

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE ENDOCANABINOIDES
SOBRE UNA TAREA DE APRENDIZAJE EN RATAS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CONSTANZA ROMERO GARCÍA

Director de tesis:
DR. OSCAR PROSPÉRO GARCÍA

Ciudad Universitaria, Noviembre de 2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Romero
García
Constanza
(777) 323 50 64
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
400070962

2. Datos del tutor

Dr
Oscar
Prospéro
García

3. Datos del sinodal 1

Dr
Christian Humberto
Guerra
Araiza

4. Datos del sinodal 2

M en C
Mariana
Gutiérrez
Mariscal

5. Datos del sinodal 3

Dr
Gerardo
Rivas
Lechuga

6. Datos del sinodal 4

Biol
José Aquiles
Bernal
Moreno

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la administración crónica de endocannabinoides
sobre una tarea de aprendizaje en ratas
77 p
2008

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis dos grandes amores en la vida: Alejandro y Sebastián... con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

A papá por tu apoyo, tu confianza, paciencia y respeto en mis decisiones profesionales. Por tu apoyo económico y moral en el arduo y hermoso camino de la licenciatura.

A mamá por tu confianza y tu respeto. Por tu apoyo incondicional, gracias por creer en mí siempre.

A Alejandro, mi compañero, mi guía, por todo tu amor, tú entrega, tus fuerzas, tus porras, tu confianza, tu valor, y todo tu apoyo para que pudiera culminar este trabajo. Gracias por ser el hombre tan maravilloso que eres, porque mi amor por ti me ha llevado hasta donde estoy y por seguir compartiendo el camino de la vida. Te amo.

A mi hijo Sebastián, por ver tus ojos cada día que despierto y por esa sonrisa tan maravillosa que me llena todita el alma, por tu inmensa luz, por el ser tan especial que eres, por todo lo que me has enseñado y por el impulso a ser cada día una mejor persona. Por esta grandísima oportunidad y enorme felicidad de ser tu mamá, por lo que hemos vivido unidos y lo que nos falta por vivir.

A Granny, donde quiera que estés, por tus enseñanzas sobre las matemáticas y la vida, por tu claro de luna, tu calidez... siempre te recordaré Grannita.

A mis tíos y padrinos Carlos Esquinca y Ana García, por saber que cuento son ellos siempre, gracias Ana por la orientación académica cuando la necesité.

A mis tíos y padrinos Pablo y Rosy, por el apoyo brindado en estos años de estudiante, por todas las comidas, lavadas y apapachadas.

A mi tía Bárbara por su amor, su calidez y sus enseñanzas, y también por la lavandería, comidas, y demás ayudas... pero sobre todo por sus grandiosas enseñanzas.

A mis tías Constanza y Norah, por el apoyo que sentí y por todas sus porras.

A Ana Paula y Samari por brindarme siempre un hogar y una sonrisa.

A Nicolás, por incursionar dentro de la familia en el maravilloso camino de la Biología, por la inspiración que causó en mí hacia esta carrera, y por todo el amor que he sentido siempre hacia él y su familia.

A todas las personas que de alguna manera me apoyaron a lo largo de mi carrera, a Violeta y sus padres Arturo y Flor por todo el tiempo de apoyo en el departamento de Copilco.

A María Luisa, donde quiera que estés, por todo lo vivido juntas y por lo que nos faltó.

A Violeta, Fabiola, Lucero, Isadora, Larisa, Leika, Ángel, Ivonne.

A los grandes amigos que estuvieron conmigo en los momentos adversos y en los más felices, Lakshmi, Conrado, Alejandra, Lalo Nájera, Aezandra, gracias por su amistad.

Quiero hacer un agradecimiento muy especial a Khalil Guzmán, quien me apoyó en la cirugía de las ratas que utilicé en este experimento, sin su ayuda no hubiera logrado nada. A la señora Marina Cisneros por su ayuda y grata compañía dentro del laboratorio.

Agradezco también a mi director de tesis, el Dr. Oscar Prospéro y a mis sinodales por la revisión de este trabajo y sus valiosos comentarios, al Dr. Christian Guerra, la M. en C. Mariana Gutiérrez, al Dr. Gerardo Rivas y al Biól. Aquiles Bernal.

Finalmente quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser fuente de inspiración académica, recreativa, cultural... por sus jardines y árboles, sus pasillos, su gente, y en especial a la Facultad de Ciencias por los años tan bien vividos entre sus muros y jardines.

A aquellos profesores que se la rifaron dando clases, inspirados e inspirando, entusiasmados y entusiasmado, a todos aquellos que dejan su alma en el aula en cada cátedra, que se desviven en el campo por transmitir la pasión que llevan el conocimiento y descubrimiento del estudio de la vida en todas sus formas... a los profesores que creen en sus alumnos...

GOOYAAAA!!! UNIVERSIDAAAAD!!!!

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	7
2. Marco Teórico	9
2.1. Canabinoides	9
2.1.1. <i>Receptores a canabinoides</i>	11
2.1.2. <i>Canabinoides endógenos</i>	11
2.1.3. <i>Sistema canabinérgico</i>	12
2.1.3.1. <i>Síntesis y degradación de endocannabinoides</i>	14
2.2. Memoria y aprendizaje	15
2.2.1. <i>Memoria de corto y de largo plazo</i>	18
2.2.2. <i>Almacenamiento de la información</i>	19
2.2.3. <i>Consolidación</i>	20
2.3. Canabinoides y memoria	21
2.3.1. <i>Efectos de la marihuana en la memoria</i>	21
2.3.2. <i>Bases electrofisiológicas de la acción de los canabinoides en la memoria</i>	24
2.4. Administración crónica de canabinoides	25
2.4.1. <i>Administración crónica y tolerancia</i>	25
2.4.2. <i>Administración crónica y abstinencia</i>	29
2.4.3. <i>Estudios con humanos</i>	31
3. Justificación	35
4. Hipótesis y Objetivos	39
4.1. <i>Hipótesis</i>	39
4.2. <i>Objetivos</i>	39
4.2.1. <i>Objetivos particulares</i>	39
5. Material y Método	39
5.1. <i>Laberinto de Barnes</i>	40
5.1.1. <i>Evaluación del laberinto</i>	41
5.2. <i>Administración de anandamida y oleamida</i>	43

