión en el riñón. Comparándolo con este estudio, posiblemente el CBD al ser antagonista del receptor CB1 podría disminuir a corto plazo las lesiones renales en el modelo de ratas Wistar. Por lo tanto, si este estudio se extrapolara a caninos, quizá el CBD, se comporte como un fármaco nefro protector a corto plazo

Los resultados del presente estudio tienen un comportamiento similar a los de Sampaio y colaboradores, ellos utilizaron cultivo celular de túbulo contorneado proximal de cerdo y rata, aplicando un antagonista de los receptores CB1 (AM251), generando una disminución de la actividad de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, disminuyendo la reabsorción de sodio a este nivel. Por su parte, Li y colaboradores utilizaron ratas Wistar y cultivo celular de cerdo, aplicaron capsaicina un agonista selectivo de los receptores TRPV1, comprobando un aumento significativo de la excreción de sodio a nivel renal en ratas, (112), esto coincide con el presente estudio y es uno de los probables mecanismos que podrían explicar el aumento de excreción de sodio, teniendo presente que el CBD se comporta como un agonista en esos receptores.

Asimismo, un antagonista de los receptores TRPV1 (Capsazepina) revirtió los efectos de un agonista de los receptores CB1 (WIN55) (27). Por ello, es de interés para futuros estudios el efecto del CBD en otros receptores que pueden influir de manera indirecta en el receptor CB1 y así mismo, en la actividad de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$. Por otro lado, se sugiere que el

mecanismo por el cual se pueda explicar el aumento de la excreción de sodio se da por la interacción de la molécula de CBD con los receptores TRPV1 en los podocitos (110). Adicionalmente, Ambrus y colaboradores en el 2017, comprobaron la activación de canales TRPV2 y TRPV4 en podocitos renales humanos a través de concentraciones $10.6 \pm 1,3 \mu\text{M}$ de CBD, observando un incremento moderado de las concentraciones de calcio intracelular, produciendo la alteración del funcionamiento de la bomba en esa región, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo (110).

En el presente estudio, se determinó que hubo diferencias estadísticamente significativas en la excreción de sodio a nivel renal, 48 horas post administración del CBD, a diferentes dosis (15mg/Kg, 30mg/Kg y 50mg/Kg) por vía intraperitoneal con un valor $p < 0.05$. De igual manera, este resultado puede ser producto de la interacción del CBD con los receptores CB1 en el túbulo contorneado proximal en la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, provocando una inactivación de esta bomba, lo que conlleva a una disminución de la reabsorción de sodio en el túbulo aumentando la excreción de este ion en la orina (27). En enfermedad renal crónica se busca bloquear la bomba con el fin de reducir las especies reactivas de oxígeno provocadas por la misma (59); por lo anterior, es tentador pensar que el presente estudio podría ser un foco terapéutico para pacientes con lesiones renales, sin embargo, como se mencionó anteriormente aún no se encuentra establecido la distribución del sistema endocannabinoide en el riñón del canino.

La prueba post hoc de tukey, evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo de dosis media, donde se presentó un incremento de la excreción de sodio en el grupo de dosis media (178.93 ± 10.24), con respecto al grupo control (68.35 ± 14.03) y con un valor $p = 0.001$. Así mismo, se presentaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control y el grupo de dosis máxima, donde se presentó un incremento de la excreción de sodio en el grupo de dosis máxima (214.13 ± 9.08), con respecto al grupo control (68.35 ± 14.03) y con un valor de $p = 0.000$. También, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de vehículo y dosis media, donde se presentó un incremento de la excreción de sodio en el grupo de dosis media (178.93 ± 10.24), con respecto al grupo vehículo (81.08 ± 13.79) y con un valor $p = 0.000$. Igualmente, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo vehículo y dosis máxima, donde se observó un incremento de la excreción de sodio en el grupo de dosis máxima (214.13 ± 9.08), con respecto al grupo vehículo (81.08 ± 13.79) y con un valor $p = 0.000$.

Por último, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de dosis mínima con respecto al grupo de dosis máxima, donde se presentó un incremento del grupo de dosis máxima (214.13 ± 9.08), con respecto al grupo de dosis mínima (132.48 ± 16.84) y con un valor $p=0.002$. Por ello, estas diferencias estadísticamente significativas, demuestran que a medida que se aumenta la dosis de CBD, se acrecienta la excreción de sodio a nivel renal. De manera concreta, el mecanismo fisiológico que explica dicho comportamiento consiste en el antagonismo del receptor CB1 en la bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ y el agonismo de los receptores TRPV por parte del CBD (26,27,110). Estos resultados demuestran que a corto plazo el CBD podría revertir la lesión renal, posiblemente por el bloqueo del receptor CB1, esta hipótesis coincide con los estudios de Janiak y colaboradores, donde demostraron que al silenciar el receptor CB1 se revertían las lesiones por isquemia y reperfusión(9).

Con respecto al gráfico de medias, la disminución en la excreción de sodio podría indicar una activación de la bomba mediante el receptor CB1; Se conoce de ante mano que la anandamida es agonista de los receptores CB1 (55), su expresión en el glomérulo disminuye la tasa de filtración glomerular (55); como se mencionó anteriormente la regulación de la excreción de sodio a nivel renal está mediada por la activación de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ a través del receptor CB1 (26,27) y la tasa de filtrado glomerular, a través de la activación del receptor TRPV1 en la pelvis renal (21). Por lo anterior, la hipótesis que podría llegar a explicar la disminución de la excreción de sodio al aplicar el vehículo sugiere un aumento de la síntesis de anandamida a nivel renal por parte del aceite de oliva, lo que implicaría una disminución en la TFG, y un aumento en la reabsorción de sodio; esto tendría repercusiones negativas en pacientes que cursen con enfermedad crónica; sin embargo, se necesitan estudios que confirmen dicha hipótesis

Es importante resaltar, que la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ no es el único mecanismo responsable de la reabsorción de sodio, el antiportador Na^+/H^+ y el cotransportador $\text{NaPi}2a$, también realizan esta función, sin embargo, se ha estudiado ampliamente la interacción de los receptores cannabinoides con la activación de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ (48). Por su parte, Golosova y colaboradores detectaron que la AEA regulaba el transporte de Na^+ en el ASA de Henle, bloqueando el intercambiador Na^+/H^+ , a través de los receptores CB1 (113). Sin embargo, la AEA al ser agonista parcial de los receptores CB1, estimula la activación de la bomba en el túbulo contorneado proximal facilitando la reabsorción de Na^+ (74).