5.3. Control motor y peso	43
5.4. Análisis Estadístico	44
6. Resultados	45
6.1. GRUPOS ENTRENADOS EN FASE DE LUZ	
6.1.1. Tiempo de resolución en laberinto de Barnes fase de luz	45
6.1.2. Errores en laberinto de Barnes fase de luz	46
6.1.3. Perseverancias en laberinto de Barnes fase de luz	48
6.2. GRUPOS ENTRENADOS EN FASE DE OSCURIDAD	
6.2.1. Tiempo de resolución en laberinto de Barnes fase de oscuridad	49
6.2.2. Errores en laberinto de Barnes fase de oscuridad	50
6.2.3. Perseverancias en laberinto de Barnes fase de oscuridad	52
6.3. Incremento de peso y control motor	54
6.4. Estrategias de resolución para el laberinto de Barnes	58
6.4.1. Dependencia de las estrategias respecto al tiempo y al tratamiento	58
6.4.2. Análisis de las estrategias utilizadas en la resolución del laberinto de Barnes	60
6.4.2.1. Estrategia aleatoria, fase de luz	60
6.4.2.2. Estrategia serial, fase de luz	61
6.4.2.3. Estrategia espacial, fase de luz	62
6.4.2.4. Estrategia aleatoria, fase de oscuridad	63
6.4.2.5. Estrategia serial, fase de oscuridad	64
6.4.2.6. Estrategia espacial, fase de oscuridad	65
7. Discusión y conclusiones	67
8. Apéndice	72
9. Referencias	73

RESUMEN

La historia refiere que la marihuana se ha usado con fines medicinales y recreativos por diferentes culturas. Hoy ocupa un lugar importante dentro de las drogas ilegales de abuso más consumidas. Entre los síntomas que reportan los usuarios se encuentra una disminución en el control motor, una disminución en la percepción al dolor, alteraciones en el sueño, aumento en la ingestión de alimento y un deterioro en la memoria a corto plazo, entre otros. Su estudio cobró gran interés por un lado, gracias a sus propiedades analgésicas, antieméticas y ansiolíticas¹, sobre todo para poder utilizarla con fines terapéuticos y tratando de evitar sus efectos adversos en la memoria. Mientras que por otro lado ha causado una gran controversia la fármaco dependencia que ésta ejerce en los usuarios.

A pesar de que está ampliamente reportado el deterioro que causa la marihuana en la memoria de corto plazo, aun se desconocen con precisión los mecanismos que intervienen en este proceso. Además, se ha reportado que tanto humanos como animales que han estado expuestos a la droga por tiempo prolongado, desarrollan tolerancia a los efectos perjudiciales que ésta causa en la memoria.

Aunque existen más de 60 cannabinoides en la marihuana, el principio activo más estudiado es el Δ^9 -THC, el cual ejerce sus efectos a través del receptor a cannabinoides CB1. El CB1 se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central de mamíferos, especialmente en estructuras involucradas con el aprendizaje y la memoria como la corteza prefrontal, el hipocampo, el núcleo estriado, la amígdala y el cerebelo, entre otras.

El propósito de este trabajo es determinar si la administración crónica de cannabinoides altera el aprendizaje² en ratas. En esta investigación evaluamos el aprendizaje de ratas después de haber sido administradas crónicamente (durante 15 días) con los endocannabinoides anandamida (ANA) y oleamida (OLE) usando un paradigma conductual llamado laberinto de Barnes.

En el laberinto de Barnes se evalúa por un lado la curva de aprendizaje de las ratas (tiempo, número de errores y perseverancias, que algunos autores también llaman “cantidad de la respuesta”) y por el otro lado se evalúa la estrategia utilizada, que es la forma que usan las ratas para resolver el laberinto y puede ser aleatoria, serial o espacial. Esta estrategia refleja la agudeza de la respuesta también llamada “calidad de la respuesta”. Además, el número de perseverancias es un marcador conductual de la memoria de trabajo de la rata.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que no existe una alteración en el aprendizaje de las ratas dada por una administración crónica de endocannabinoides.

¹ Un ansiolítico o tranquilizante menor, es un fármaco con acción depresora del sistema nervioso central, destinado a disminuir o eliminar los síntomas de la ansiedad. Algunos de los más conocidos son taquicardia, sensación de ahogo, insomnio, terrores nocturnos, sensación de pérdida del conocimiento, etc (<http://es.wikipedia.org>).

² Entendiendo a la memoria como parte intrínseca del aprendizaje (vease definición pág. 11).

ABSTRACT

Marijuana has been used with recreational and medicinal purposes by different civilizations throughout history. Now a day is one of the most popular illegal drugs used worldwide. Among the symptoms that marijuana users report are a decrease in motor response, diminution in pain perception; several sleep alterations, increase in feeding behavior and an important short-term memory impairment. However, the increase of research in cannabinoid study is in one sense because of the dependence chronic users develop to it and on the other hand due to its analgesic, anti-emetic and sedative properties, which would like to be used as benefic therapeutic properties without the adverse effects that cause cannabis on memory.

Although it is known that cannabinoids impair memory processes, the mechanisms by which they cause such an effect are not completely understood. With all, there are reports indicating that human and animal subjects develop tolerance to these effects upon a prolonged period of exposure.

The most known active principle of marijuana is Δ^9 -THC, which acts by binding to the CB1 receptor. CB1 receptor is widely distributed in the central nervous system of mammals, particularly in structures involved in learning and memory like prefrontal cortex, hippocampus, striatum, amygdala and cerebellum.

The aim of the present work was to determine if cannabinoid chronic administration, using endogenous cannabinoid ligands, alters learning and memory in rats. We evaluated learning behavior in rats using the Barnes maze after anandamide (ANA) and oleamide (OLE) chronic treatment.

The Barnes maze allows to measure learning curves by quantifying the time rats spent solving the task, the number of errors and perseverance, defined as the number of times a rat makes the same mistake more than once. The quality of the response, which is the accuracy of the rats to perform the test, and it is measured as the type of strategy they use to solve the maze. There are three possible strategies to solve it: the random, the serial and the spatial. By measuring perseverance, it is also possible to evaluate working memory.

Our results suggest that there is no alteration in learning and memory as a consequence of the chronic endocannabinoid administration.