En el presente estudio, utilizamos CBD full spectrum como antagonista de receptores CB1, evidenciándose un aumento de la excreción de sodio a dosis medias y altas. Esto difiere del estudio de Golosova y colaboradores, que utilizaron un agonista parcial de los receptores CB1 y encontraron una mayor excreción de sodio (113) y concuerda con los resultados de Sampaio y colaboradores (27). Por otro lado, aun no es claro como interactúa el sistema endocannabinoide y los fitocannabinoides con los otros transportadores de sodio a nivel renal. En futuros estudios, se recomienda medir niveles de endocannabinoides en sangre y correlacionarlos con la distribución de receptores cannabinoides en los diferentes mecanismos de transporte en el riñón.

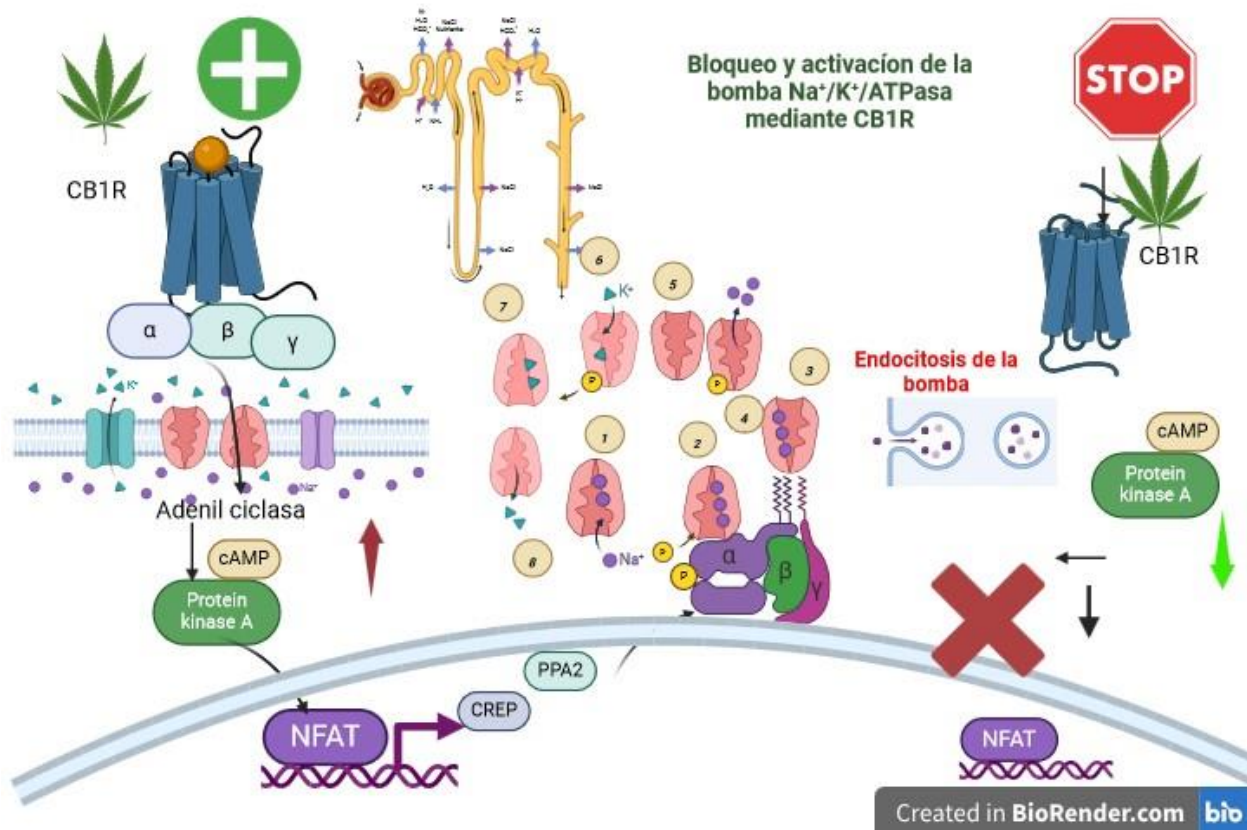


Ilustración 13. cascada de señalización del receptor CB1. Modificada del programa Biorender. Al activar el receptor CB1, modulan los niveles de adenilato ciclasa, como resultado aumentan los niveles de AMPc, activando los coactivadores transcripcionales regulados del elemento respuesta del AMPc (CREP), responsables de aumentar la activación de la bomba; a su vez, esto permite la estimulación la proteínofostatasa A2 (PP2A), responsable de desfosforilar la subunidad α de la bomba y activarla. Así mismo, Cuando se bloquea el receptor CB1, decrecen significativamente los niveles de AMPc, como consecuencia se bloquea la cascada de

señalización y no se produce la activación de la bomba. Por el contrario, se genera una endocitosis de esta. Adaptada por la autora.

La reabsorción de sodio en caninos, al igual que en la mayoría de los mamíferos está mediada principalmente por la activación de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, en el túbulo contorneado proximal de la nefrona, aproximadamente el 60-80% de este segmento es el responsable de la reabsorción de la mayoría de los solutos, en especial el sodio (27,71). Así mismo, otros segmentos de la nefrona como la rama gruesa ascendente del asa de Henle y el túbulo colector son responsables en menor medida de la reabsorción de sodio, principalmente por activación de la bomba seguido de otros transportadores (26).

En la actualidad, no existen estudios que demuestren la distribución del sistema endocannabinoide a nivel renal en los caninos, sin embargo y de acuerdo con el presente estudio, es importante establecer una adecuada dosificación de los diferentes fitocannabinoides en dicha especie.

Además, la presente investigación demostró que a mayor concentración de CBD se presentó un incremento de la excreción de sodio de manera aguda posiblemente por una disminución de la activación de la bomba, comportándose como un posible fármaco nefro protector, sin embargo, aún se desconocen los efectos de este fitocannabinoide a largo plazo. De igual manera, se necesitan estudios futuros que midan la filtración glomerular y la reabsorción de sodio en caninos que consuman CBD y THC de manera aguda y crónica, con el objetivo de estandarizar las dosis. Adicionalmente, se recomienda realizar una estandarización de la distribución del sistema endocannabinoide a nivel renal en esta especie.

8. CONCLUSIONES

El presente estudio, evaluó el efecto del fitocannabinoide cannabidiol (CBD) en la reabsorción de sodio a nivel renal en ratas Wistar, donde se evidenció que al utilizar una mayor concentración de fitocannabinoide (entre 30-50mg/Kg), aumentaba la excreción de sodio, posiblemente por un bloqueo directo del receptor CB1 en el túbulo proximal, inactivando la bomba Na^+/K^+ ATPasa (mecanismo de transporte primario para la reabsorción de este ion). Por otro lado, al utilizar una dosis mínima (15 mg/Kg) de CBD, no se observó ningún cambio sobre la excreción de sodio.

Este estudio, brinda soporte experimental de los efectos del CBD a diferentes dosis sobre la excreción de sodio 48 horas después de su aplicación, evidenciándose cambios estadísticamente significativos sobre la excreción de este ion, permitiendo abrir puertas a futuros estudios, para establecer dosis terapéuticas de este componente a nivel renal, tanto para caninos como para humanos.

Los resultados del presente estudio comparando los efectos del CBD a dosis altas (50mg/Kg) con respecto al grupo control, difieren de Suzuki y colaboradores, donde utilizaron modelo de enfermedad renal crónica por cisplatino y aplicando CBD a dosis de 10mg/Kg (como única dosis) en ratones, estas diferencias se deben posiblemente a la concentración y dosis del fármaco utilizado en nuestro estudio con respecto al estudio de Suzuki

9. RECOMENDACIONES Y PRODUCCIÓN

ACADÉMICA

En este trabajo, se evidenció que el CBD influye de manera aguda sobre la reabsorción de sodio a nivel renal, sin embargo, se desconocen los efectos del fitocannabinoide sobre la reabsorción de solutos cuando son utilizados por un largo periodo de tiempo. De manera adicional, se recomienda realizar estudios en modelos animales o en pacientes caninos, donde sea posible visualizar los efectos crónicos del CBD sobre la excreción de sodio a nivel renal y la depuración de creatinina en 24 horas.

Las principales limitaciones de este estudio son la falta de herramientas como jaulas metabólicas para medir la producción de orina en 24 horas, en el caso de filtrado glomerular no contar con un monitor transdérmico de fluorescencia que permite medir los niveles de inulina horas después de ser aplicada. Otra de las principales limitaciones del presente estudio son la falta de pruebas moleculares que permitan medir la actividad de la bomba Na/K/ATPasa a nivel renal con respecto a los receptores cannabinoides. Por lo anterior se recomienda para futuras investigaciones profundizar sobre los siguientes aspectos:

- Interacción del CBD sobre la producción de orina en 24 horas
- Explicar la interacción del CBD con el receptor CB1 en la bomba del tejido renal de rata y canino.
- Identificar los cambios sobre la tasa de filtración glomerular que produce el CBD mediante la medición de inulina tanto en ratas como en caninos.
- Identificar los efectos del CBD sobre la reabsorción de sodio a nivel renal de manera crónica.
- Estandarizar dosis de CBD terapéuticas a nivel renal en caninos.

Por último, se recomienda la aplicación del CBD en cultivos celular de epitelio renal de ser posible canino, con el fin, de evaluar la interacción de este componente sobre la actividad

de la bomba Na^+/K^+ ATPasa en el túbulo proximal.

9.1. Productos académicos

1. Presentación oral de resultados preliminares en el 7° Encuentro Nacional de Semilleros de investigación en Ciencias de la salud. Fundación Universitaria de Ciencias de la salud, por parte de la estudiante de pregrado María Paula Pinto 2023

IRP 501

Presentación Oral

Efectos del fitocannabinoide cannabidiol sobre la reabsorción a nivel renal en ratas wistar

Effects of the phytocannabinoid cannabidiol on renal reabsorption in rats

Autores:

**Heidy Viviana Yepes Gómez^a, Sandra Milena Lamprea Rodríguez^a,
Jhon Jader Betancurt-Rendón^b, Zulma Dueñas^c,
María Paula Pinto-Ulloa^d**

Filiación institucional

^a *Estudiante, Maestría en Fisiología, Universidad Nacional de Colombia.*

^b *Director de la Red de Cannabis medicinal en Medicina Veterinaria (VETCANN)*

^c *Profesora Titular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia*

^d *Estudiante de pregrado de Medicina. Universidad Nacional de Colombia*

2. Presentación oral de resultados preliminares en el congreso VETCANN ECOSOSTENIBLE online 2023

SEMILLERO SICAD

7:00 p.m.	Caso Clínico
7:30 p.m.	Efectos del cannabidiol sobre el comportamiento, bienestar y producción de gallinas ponedoras de jaula
8:00 p.m.	Generalidades de la terapia con cannabis en pacientes osteoarticulares y manejo del dolor
8:30 p.m.	Uso de cannabinoides en el manejo multimodal del dolor en un paciente felino con osteosarcoma axial. Reporte de un caso clínico
9:00 p.m.	Uso de CBD en el tratamiento de alteraciones del comportamiento, perspectivas de uso en perros
9:30 p.m.	Revisión de mecanismos de acción propuestos en efectos anticonvulsivos de cannabinoides y terpenos en tratamiento de epilepsia
10:00 p.m.	Efectos del fitocannabinoide cannabidiol sobre la reabsorción renal en Ratas Wistar (TESIS DE MAESTRÍA)
10:30 p.m.	Innovación en productos con cannabis para animales

¡GRACIAS!