1. INTRODUCCIÓN

Además de las sensaciones de placer que provoca la marihuana (*Cannabis sativa*) en los usuarios que la consumen, ésta es una planta que cuenta con diversos efectos terapéuticos. Se ha usado a lo largo del tiempo como anestésico menor, tranquilizante, inductor de sueño y para aumentar el apetito, entre otros. Y aunque sus efectos y síntomas sean bien conocidos, es reciente el descubrimiento de las vías a través de las cuales actúa, y aun queda mucho por saber.

Se han encontrado más de 60 sustancias en la planta de marihuana, una de ellas, la más estudiada pues se ha demostrado que es la que provoca la mayoría de los síntomas que se reportan, es el Δ^9 -tetrahidrocanabinol, mejor conocido como Δ^9 -THC. Con el Δ^9 -THC se han realizado muchos experimentos en animales de laboratorio como ratas y monos para observar sus efectos, entre los que podemos mencionar: disminución en la temperatura corporal, analgesia, relajamiento generalizado, sueño, disminución en el control motor (se mueven menos o más lento), aumento en el apetito sexual y en la ingesta de alimento, entre otros. Además, también está ampliamente reportado tanto en humanos como en animales que están bajo los efectos de la droga, un deterioro en la memoria a corto plazo.

Dentro de los efectos que ejerce la marihuana sobre el organismo, podríamos dividirlos en dos grupos: aquellos que son benéficos para el sujeto, es decir, que podrían tener un uso terapéutico (por ejemplo: la analgesia en enfermos que sufren de enfermedades muy dolorosas, disminución de la presión intraocular en los casos de glaucoma, ansiolítico en personas que sufren ansiedad, antiemético en pacientes con cáncer que se han sometido a quimioterapias, etcétera) y aquellos que son negativos o perjudiciales para el organismo, como lo sería el deterioro que causa en la memoria, la depresión del sistema inmunológico y la adicción que ésta puede desencadenar en los usuarios que la consumen de manera frecuente.

En este trabajo se pretende ahondar en el aspecto negativo que tiene la marihuana sobre la memoria. Debido a que el estudio de la memoria es muy extenso, nosotros nos enfocamos a estudiar la memoria espacial, la memoria de procedimiento y la memoria de trabajo que utilizan las ratas de laboratorio al resolver una prueba llamada Laberinto de Barnes. Así que primero investigamos en la literatura cómo se da este déficit de la memoria tanto en humanos como en animales de experimentación, y nos encontramos que la mayoría de las investigaciones ahondan en el efecto agudo o inmediato de la marihuana, en particular el Δ^9 -THC, sobre la memoria del sujeto, es decir, cómo se afecta la memoria en aquellos que se encuentran bajo los efectos de la marihuana.

Sin embargo, no está de la misma manera reportado cómo afecta la marihuana una vez que ha pasado el efecto de su consumo, es decir, algunas horas después de que se administró, y tampoco si hay efectos secundarios sobre la memoria una vez que se ha consumido durante mucho tiempo.

El receptor al que se une el Δ^9 -THC en el cerebro se llama CB1 y está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central de mamíferos, en particular, se ha estudiado en la rata y se ha visto que se encuentra principalmente en los ganglios basales, el núcleo estriado, el hipocampo, la sustancia negra, el cerebelo y la corteza prefrontal.

Además del CB1, existe otro receptor, el CB2, que se encuentra en el sistema nervioso periférico y el sistema inmunológico. A éste receptor se le atribuyen los síntomas periféricos que produce el consumo de Δ^9 -THC.

Por otro lado, se han descubierto sustancias que el cerebro sintetiza las cuales se unen al CB1, llamadas endocannabinoides. Los endocannabinoides son moléculas de naturaleza lipídica, que se encuentran tanto en el cerebro, como en otros tejidos de mamíferos, como el intestino, el páncreas, el bazo, y el sistema inmunológico. Los endocannabinoides que se han descrito hasta ahora son la anandamida (ANA), la oleamida (OLE) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG).

Existen agonistas y antagonistas sintéticos del receptor a cannabinoides (CB1), que se usan para conocer más la función del sistema canabinérgico, así como se utilizan los endocannabinoides en modelos de experimentación para conocer más sobre sus efectos en el sistema nervioso y para asemejar la administración de Δ^9 -THC.

El objetivo de este trabajo es conocer cómo realizan una tarea de memoria ratas que han estado bajo la administración constante de dos endocannabinoides: anandamida y oleamida, y compararlas contra ratas que nunca recibieron dosis de fármaco y otras a las que se les administró únicamente vehículo. Porque a pesar de que el deterioro en la memoria dado por la administración del Δ^9 -THC ha sido estudiado, aun se desconoce si es pasajero y posteriormente el sistema restituye el equilibrio sin encontrar un daño permanente en la memoria, o si efectivamente el sistema es vulnerable y presenta secuelas o daños permanentes debidos a la exposición a la droga.

2. MARCO TEÓRICO

La marihuana (*Cannabis sativa*) ha sido utilizada a través de la historia por diversas culturas, tanto con fines recreativos como medicinales. En la actualidad, es la droga ilegal de abuso más consumida por la población mundial. La investigación sobre sus efectos psicoestimulantes tiene sus inicios en el siglo XIX. Sin embargo, tomó muchos años aislar la molécula responsable de estos efectos, debido a su naturaleza lipídica difícil de purificar. En los años 40, Lord Todd en Inglaterra y Roger Adams en los Estados Unidos, aislaron de manera independiente el canabinol, y el canabidiol. El primero es un constituyente psicoactivo muy débil, y el segundo es inactivo (Mechoulam et al, 1998). Fue entre 1963 y 1964 cuando el grupo de Raphael Mechoulam logró aislar y caracterizar junto con otros cannabinoles, uno de los principales constituyentes activos de la marihuana, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC). Entre los efectos que produce el Δ^9 -THC se encuentran: disminución en la temperatura corporal, distorsión en la percepción del tiempo, disminución en la locomoción espontánea, antinocicepción, analgesia y catalepsia, además de producir trastornos en la memoria y el aprendizaje. Entre los efectos reforzantes que reportan los usuarios que la consumen se encuentra que induce una gran relajación en el organismo, al grado de producir hilaridad (que algunos califican de “incontrolable”) y por lo tanto un estado altamente placentero; también puede inducir sueño, potencia el sabor de los alimentos y aumenta el deseo sexual (Prospéro-García, et al, 2004). Además se reportan cambios en la agudeza sensorial, aumento en la frecuencia cardiaca, enrojecimiento de los ojos y sequedad de boca y garganta.

2.1. Canabinoides

2.1.1. Receptores a canabinoides

Una vez aislado y caracterizado el Δ^9 -THC, faltaba encontrar la vía a través de la cual interviene en los procesos de señalización del sistema nervioso. Es decir, un receptor sobre el que actuara. Después de treinta años, encontraron el receptor al que se une el Δ^9 -THC (Devane, 1988). Matsuda et al. en 1990 y Gerard et al. en 1991, clonaron el gen y caracterizaron el receptor a

canabinoides CB1. El receptor CB1 está compuesto por siete dominios transmembranales y se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro de mamíferos (los experimentos se realizaron en rata y en humano, y se sabe que es un receptor muy conservado filogenéticamente). Tiempo después se identificó un segundo receptor a canabinoides CB2, encontrado en tejidos periféricos, incluyendo células del sistema inmunológico (Munro, 1993). El CB2 comparte una homología con el CB1 de tan sólo el 44% (Mechoulam, 1998). Ambos receptores están acoplados a proteínas G inhibitoras.

El CB1 se distribuye de manera preferencial en el sistema nervioso central (Martin et al., 1999), particularmente en la corteza, el cerebelo y los núcleos basales. En estos últimos hay una gran densidad en las proyecciones del estriado hacia el globo pálido y la sustancia negra (Martin et al., 1999). Aquí, las neuronas que contienen CB1 son GABAérgicas y los receptores presinápticos (Martin et al., 1999). En cambio en el cerebelo, las neuronas que expresan CB1 son glutamatérgicas (Martin et al., 1999). Además, se ha observado una gran densidad de CB1 en la regiones del hipocampo CA1, CA3 y giro dentado (Sullivan, 2000) (Fig. 1).

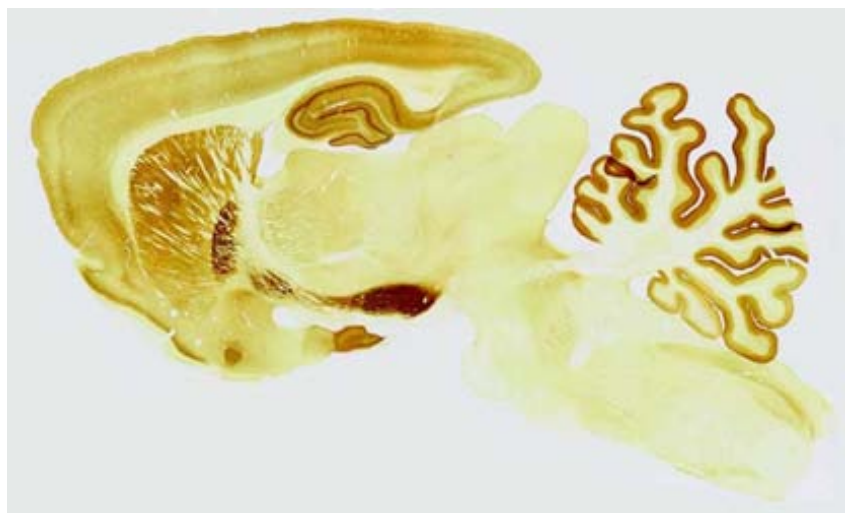


Figura 1. Inmunohistoquímica que muestra la distribución del CB1 en un corte sagital de cerebro de rata (Martínez-Vargas, 2003).

En el hipocampo, el CB1 se localiza de manera presináptica en un subconjunto de interneuronas que forman sinapsis con las neuronas piramidales (Kreitzer et al, 2002). Su presencia en esta estructura aporta bases

anatómicas que sugieren el efecto directo de los cannabinoides en la misma, pues alteran procesos de memoria y aprendizaje (Sullivan, 2000).

Por otro lado, en el tallo cerebral y la médula espinal la densidad del CB1 es baja (Martin et al., 1999). También se ha encontrado CB1 en tejidos periféricos como el intestino delgado del cuyo, en testículos, vejiga, útero y embrión de ratón; en esperma de erizo de mar y en linfocitos B (Martin et al., 1999).

2.1.2. *Canabinoides Endógenos*

La presencia del CB1 -en el sistema nervioso central- y del CB2 -en el sistema nervioso periférico- sugería la existencia de moléculas endógenas capaces de actuar a través de estos receptores, ejerciendo una función hasta entonces desconocida. Posterior a la caracterización de estos receptores, se extrajo de cerebro de cerdo una sustancia con afinidad parecida a la que tiene el Δ^9 -THC por estos receptores, una amida del ácido araquidónico llamada N-araquidonil-etanolamida, a la que más tarde nombraron **anandamida**, de “ananda” que en sánscrito significa “dicha” (Devane et al., 1992).

Así como la anandamida (ANA), se han caracterizado otros endocannabinoides, como el **2-araquidonilglicerol** (2-AG), identificado en bazo, tracto digestivo de perro y páncreas, además del cerebro (Mechoulam, 1995). Tanto el 2-AG como la ANA tienen afinidad por el CB1 y el CB2 (Martin, 1999). Se encontró que ambos ligandos tienen una afinidad por el receptor a cannabinoides esencialmente idéntica a la del Δ^9 -THC (Mechoulam et al., 1998, Martin et al., 1999).

Otro de los endocannabinoides es la **oleamida** (OLE). Este es un lípido que se aisló del líquido cefalorraquídeo de gatos privados de sueño, el cual se ha descrito como factor inductor de sueño en ratas (Cravatt et al., 1995). Además de unirse a los receptores a cannabinoides, la oleamida afecta la respuesta inmunológica (Langstein et al., 1996) y es degradada por la FAAH¹ (amida hidrolasa de ácidos grasos), la enzima que degrada a la anandamida (Cravatt et al., 1996). Además, el efecto de inducir sueño que provoca la

¹ Por sus siglas en inglés: Fatty Acid Amide Hydrolase.

oleamida es bloqueado por el antagonista del CB1, el SR141716A (Mendelson y Basile, 1999).