A todos por ayudarnos a hacerlo posible

Abg. Hector Brotons Albert

Dra. Sylvia Arrau

Dra. Agustina Spector Mantasti

Dr. Rafael Santisteban

Zev Barnett

Dra. Diana Bultrago

Dra. Daniela Mayorguín Moreno

Patricia Tamayo Bohorquez

Dra. Luisa Salinas

Dr. Kevin Antonio Cárdenas

Dr. Cristian Yeid Hernández Prada

Dr. Leonardo Carmona Camacho

Dra. Jessica Pinedo

Rodrigo Gallardo

Dr. Erick Ponzo

Jaime Andrés Betancourt Velásquez

Dra. Raquel Noemí Cabrera

Dra. Francisca Medina

Dra. Paz Schell

Dra. Vanessa B. Seabro

Dra. Karla Pinto

Dra. Flor Ortiz

Dra. María Callejas Ortega

Dra. Mónica Lozano

Dr. Saul Martínez

Dra. María Paula Galea Pinta

Dr. Alejandro Ramírez

Dr. Sergio Javier Cirica

Dra. Aline Courlet

Dra. Cynthia Martínez

Dr. Jesús Antonio Bolívar Castro

Dr. Francisco Gómez Herrero

Dra. Diana Marcela Rossi

Dra. Juana Torres

Dr. Mish Castillo

Dra. Helgy Viviana Yepes Gomez

Dr. Carlos Castro

Dr. Esteban Castañeda

Angela Castro

Dr. Carlos Flores

Dr. Thim J. Bouwman

ONLINE **VETCANN ECOSOSTENIBLE 2023**

A. Anexo: Certificado de trazabilidad del CBD

Líder en la confiabilidad de sus análisis

Informe Analítico

No. 57941

Bogotá, 2023-06-21



Producto:	Preparación Magistral CBD 1% Solución Oral	Lote No.:	LC-1-182-06-23
Presentación:	FRASCO X 30mL Y 15mL	Forma Farmacéutica:	Solucion Oral
Cliente:	CANNABIAN PHARMA SAS	Tamaño del Lote:	491.3g
Dirección:	CR 28 A 53 A 68 AP 412	Procedencia:	CANNABIAN PHARMA SAS
Fecha de Ingreso:	2023-06-13	Cotización No.:	2023-8839
Muestra No.:	182487	Fecha de Expiración:	2023-09-06
Fecha de Fabricación:	2023-06-06	Fecha de Análisis:	2023-06-20
Tipo de Análisis:	Fisicoquímico/Microbiológico	Tipo de Estabilidad:	N.A.
Comentario (Muestra):	N.A.	Tiempo de Estabilidad:	N.A.

MÉTODO	ENSAYO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	CONCEPTO
Quasfar	Apariencia	Solución a base de aceite, color amarillo, olor característico a cannabis.	Resultado: Cumple Observación: Solución a base de aceite, color amarillo, olor característico a cannabis.	Cumple
Quasfar	Identificación de Cannabinoides (UHPLC)	El tiempo de retención de cada Cannabinoide en la muestra, corresponde al tiempo de retención de cada Cannabinoide en la solución del estándar.	Identificación THC-d9: Cumple Identificación THCA: Cumple Identificación CBD: Cumple Identificación CBDA: Cumple Identificación CBN: Cumple	Cumple
Quasfar	Valoración de CBD Total (UHPLC)	1.0% +/- 10% p/v 90.0% - 110.0%	M1 CBD (Conc): 0.6 % p/v M1 CBD (%): 99.9 % M2 CBD (Conc): 0.6 % p/v M2 CBD (%): 99.9 % Promedio CBD: 0.6 % p/v Promedio CBD (%): 99.9 % RSD CBD (%): 0.9 % M1 CBDA (Conc): 0.4 % p/v M2 CBDA (Conc): 0.5 % p/v Promedio CBDA: 0.5 % p/v Promedio CBDA (%): 0.0 % RSD CBDA (%): 1.4 % Total CBD (Conc): 1.0 % p/v Total CBD (%): 99.9 %	Cumple
Quasfar	Valoración de THC Total (UHPLC)	Menor de 1% en base seca	Promedio THCd9: 0.0 % p/v RSD THCd9 (%): 0.1 % Promedio THCA: 0.0 % p/v RSD THCA (%): 0.3 % Total THC (Conc): 0.0 % p/v	Cumple
Quasfar	Valoración de CBN (UHPLC)	Informativo	Promedio CBN: 0.00 % p/v	Cumple



Calle 45A #82-54 Torque
Empresarial San Cayetano 2
TÉL: 447 0047
Bogotá, D.C. - Colombia
www.quasfar.com.co

F1-IO-014
Revisión: 05

MÉTODO	ENSAYO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	CONCEPTO
Quasfar	Mesófilos aerobios	< 1000 UFC/g	Resultado: 20 UFC/g	Cumple
Quasfar	Hongos y Levaduras	< 100UFC/g	Resultado: <10 UFC/g	Cumple
Quasfar	Bacterias Gram Negativas Tolerantes a la Bilis	Ausente/g	Ausente/g Fecha Análisis: 2023-06-14 Fecha Lectura: 2023-06-20	Cumple
Quasfar	S.aureus	Ausente/g	Ausente/g	Cumple
Quasfar	E.coli	Ausente/g	Ausente/g	Cumple
Quasfar	Salmonella sp	Ausente/g	Ausente/g	Cumple
Quasfar	P.aeruginosa	Ausente/g	Ausente/g	Cumple

Concepto Final: LA MUESTRA ANALIZADA CUMPLE CON LAS ESPECIFICACIONES DEL LABORATORIO PROPIETARIO PARA LOS ENSAYOS REALIZADOS.

Anexos:

Se adjuntan las hojas de ruta (hojas de datos primarios de los análisis) las cuales hacen parte integral del presente informe en las que se puede verificar la trazabilidad de los estándares, reactivos, medios de cultivo, materiales de vidrio, equipos usados en cada uno de los análisis, así como las fechas de inicio de incubación y lecturas de los análisis microbiológicos; en caso que aplique (n).

Analista(s) Responsable(s): MANGARITA, NALVAREZ

Revisó / Aprobó:



Mercedes Ferrer

Director Técnico y de Estudios

Nuestros procesos analíticos están respaldados por Labware LIMS, sistema de información que sigue estricto cumplimiento de datos primarios, trazabilidad, integridad y seguridad de la información, cumpliendo con FDA CFR 21 parte 11.

Los resultados cuantitativos que se reportan en el Informe como cero (0.0) corresponden a seciales que se encuentran por debajo del límite de cuantificación o no se detectaron (L.L.Q. o I.L.D).

Este certificado no puede ser reproducido sin previa autorización escrita de la Dirección Técnica de Quasfar M&F S.A. Los resultados son válidos para la muestra analizada y no para otra de la misma procedencia.



Calle 45A #32-54 Parque Empresarial San Cayetano 2
FON: 447 0047
Bogotá, D.C. - Colombia
www.quasfar.com.co

F1-IO-014

10. REFERENCIAS

1. Francisca Medina Pontigo D, Daya Dra Sylvia Arrau Barra F, Marczuk Dyurich Flor Ortiz Rios Mish Castillo Vázquez M, Santisteban-Arenas RR, Andrés Cifuentes Sanabria Sara Lorena Rojas Jeidy Yuranny Valcárcel Peña C, EDITORIAL MVZ Cert Luis Fernando Martínez Cornejo D, et al. Estudio Preliminar De La Respuesta Clínica Al Tratamiento Con Extracto De Cannabis Sativa En Perros Con Epilepsia Refractaria Aosteoartritis Canina Y Analgesia Cannabinoide: Implementación Y Consideraciones. Remevet [Internet]. 2019;30-1. Available from: www.remevet.com,
2. Jhon J. Betancurt. Bases científicas del cannabis en Medicina Veterinaria. Remevet. 2020;
3. Hartsel JA, Boyar K, Pham A, Silver RJ, Makriyannis A. Cannabis in Veterinary Medicine: Cannabinoid Therapies for Animals. *Nutraceuticals in Veterinary Medicine*. 2019. 121-155 p.
4. Batalla A, Bos J, Postma A, Bossong MG. The Impact of Cannabidiol on Human Brain Function: A Systematic Review. Vol. 11, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
5. Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem Res*. 2005 Aug;30(8):1037-43.
6. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995 Jun 29;50(1):83-90.
7. Devane WA, Hanuš L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* (1979). 1992;258(5090):1946-9.
8. Russo EB, Jiang HE, Li X, Sutton A, Carboni A, Del Bianco F, et al. Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *J Exp Bot* [Internet]. 2008;59(15):4171-82. Available from: http://jxb.oxfordjournals.org/open_access.html
9. Janiak P, Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Pierre F, Gouraud L, et al. Blockade of cannabinoid CB₁ receptors improves renal function, metabolic profile, and increased survival of obese Zucker rats. *Kidney Int*. 2007;72(11):1345-57.
10. Roca AJ. Cannabis Medicinal. *Revista Medicina*. 2014;36(4):293-7.
11. Fundacion-canna.es. El sistema endocannabinoide. In: Madrid, editor. *El sistema endocannabinoide (sf)* . 2023.
12. Silver RJ. The Endocannabinoid System of Animals. *Animals*. 2019;9(9):686.
13. Maccarrone M. Metabolism of the endocannabinoid anandamide: Open questions after 25 years. *Front Mol Neurosci*. 2017 May 29;10:110-350.
14. Basavarajappa BS. Critical Enzymes Involved in Endocannabinoid Metabolism. *Bentham Science*. 2007;14(10.2174/092986607780090829):237-46.
15. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994;372(6507):686-91.
16. De Petrocellis L, Bisogno T, Maccarrone M, Davis JB, Finazzi-Agrò A, Di Marzo V. The Activity of Anandamide at Vanilloid VR₁ Receptors Requires Facilitated Transport across the Cell Membrane and Is Limited by Intracellular Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2001 Apr 20 [cited 2023 Apr 17];276(16):12856-63. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925819343959/fulltext>

17. Francois H, Lecru L. The Role of Cannabinoid Receptors in Renal Diseases. *Curr Med Chem*. 2018 Mar 16;25(7):793-801.
18. Honniball CI, Lucey PG, Li S, Shenoy S, Orlando TM, Hibbitts CA, et al. Molecular water detected on the sunlit Moon by SOFIA. *Nat Astron*. 2020;
19. Tsuboi K, Uyama T, Okamoto Y, Ueda N. Endocannabinoids and related N-acylethanolamines: Biological activities and metabolism Makoto Murakami. *Inflamm Regen*. 2018 Oct 1;38(1).
20. Haspula D, Clark MA. Cannabinoid receptors: An update on cell signaling, pathophysiological roles and therapeutic opportunities in neurological, cardiovascular, and inflammatory diseases. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 1;21(20):1-65.
21. Zhu Y, Wang DH. Segmental regulation of sodium and water excretion by TRPV1 activation in the kidney. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;51(5):437-42.
22. Dawidowicz AL, Olszowy-Tomczyk M, Typek R. CBG, CBD, Δ^9 -THC, CBN, CBGA, CBDA and Δ^9 -THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action. *Fitoterapia*. 2021 Jul 1;152:2-10.
23. Marzo V Di, Wang J. The Endocannabinoidome The World of Endocannabinoids and Related Mediators [Internet]. 2015. Available from: www.elsevier.com/permissions.
24. Ben-Cnaan E, Tam J, Permyakova A, Azar S, Hirsch S, Baraghithy S, et al. The Metabolic Efficacy of a Cannabidiolic Acid (CBDA) Derivative in Treating Diet-and Genetic-Induced Obesity. *Int J Mol Sci*. 2022 May 1;23(10).
25. de Almeida DL, Devi LA. Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. Vol. 8, *Pharmacology Research and Perspectives*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 1-10.
26. Sampaio LS, Taveira Da Silva R, Lima D, Sampaio CLC, Iannotti FA, Mazzarella E, et al. The endocannabinoid system in renal cells: Regulation of Na⁺ transport by CB1 receptors through distinct cell signalling pathways. *Br J Pharmacol*. 2015;172(19):4615-25.
27. Sampaio LS, Iannotti FA, Veneziani L, Borelli-Tôrres RT, De Maio F, Piscitelli F, et al. Experimental ischemia/reperfusion model impairs endocannabinoid signaling and Na⁺ + /K⁺ + ATPase expression and activity in kidney proximal tubule cells. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2018;154:482-91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.005>
28. Chua JT, Argueta DA, Dipatrizio N V., Kovesdy CP, Vaziri ND, Kalantar-Zadeh K, et al. Endocannabinoid System and the Kidneys: From Renal Physiology to Injury and Disease. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2019;4(1):10-20.
29. Meneton P, Ichikawa I, Inagami T, Schnermann J. Renal physiology of the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;278(3 47-3):339-51.
30. Ahmad A, Dempsey SK, Daneva Z, Li N, Poklis JL, Li PL, et al. Modulation of mean arterial pressure and diuresis by renomedullary infusion of a selective inhibitor of fatty acid amide hydrolase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;315(4):F967-76.
31. Rachel Cianciolo; Cathy Brown; Charles Mohr. Atlas of Renal Lesions in Proteinuric Dogs [Internet]. 2018. 1-337 p. Available from: <file:///C:/Users/Heidy/Downloads/Atlas-of-Renal-Lesions-in-Proteinuric-Dogs-1572364976.pdf>
32. Ansary TM, Fujisawa Y, Rahman A, Nakano D, Hitomi H, Kobara H, et al. Responses of renal hemodynamics and tubular functions to acute sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor administration in non-diabetic anesthetized rats /631/443/272/1684 /692/4022/272/1684 article. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1):1-9.
33. J Frey BA, Grisk O, Bandelow N, Wussow S, Bie P, Rettig R, et al. Sodium homeostasis in transplanted rats with a spontaneously hypertensive rat kidney. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* [Internet]. 2000;1099-104. Available from: <http://www.ajpregu.org>
34. Kawachi H, Suzuki K, Miyauchi N, Hashimoto T, Otaki Y, Shimizu F. Slit diaphragm dysfunction in proteinuric states: Identification of novel therapeutic targets for nephrotic