Los endocannabinoides no se almacenan en vesículas como los neurotransmisores clásicos, sino que son rápidamente sintetizados por las neuronas en respuesta a una despolarización y un consecuente flujo de calcio hacia el interior de éstas (Di Marzo y Piomelli, 1998).

2.1.3. Sistema Canabinérgico

El CB1 se localiza en axones y terminales nerviosas, lo cual señala que es presináptico y por lo tanto modula la liberación de neurotransmisores. Se considera al CB1 como el receptor acoplado a proteínas G más abundante en el cerebro de mamíferos, y su presencia en la neocorteza, el hipocampo, los ganglios de la base, el cerebelo y el tallo cerebral explica las acciones que ejercen las drogas canabinoides en la conducta (Piomelli, 2003). Los síntomas típicos en los roedores por intoxicación de canabinoides son: hipotermia, analgesia y disminución en la actividad motora (Adams et al., 1996) los cuales desaparecen en ratones knockout del gen *cb1* (Ledent et al., 1999 y Zimmer et al., 1999).

El CB1 es un receptor acoplado a proteínas $G_{i/o}$ y puede iniciar eventos de señalización, que incluyen el cierre de canales de Ca^{2+} , abertura de canales de K^+ , inhibición de la actividad de adenilato ciclasa (con su consecuente disminución de la concentración citosólica de AMPc) y la estimulación de cinasas que fosforilan residuos de tirosina, serina y treonina. Cada uno de estos mecanismos parece cumplir diferentes funciones al traducir la ocupación del receptor CB1 a respuestas biológicas (Piomelli, 2003).

En la señalización retrógrada por endocannabinoides, tanto en las interneuronas inhibitoras del hipocampo como en las células de Purkinje del cerebelo, la despolarización en la célula postsináptica abre canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje; el Ca^{2+} postsináptico activa enzimas que sintetizan endocannabinoides a partir de precursores lipídicos (Wilson y Nicoll, 2002). Estos endocannabinoides viajan al axón presináptico en donde se unen a un receptor CB1 a través del cual la activación de proteínas G inhibe directamente

el flujo de calcio hacia el interior del axón presináptico, disminuyendo así la probabilidad de liberación de una vesícula de neurotransmisor.

Al estudiar las células de Purkinje en el cerebelo y las células piramidales en el hipocampo, se ha mostrado que una pequeña despolarización² de una neurona puede suprimir de manera transitoria los eventos sinápticos de la inhibición GABAérgica en esa célula. A este fenómeno se le llamó “supresión de la inhibición inducida por despolarización”, o DSI (por sus siglas en inglés) (Marty, 1991 y Alger, 1992). Se demostró que la DSI tiene un locus presináptico aunque su origen sea postsináptico, lo cual quiere decir que la despolarización postsináptica debe liberar un mensajero retrógrado que viaja de manera inversa a través de la sinapsis para suprimir la liberación del neurotransmisor de los axones (Wilson y Nicoll, 2002).

Además de suprimir las sinapsis inhibitorias, la despolarización postsináptica puede modular las sinapsis excitadoras a través de un proceso conocido como “supresión de la excitación inducida por despolarización” o DSE (Kreitzer et al, 2002).

Los experimentos han demostrado que los endocannabinoides son mensajeros retrógrados para la DSI en el hipocampo (Wilson y Nicoll, 2001) y tanto para DSI como DSE en el cerebelo (Kreitzer y Regehr, 2001, Diana et al., 2002). Se encontró que tanto DSI como DSE son bloqueadas por antagonistas del receptor a cannabinoides y mimetizados u obstruidos por agonistas del mismo (Kreitzer et al, 2002, y Wilson y Nicoll, 2002). Además, la DSI en hipocampo no se presenta en ratones que no expresan el CB1, otra evidencia de que estos receptores median la DSI en esta estructura.

Por otro lado, las células piramidales del hipocampo y las células de Purkinje en el cerebelo expresan enzimas relacionadas con la síntesis y degradación de endocannabinoides. La supresión retrógrada de las sinapsis por la despolarización es dependiente de calcio como lo es la síntesis de endocannabinoides. En el hipocampo, los receptores CB1 se localizan presinápticamente en un subconjunto de interneuronas que forman sinapsis sobre las células piramidales del hipocampo mientras que en el cerebelo, los

² Quiere decir que un paso de voltaje (“a voltage step”) cercano a 0 mV es suficiente para activar los canales de calcio dependientes de voltaje e inducir una DSI (Alger y Pitler, 1995).

receptores CB1 se encuentran en entradas inhibitoras y excitadoras sobre las células de Purkinje (Citado en Kreitzer y Regehr, 2002).

La observación de que es necesaria la señalización presináptica mediante proteínas G para la DSI concuerda con la localización de receptores CB1 acoplados a proteínas G en las terminales presinápticas (Citado en Kreitzer et al, 2002). Además, el hallazgo de que los agonistas de receptores cannabinoides producen inhibición presináptica de las sinapsis involucradas en DSE y DSI fue una clave adicional de que el sistema canabínérgico podría estar involucrado en una supresión retrógrada de las sinapsis (Citado en Kreitzer et al, 2002).

2.1.3.1. Síntesis y degradación de endocannabinoides

La anandamida se forma por la hidrólisis del precursor N-araquidonil fosfatidiletanolamina (NAPE), por medio de la acción de la fosfolipasa D (PLD) (Citado en Iversen, 2003). Por otro lado, el 2-araquidonil glicerol (2-AG), se produce por la ruptura del inositol-1,2-diacilglicerol catalizada por la fosfolipasa C (Iversen, 2003).

La síntesis de endocannabinoides también puede dispararse por la activación de receptores a glutamato metabotrópicos del grupo I (mGluRs). Se sabía que la activación de estos receptores puede suprimir la liberación de neurotransmisor al actuar en un sitio presináptico, a pesar de que los mGluRs del grupo I se localizan casi exclusivamente en estructuras postsinápticas. Esta paradoja ha sido resuelta con hallazgos de dos estudios: uno enfocado en las sinapsis GABAérgicas del hipocampo y otro en las sinapsis de las fibras trepadoras del cerebelo en las cuales un antagonista del CB1 bloqueó los efectos de la activación del mGluR del grupo I (Wilson y Nicoll, 2002). La activación de los mGluRs postsinápticos del grupo I también puede sintetizar endocannabinoides, probablemente mediante la acción de la fosfolipasa C, generando diacilglicerol, sustrato de la diacilglicerol lipasa para formar 2-araquidonilglicerol (Wilson y Nicoll, 2002).

Una vez sintetizados, los endocannabinoides dejan la célula postsináptica y activan a los receptores CB1 presinápticos, que interactúan con una proteína G liberando la subunidad $G_{\beta\gamma}$ e inhibe de manera directa el flujo presináptico de

Ca^{2+} hacia el interior de la célula. Esto disminuye la probabilidad de liberación de vesículas de neurotransmisor (Wilson y Nicoll, 2002).

Por último, la degradación de endocannabinoides combina un mecanismo transportador y la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Citado en Iversen, 2003). Esta enzima se expresa de manera abundante en el soma y las dendritas de las células principales que son inervadas por fibras que contienen al CB1 (Citado en Kreitzer et al, 2002).

2.2. Memoria y aprendizaje

Podemos definir a la memoria de una manera simple diciendo que consiste en el almacén de la información y al aprendizaje como el procedimiento mediante el cual esta información es adquirida, almacenada y posteriormente evocada. En este proceso interviene una serie de sistemas diferentes, dentro de los cuales se encuentra la interacción de estructuras como el hipocampo, el núcleo estriado, la amígdala, la corteza prefrontal, el núcleo accumbens y el cerebelo. La memoria es parte sustancial de los procesos de aprendizaje.

Debido a la complejidad de los procesos cognitivos, así como a su interacción con otros sistemas de percepción y coordinación, es difícil imaginar que la memoria se encuentra localizada específicamente en un área delimitada del cerebro. Ahora se sabe que existen diferentes tipos de memoria, cada uno de los cuales está controlado por una parte diferente del cerebro (Citado en White y Salinas, 1998), que a su vez interactúa con otras estructuras para codificar finalmente el tipo de memoria que se requiera.

Se habla de una **memoria declarativa o explícita** y una **no declarativa o implícita**, también llamada de **procedimiento**, distinción que se hizo al observar que pacientes con enfermedades neurológicas que afectan principalmente el hipocampo, -por ejemplo la enfermedad de Alzheimer o pacientes a los que se les remueve el lóbulo temporal medial como H.M-, son incapaces de aprender o recordar eventos ordinarios (memoria declarativa o explícita) pero parecen aprender o recordar normalmente cómo hacer las cosas (memoria de procedimiento, no declarativa o implícita). En los experimentos originales, los pacientes neurológicos aprendieron y recordaron cómo leer

palabras complejas en un espejo tal y como lo hacen los sujetos control normales, pero fueron incapaces de recordar las sesiones de entrenamiento o el hecho de que ellos habían adquirido esa habilidad (Citado en White y Salinas, 1998).

La evidencia de que estas personas con daño hipocampal aprendieran a ejecutar una tarea de memoria compleja sugiere que (1) hay al menos dos tipos diferentes de memoria y que (2) el hipocampo es una estructura crítica para uno de estos tipos (la memoria declarativa), mientras que el otro tipo de memoria (de procedimiento), debe estar mediado en otra parte del cerebro.

Experimentos con animales hechos por McDonald & White, 1994; Packard, Hirsh & White, 1989; Packard y White, 1991; sugieren que los núcleos basales, principalmente el estriado dorsal (caudado-putamen) deben mediar el aprendizaje de procedimiento (White y Salinas, 1998).

Podemos decir entonces que la **memoria implícita o no declarativa**, se presenta cuando se evoca información necesaria para ejecutar cierta tarea, es una memoria que se recuerda de manera inconsciente. Este tipo de memoria está involucrado en el entrenamiento de habilidades reflexivas³ motoras o preceptuales.

En cambio, la **memoria explícita o declarativa**, refiere al conocimiento de hechos, lugares, personas y cosas, así como lo que éstos representan. Esta memoria es recordada mediante un esfuerzo consciente deliberado. La memoria explícita es altamente flexible e involucra la asociación de múltiples piezas de información. En contraste, la memoria implícita es mas rígida y está estrechamente conectada a las condiciones del estímulo original bajo las cuales ocurrió el aprendizaje (Kandel, 2000).

Dentro de la memoria declarativa podemos incluir a la memoria espacial, que es la que nos sirve para ubicarnos en un punto determinado del espacio y transportarnos de un lugar a otro haciendo uso de referencias o claves visuo-espaciales (i.e., coordenadas, el sol, las estrellas, etc.).

Podemos hablar de **la memoria de trabajo** como un tipo de memoria declarativa⁴. Ésta se refiere al almacenamiento temporal de información que se

³ Se entiende por habilidades reflexivas a las que involucran los reflejos corporales.

⁴ Según Ignacio Morgado Bernal, catedrático de Psicobiología del Instituto de Neurociencia de la Universidad Autónoma de Barcelona.

usa para llevar a cabo una acción futura (Kandel, 1991). Es el tipo de memoria que utilizamos cuando tratamos de retener información sobre algo que nos acaban de decir, cosas que acaban de pasar o pensamientos que acabamos de tener para utilizarlos inmediatamente en el propio razonamiento, en la resolución mental en curso de algún tipo de problema o en la toma de decisiones (Morgado-Bernal, 2005). Los estudios con neuroimágenes (resonancia magnética o tomografía por emisión de positrones) muestran que una de las zonas más activas cuando funciona la memoria de trabajo es la corteza prefrontal.