- syndrome. Vol. 13, *Clinical and Experimental Nephrology*. 2009. p. 275-80.
35. Zhang SY, Marlier A, Gribouval O, Gilbert T, Heidet L, Antignac C, et al. In vivo expression of podocyte slit diaphragm-associated proteins in nephrotic patients with NPHS2 mutation. *Kidney Int*. 2004;66(3):945-54.
 36. Patrakka J, Tryggvason K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May 21;396(1):164-9.
 37. Klein BG. Cunningham. *Fisiología Veterinaria* [Internet]. Cunningham. *Fisiología Veterinaria*. 2014. 0 p. Available from: <http://evolve.elsevier.com/Klein/physiology>
 38. Bartges Joe, Polzin DJ James. *Nephrology and urology of small animals*. Wiley-Blackwell; 2011. 904 p.
 39. Thomas Colville and Joanna M. Baassert. *Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians* [Internet]. 2016. Available from: <http://evolve.elsevier.com/Colville/APvettech/YOU'VEJUSTPURCHASED>
 40. Howard E. Evans P and A de LDP. *Miller's ANATOMY of the DOG fourth edition*. Vol. FOURTH EDITION, *Miller's Anatomy of the Dog*. 2012. 1-781 p.
 41. Delaney MA, Treuting PM. *Urinary System Cap. 16* [Internet]. *Comparative Anatomy and Histology*. Elsevier Inc.; 2018. 275-300 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00016-6>
 42. Bulger RE, Cronin RE, Dobyán DC. Survey of the Morphology of the Dog Kidney. *ANAT REC*. 1979;194:41-66.
 43. Gilbert EA, Barclay T, Schlieder JE, Quintana E V., Hord BJ, Kostov VB, et al. The First Habitable-zone Earth-sized Planet from TESS. I. Validation of the TOI-700 System. *Astron J* [Internet]. 2020 Aug 14;160(3):116. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.3847/1538-3881/aba4b2>
 44. Jr William J Bacha J and LMB. *COLOR ATLAS OF VETERINARY HISTOLOGY Third Edition*. New Jersey; 2017.
 45. Esquinas Castillo P. Estudio comparativo de glomerulopatías en caninos y en humanos: Una aproximación morfológica y molecular [Internet]. [Bogotá]: Universidad Nacional de Colombia; 2020 [cited 2022 Sep 8]. Available from: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/78368>
 46. Yasaman Pirahanchi; Rishita Jessu; Narothonama R. Aeddula. *Physiology, Sodium Potassium Pump*. In: StatPearls Publishing. 2023.
 47. Boron WF, David PN, Myers I, Scarpa Chairman A, Boulpaep EL. *Medical Physiology THIRD EDITION*. Vol. 3. 2016. 1-3292 p.
 48. Taub M. Gene level regulation of Na,K-ATPase in the renal proximal tubule is controlled by two independent but interacting regulatory mechanisms involving salt inducible kinase 1 and CREB-regulated transcriptional coactivators. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018. p. 2-20.
 49. Evaristo Mariela J, en Alberto Cedillo Cruz Omar Alberto Hernández Aguirre MC. DETERMINACIÓN DE URANIO Y TORIO EN ORINA POR ESPECTROMETRÍA DE MASA CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-MS). [Juarez Mexico]: UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DEL VALLE DE TOLUCA; 2017.
 50. Crocq MA. History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues Clin Neurosci*. 2020 Sep 1;22(3):223-8.
 51. Baron EP, Lucas P, Eades J, Hogue O. Patterns of medicinal cannabis use, strain analysis, and substitution effect among patients with migraine, headache, arthritis, and chronic pain in a medicinal cannabis cohort. *The Journal of Headache and Pain* [Internet]. 2018;2-28. Available from: <https://doi.org/10.1186/s10194-018-0862-2>
 52. Zou S, Kumar U. *Molecular Sciences Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System*. 2018; Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
 53. Jarvis S, Rassmussen S, Winters B. Role of the Endocannabinoid System and Medical