Por otro lado, el condicionamiento clásico pertenece a un tipo de memoria no declarativa. Éste fue propuesto por Pavlov en 1927. De acuerdo con Pavlov, lo que los animales y los humanos aprenden no es la asociación de ideas sino la asociación de estímulos (Kandel et al., 1991). La esencia del condicionamiento clásico es la asociación o apareamiento de dos estímulos, un estímulo incondicionado (EI) y un estímulo condicionado (EC) (Kandel et al., 1991). El estímulo condicionado, como una luz o un tono produce respuestas no manifiestas que están relacionadas con la respuesta que eventualmente se aprenderá (Kandel et al., 1991). Por el otro lado, el estímulo incondicionado (algunas veces llamado reforzador), como la comida o un shock en la pierna, siempre produce una respuesta clara, la respuesta incondicionada (RI), como la salivación o el temblor de la pierna (Kandel et al., 1991). La razón por la cual la respuesta es incondicionada es porque es innata, y se produce por el estímulo incondicionado sin aprendizaje (Kandel et al., 1991). Después de que el estímulo condicionado se repite seguido del estímulo incondicionado, el estímulo condicionado comenzará a desencadenar respuestas llamadas respuestas condicionadas (RC) (Kandel et al., 1991). Después de aparear repetidamente el estímulo condicionado con el incondicionado, el estímulo condicionado se vuelve una señal que anticipa la ocurrencia del estímulo incondicionado, así que el animal responde al estímulo condicionado como si estuviera listo para el estímulo incondicionado (Kandel et al., 1991). Por lo tanto, en el condicionamiento clásico los animales aprenden a predecir la relación de eventos en el ambiente (Kandel et al., 1991). Por ejemplo, si se presenta una luz y en seguida se presenta un trozo de carne varias veces,

después de algunos entrenamientos el animal responderá a la luz como si ésta predijera el sabor de la carne, es decir, la luz por sí sola producirá salivación (Kandel et al., 1991).

El condicionamiento clásico puede ser subdividido en condicionamiento apetitivo y condicionamiento defensivo (Kandel et al., 1991). Si el estímulo incondicionado es reforzante⁵ (por ejemplo agua o comida) el condicionamiento se llama apetitivo; en cambio, si el estímulo incondicionado es nocivo (como un shock eléctrico), se llama condicionamiento defensivo (Kandel et al., 1991).

Estudios en humanos y animales sugieren que la amígdala es una estructura crítica para los procesos de condicionamiento clásico y que media la expresión del condicionamiento apetitivo y el defensivo (White y Salinas, 1998).

2.2.1. Memoria de corto y de largo plazo

Existe una clasificación de la memoria dependiendo del tiempo en que los recuerdos permanecen en el cerebro: la memoria de corto plazo es la memoria más inmediata, transitoria y dura algunos minutos, sirve para recordar datos que se necesitan aplicar en un tiempo más o menos inmediato (ejemplo: al memorizar un número de teléfono que no se sabe y que se va a marcar en ese momento) (<http://www.webliblioteca.com.ar/textos/mente/memoriacorto.htm>). Gracias a la memoria a corto plazo la persona no se satura de contenidos, muchos de ellos se olvidan y otros pasan a recordarse a mediano o largo plazo.

La memoria de largo plazo se puede definir como el almacén donde se guarda la información durante días, semanas, meses o años, y de donde se pueden recuperar los contenidos, imágenes y sensaciones que se han aprendido (<http://www.webliblioteca.com.ar/textos/mente/memoriacorto.htm>). Sirve para que los conocimientos se ordenen, de manera que puedan ser recuperados fácilmente. Esta capacidad es imprescindible para la comprensión e interiorización de nuevos conocimientos. (<http://www.webliblioteca.com.ar/textos/mente/memoriacorto.htm>).

⁵ Se entiende por reforzante un estímulo que es siempre positivo.

Tomando como ejemplo las tres formas típicas de aprendizaje - habituación, sensibilización, y condicionamiento clásico- a través de las cuales un organismo tan simple como *Aplysia* o uno tan complejo como un mamífero aprenden, podemos ejemplificar los dos tipos de memoria arriba descritos.

Veamos el ejemplo de la sensibilización, que es una forma de miedo aprendido en la cual una persona o un animal experimental aprende a responder de manera contundente a un estímulo neutro (Kandel, 2001). Cuando *Aplysia* recibe un estímulo táctil en el sifón, lo retrae, así identifica al estímulo como aversivo y aprende a mejorar su respuesta de reflejos defensivos ante los estímulos subsecuentes aplicados al sifón. El animal recuerda el estímulo y la duración de este recuerdo depende de la cantidad de veces que se repita la experiencia. Un solo estímulo dará una memoria que dure únicamente minutos, esta es una *memoria de corto plazo*. En cambio, si se le aplican cuatro o cinco estímulos espaciados, dará lugar a una memoria que dura varios días, la cual es una *memoria de largo plazo*. Entonces, para que una memoria de corto plazo se convierta en una de largo plazo, se requiere que exista una repetición del estímulo que se está almacenando. Además, la memoria de corto plazo no requiere de la síntesis de nuevas proteínas, mientras que la memoria de largo plazo sí.

2.2.2. Almacenamiento de la información

Una de las ideas mejor aceptadas acerca de cómo se almacena la información en el sistema nervioso se basa en el concepto del “ensamble celular”, que fue originalmente descrito por D.O. Hebb (1949). Esta construcción hipotética comienza con la idea de que cada percepción evoca un patrón único de actividad neural. Las neuronas activadas representan lo que se percibe y están conectadas unas con otras en una asa cerrada (el ensamble celular) que se auto activa de manera repetida (actividad reverberatoria). Este nuevo ensamble celular se mantiene activo gracias a la repetición del estímulo, así es como se retiene la información que se presenta por períodos de tiempo que pueden ser desde minutos hasta horas (White y Salinas, 1998). Hebb sugiere que esta activación repetida de las sinapsis (ensamble celular), causa los cambios permanentes en las sinapsis y son estos cambios los que facilitan la futura activación de sinapsis.

El patrón de las sinapsis facilitadas incrementa de manera permanente la probabilidad de que en ocasiones futuras la activación de una parte del ensamble celular activará el resto, permitiendo el recuerdo de la información que éste represente.

Sin embargo, no todas las formas de memoria involucran representaciones de percepciones. Se cree que los cambios en la sinapsis como resultado de la activación simultánea de las neuronas que los forman, son la base de todos los cambios en la conducta debidos a la experiencia, incluyendo aquellos que involucran el aprendizaje de procedimiento y el condicionamiento clásico (White y Salinas, 1998).