-
- Cannabis. *Journal for Nurse Practitioners*. 2017 Sep 1;13(8):525-31.
54. Perdija Ž, Chingwaru W, Setinc M, Zeman S, Mater Europaea -Ecm A, Perdija SZ, et al. The biochemistry of the endocannabinoid system Neonatal neurology View project Quantifying the risk of transmission of diarrhoeal pathogens from farm to fork View project Silvija Zeman Polytechnic of Medimurje in Čakovec THE BIOCHEMISTRY OF THE ENDOCANNABINOID SYSTEM [Internet]. 2020 Sep. Available from: <https://www.britannica.com/science/cell-membrane>
55. Ritter JK, Li G, Xia M, Boini K. Anandamide and its metabolites: What are their roles in the kidney? *Frontiers in Bioscience - Scholar*. 2016 Jun 1;8(2):264-77.
56. Arreaza G, Devane WA, Omeir RL, Sajnani G, Kunz J, Cravatt BF, et al. The cloned rat hydrolytic enzyme responsible for the breakdown of anandamide also catalyzes its formation via the condensation of arachidonic acid and ethanolamine. *Neurosci Lett*. 1997 Sep 26;234(1):59-62.
57. Possomato-Vieira, José S. and Khalil RAK. Anandamide and its metabolites: what are their roles in the kidney? *Physiol Behav*. 2016;176(12):139-48.
58. Pirone A, Lenzi C, Coli A, Giannessi E, Stornelli MR, Miragliotta V. Preferential epithelial expression of type-1 cannabinoid receptor (CB1R) in the developing canine embryo. *Springerplus*. 2015 Dec 1;4(1):1-7.
59. Park F, Potukuchi PK, Moradi H, Kovesdy CP. Cannabinoids and the kidney: Effects in health and disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;313(5):F1124-32.
60. Silva-Cardoso GK, Lazarini-Lopes W, Hallak JE, Crippa JA, Zuardi AW, Garcia-Cairasco N, et al. Cannabidiol effectively reverses mechanical and thermal allodynia, hyperalgesia, and anxious behaviors in a neuropathic pain model: Possible role of CB1 and TRPV1 receptors. *Neuropharmacology*. 2021 Oct 1;197.
61. Freundt-Revilla J, Kegler K, Baumgärtner W, Tipold A. Spatial distribution of cannabinoid receptor type 1 (CB1) in normal canine central and peripheral nervous system. *PLoS One*. 2017;12(7):1-21.
62. Martín Giménez VM, Noriega SE, Kassuha DE, Fuentes LB, Manucha W. Anandamide and endocannabinoid system: an attractive therapeutic approach for cardiovascular disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2018;12(7):177-90.
63. Hill MN, McLaughlin RJ, Morrish AC, Viau V, Floresco SB, Hillard CJ, et al. Suppression of amygdalar endocannabinoid signaling by stress contributes to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2009;34(13):2733-45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2009.114>
64. Hinden L, Tam J. Do endocannabinoids regulate glucose reabsorption in the kidney? *Nephron*. 2019;143(1):24-7.
65. Tam J. The emerging role of the endocannabinoid system in the pathogenesis and treatment of kidney diseases. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2016 May 1;27(3):267-76.
66. Simon GM, Cravatt BF. Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Apr 4;283(14):9341-9.
67. Al Banchaabouchi M, Marescau B, Possemiers I, D'Hooge R, Levillain O, De Deyn PP. N G,N G-Dimethylarginine and N G,N'G-dimethylarginine in renal insufficiency. *Pflugers Arch*. 2000 Mar;439(5):524-31.
68. Lim JC, Lim SK, Han HJ, Park SH. Cannabinoid receptor 1 mediates palmitic acid-induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress in human renal proximal tubular cells. *J Cell Physiol*. 2010;225(3):654-63.
69. Wade CE, Morey-Holton E. Alteration of renal function of rats following spaceflight. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1998;275(4 44-4):1058-65.
70. Brooks DP, Nambi P, Laping NJ, Olson BA, Pullen M, Wade CE. Renal vasopressin receptor expression and function in rats following spaceflight. *J Appl Physiol*. 2000;88(4):1316-20.

71. Larson G, Fuller DQ. The evolution of animal domestication. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 2014 Nov 23;45:115-36.
72. Udi S, Hinden L, Earley B, Drori A, Reuveni N, Hadar R, et al. Proximal tubular cannabinoid-1 receptor regulates obesity-induced CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017 Dec 1;28(12):3518-32.
73. Drori A, Permyakova A, Hadar R, Udi S, Nemirovski A, Tam J. Cannabinoid-1 receptor regulates mitochondrial dynamics and function in renal proximal tubular cells. *Diabetes Obes Metab*. 2019 Jan 1;21(1):146-59.
74. Udi S, Hinden L, Ahmad M, Drori A, Iyer MR, Cinar R, et al. Dual inhibition of cannabinoid CB1 receptor and inducible NOS attenuates obesity-induced chronic kidney disease. *Br J Pharmacol*. 2020 Jan 1;177(1):110-27.
75. Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB 1 and CB 2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol*. 2007 Mar;150(5):613-23.
76. Celorrio M, Rojo-Bustamante E, Fernández-Suárez D, Sáez E, Estella-Hermoso de Mendoza A, Müller CE, et al. GPR55: A therapeutic target for Parkinson's disease? *Neuropharmacology*. 2017 Oct 1;125:319-32.
77. Bisogno T, Hanuš L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: Effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol*. 2001;134(4):845-52.
78. Esposito G, Scuderi C, Valenza M, Togna GI, Latina V, de Filippis D, et al. Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. *PLoS One*. 2011 Dec 5;6(12).
79. Seeman P. Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose. *Transl Psychiatry*. 2016;6(10):1-4.
80. Gonca E, Darici F. The Effect of Cannabidiol on ischemia/reperfusion-induced ventricular arrhythmias: The role of adenosine a1 receptors. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2015 Jan 12;20(1):76-83.
81. Kathmann M, Flau K, Redmer A, Tränkle C, Schlicker E. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2006 Feb;372(5):354-61.
82. Ghovanloo MR, Shuart NG, Mezeyova J, Dean RA, Ruben PC, Goodchild SJ. Inhibitory effects of cannabidiol on voltage-dependent sodium currents. *Journal of Biological Chemistry*. 2019 Oct 26;293(43):16546-58.
83. Malik S. Financial-integration thresholds for consumption risk-sharing. *International Review of Economics and Finance*. 2015 Jul 1;38:73-93.
84. Castaño Bilbao I, Roblero FS, García-Fernández N. Estudios de función renal: función glomerular y tubular. *Análisis de la orina*. 2009.
85. Jaime Pérez Loredó CAL. TASA DE FILTRACION GLOMERULAR MEDIDA y ESTIMADA. NUMEROSOS MÉTODOS DE MEDICIÓN. *nefrología diálisis y trasplante*. 2015;35:153-64.
86. Fu Q, Colgan SP, Shelley CS. Hypoxia: The force that drives chronic Kidney disease. Vol. 14, *Clinical Medicine and Research*. Marshfield Clinic; 2016. p. 15-39.
87. Keppler A, Gretz N, Schmidt R, Kloetzer HM, Groene HJ, Lelongt B, et al. Plasma creatinine determination in mice and rats: An enzymatic method compares favorably with a high-performance liquid chromatography assay. *Kidney Int*. 2007 Jan;71(1):74-8.
88. Stevens LA, Levey AS. Measurement of kidney function. Vol. 89, *Medical Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2005. p. 457-73.
89. Mullens W, Damman K, Testani JM, Martens P, Mueller C, Lassus J, et al. Evaluation of kidney function throughout the heart failure trajectory-a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail*. 2020;22:584-

- 603.
90. DANUM - Instrumental Analysis. <https://danum74.wordpress.com/2014/05/15/Espectroscopia-De-Masas-2/>. 2014. ESPECTROMETRIA DE MASAS .
 91. Goldberg ME. A look at chronic pain in dogs. *Veterinary Nursing Journal* [Internet]. 2017;32(2):37-44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/17415349.2016.1262217>
 92. Zadik-Weiss L, Ritter S, Hermush V, Asher N, Avital A, Or R. Feline cognitive dysfunction as a model for Alzheimer's disease in the research of CBD as a potential treatment—a narrative review. *J Cannabis Res*. 2020;2(1):0-5.
 93. Freundt-Revilla J, Heinrich F, Zoerner A, Gesell F, Beyerbach M, Shamir M, et al. The endocannabinoid system in canine steroid-responsive meningitis-arteritis and intraspinal spirocercosis. *PLoS One*. 2018 Feb 1;13(2).
 94. Kogan LR, Hellyer PW, Silcox S, Schoenfeld-Tacher R. Canadian dog owners' use and perceptions of cannabis products. *Canadian Veterinary Journal*. 2019;60(7):749-55.
 95. Barutta F, Bruno G, Mastrocola R, Bellini S, Gruden G. The role of cannabinoid signaling in acute and chronic kidney diseases. *Kidney Int* [Internet]. 2018;94(2):252-8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085253818301406>
 96. Barutta F, Corbelli A, Mastrocola R, Gambino R, Marzo V Di, Pinach S, et al. Cannabinoid receptor 1 blockade ameliorates albuminuria in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2010 Apr;59(4):1046-54.
 97. Dao M, François H. Cannabinoid Receptor 1 Inhibition in Chronic Kidney Disease: A New Therapeutic Toolbox. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Jul 7;12:830.
 98. Peres LAB, Cunha Júnior AD Da, Schäfer AJ, Silva AL Da, Gaspar AD, Scarpari DF, et al. Renal biomarkers of male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) undergoing renal. *J Bras Nefrol* [Internet]. 2013;35(3):277-88. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/01012800.20130001%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24100743>
 99. Corsetti S, Borruso S, Malandrucchio L, Spallucci V, Maragliano L, Perino R, et al. Cannabis sativa L. may reduce aggressive behaviour towards humans in shelter dogs. *Scientific Reports* | [Internet]. 2021;11:2773. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82439-2>
 100. Del-Angel-Caraza J, Quijano-Hernández IA, Soriano-Vargas E, Barbosa-Mireles MA, Martínez-Castañeda JS. Urinary bladder worm (*Pearsonema* sp.) infection in domestic dogs and cats in Mexico at a high altitude. *Parasitol Res*. 2018 Jun 1;117(6):1979-83.
 101. D. Caroline Coile. Cannabis and CBD Science for Dogs: Natural Supplements to Support Healthy Living and Graceful Aging. ilustrada. 2013. 1-94 p.
 102. Hložek T, Uttl L, Kadeřábek L, Balíková M, Lhotková E, Horsley RR, et al. Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC+CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC. *European Neuropsychopharmacology*. 2017 Dec 1;27(12):1223-37.
 103. Kurien BT, Everds NE, Scofield & RH. Experimental animal urine collection: a review. *Laboratory Animals Ltd*. 2004;38:333-61.
 104. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother* [Internet]. 2013 [cited 2022 Oct 26];4(4):303-303. Available from: http://www.3rs-reduction.co.uk/html/6__power_and_sample_size.html,<http://www.acuc.berkeley.edu/http://www.bu.edu/orcccommittees/iacuc/policies-and-guidelines/sample-size-calculations/>,<http://www.ucd.ie/researchethics/etc>.
 105. Acosta Murillo NR. Modelo murino comparativo pediátrico de injuria renal aguda isquémica y descripción histopatológica en tres grupos etarios. [Bogota]: Universidad Nacional de Colombia ; 2016.

106. Larrinaga G, Varona A, Pérez I, Sanz B, Ugalde A, Cándenas ML, et al. Expression of cannabinoid receptors in human kidney. *Histol Histopathol.* 2010 Sep;25(9):1133-8.
107. Jenkin KA, McAinch AJ, Grinfeld E, Hryciw DH. Role for cannabinoid receptors in human proximal tubular hypertrophy. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2010;26(6):879-86.
108. Jasionek G, Drummond SE, Brett O, Lucking EF, Abdulla MA, O KD. Renal cortical oxygen tension is decreased following exposure to long-term but not short-term intermittent hypoxia in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol [Internet].* 2019;316:635-45. Available from: <http://www.ajprenal.org>
109. Filipiuc LE, Ștefănescu R, Solcan C, Ciorpac M, Szilagyi A, Cojocaru D, et al. Acute Toxicity and Pharmacokinetic Profile of an EU-GMP-Certified Cannabis sativa L. in Rodents. *Pharmaceuticals.* 2023 May 1;16(5):1-21.
110. Ambrus L, Kelemen B, Szabó T, Bíró T, Tóth BI. Human podocytes express functional thermosensitive TRPV channels. *Br J Pharmacol.* 2017 Dec 1;174(23):4493-507.
111. Taub M, Garamella S, Kim D, Rajkhowa T, Cutuli F. Renal proximal tubule Na,K-ATPase is controlled by CREB-regulated transcriptional coactivators as well as salt-inducible kinase 1. *Cell Signal.* 2015 Dec 1;27(12):2568-78.
112. Li J, Wang DH. Role of TRPV1 channels in renal haemodynamics and function in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Exp Physiol.* 2008;93(8):945-53.
113. Golosova D, Levchenko V, Kravtsova O, Palygin O, Staruschenko A. Acute and long-term effects of cannabinoids on hypertension and kidney injury. *Sci Rep.* 2022 Dec 1;12(1):1-12.