Otra de las hipótesis más aceptadas sobre el almacenamiento de la información y que complementa a la de Hebb se basa en la propuesta de Santiago Ramón y Cajal en 1894 y que fue posteriormente reforzada con estudios moleculares por el grupo de Kupferman, Castelluci, Carew, Hawkins y Kandel, en 1970. Esta hipótesis sostiene que el aprendizaje es el resultado de cambios en la fuerza de las conexiones sinápticas entre células interconectadas (Kandel, 2001). Así pues, mientras que el programa de desarrollo del organismo asegura que las conexiones entre las células son invariables, este no especifica la precisión de su fuerza (Kandel, 2001). Por lo tanto, la experiencia altera la efectividad y fuerza de las conexiones químicas preexistentes. En este concepto está basada la plasticidad sináptica, la cual emergió como mecanismo fundamental para el almacenamiento de la información por el sistema nervioso (Kandel, 2001). Este fortalecimiento en las sinapsis tiene su sustento en observaciones moleculares, las cuales indican la activación y supresión de genes que responden a estímulos químicos dados por determinados neurotransmisores y que tienen como objetivo final la síntesis de nuevas proteínas.

2.2.3. Consolidación

Como la mayoría de los procesos, la memoria es un proceso que depende del tiempo. Una vez adquiridos los recuerdos se almacenan en un estado lábil y están sujetos a ser alterados mediante eventos externos. Con el paso del tiempo, y la repetición del estímulo, su almacenamiento se vuelve más permanente (representado con el cambio sináptico de Hebb, o la síntesis de

nuevas proteínas), y están entonces menos susceptibles a un trastorno. El proceso mediante el cual los recuerdos se vuelven permanentes se llama consolidación (White y Salinas, 1998). El intervalo durante el cual el proceso del cambio en la fuerza de las sinapsis (síntesis de proteínas) ocurre se llama período de consolidación.

Hay evidencias que sostienen estas ideas. Los humanos que sufren traumatismos como un daño cerebral o un shock electro convulsivo, presentan amnesia para eventos que ocurrieron inmediatamente antes del trauma. La memoria para eventos que ocurrieron más tempranamente no se afecta. Esto sugiere que los recuerdos adquiridos de manera más reciente fueron alterados por el traumatismo, mientras que los más viejos, es decir las memorias consolidadas, no se afectaron (White y Salinas, 1998).

El shock electro convulsivo en estudios con animales tiene efectos muy parecidos. Al usar grupos de animales que reciben el evento alterador de la memoria a diferentes tiempos después de un entrenamiento, se ha podido demostrar un “gradiente de consolidación” en el cual la efectividad del agente alterador de la memoria disminuye conforme aumenta el tiempo post entrenamiento (Citado en White y Salinas, 1998).

Los tratamientos administrados durante el periodo de consolidación pueden afectar la memoria, mientras que los tratamientos dados después de este período tienen poco o ningún efecto. Se ha referido a la influencia que tienen los tratamientos aplicados durante el período de consolidación después del entrenamiento como “modulación de la memoria” (Citado en White y Salinas, 1998).

2.3. Canabinoides y memoria

2.3.1. Efectos de la marihuana en la memoria

Uno de los efectos conductuales más frecuentemente reportado en los consumidores de marihuana es el déficit en la memoria y el aprendizaje. Tomando en cuenta que los receptores a canabinoides se expresan en altas concentraciones en el hipocampo, estructura que juega un papel importante en los procesos de memoria y aprendizaje, puede suponerse entonces que este

déficit causado por la marihuana se deba a una alteración en la función de esta estructura (Sullivan, 2000).

Estudios conductuales en humanos muestran que la marihuana produce trastornos en tareas que tienen que ver con la memoria a corto plazo (Miller y Branconnier, 1983; Miller, 1984; Chait y Pierri, 1992). En particular, la marihuana deteriora el recuerdo libre de una lista de palabras que se presenta a un sujeto intoxicado (Sullivan, 2000). Este recuerdo libre se deteriora inmediatamente después de la presentación de la lista (recuerdo inmediato) y después de 20 minutos de la presentación de la misma (recuerdo retardado). En el caso del recuerdo libre inmediato, se tiende a recordar mejor las palabras que se encontraban al final de la lista que las primeras, lo que sugiere que algún aspecto de la memoria se ha dañado (Sullivan, 2000). A diferencia de los efectos que provoca en el recuerdo libre, la marihuana no tiene efectos al reconocer palabras que habían sido presentadas previamente dentro de una lista de palabras viejas y nuevas (Sullivan, 2000).

Otro tipo de deterioro que produce la marihuana sobre la memoria es el recuerdo inconsistente de la memoria a largo plazo, es decir, un deterioro en el recuerdo libre de palabras presentadas al menos una semana antes a sujetos sobrios, así como intrusiones en la memoria, que es cuando se recuerdan palabras que no están presentes en la lista (Sullivan, 2000). La disfunción en la memoria que se observa después de la intoxicación con marihuana es semejante a la observada en pacientes con disfunción en el hipocampo debida a encefalitis por herpes, con síndrome de Korsakoff o con Alzheimer (Miller y Branconnier, 1983; Miller, 1984), lo que sugiere que es en esta estructura donde se está produciendo dicha alteración.

Experimentos con animales apoyan la relación entre el deterioro de la memoria mediado por cannabinoides y la deficiencia en la función del hipocampo. En monos, la administración de Δ^9 -THC previa a la prueba, deteriora la ejecución en una tarea de retardo en la no igualdad a la muestra, en la cual el animal debe identificar cuál de los pares de objetos presentados se le presentó 15 minutos antes (Aigner, 1988). En contraste, los cannabinoides no tienen efecto en el aprendizaje de discriminación concurrente⁶, durante el

⁶ Véase definición de tareas de discriminación, en el apéndice, pág. 72.

cual el animal intoxicado debe aprender a identificar cuál de los dos objetos que se le presentan se paree siempre con comida después de varias sesiones separadas por 24 horas. Este efecto diferencial del Δ^9 -THC en la ejecución del retardo en la no igualación a la muestra y el aprendizaje de discriminación concurrente se asemeja al patrón de deficiencias que se observan después de lesiones amígdalo-hipocampales en los monos (Aigner, 1988).

Los cannabinoides también deterioran la ejecución en una variedad de tareas de memoria en ratas (Hampson y Deadwyler, 1998). Por ejemplo, además de aumentar la latencia de la respuesta, el Δ^9 -THC disminuye el porcentaje de respuestas correctas en ratas que han sido entrenadas para responder con la nariz a un tono condicionado (Campbell et al., 1986). Esta deficiencia sugiere una incapacidad para procesar y/o recordar el tono correcto presentado recientemente. Así, los cannabinoides alteran la ejecución de una amplia variedad de tareas que involucran la memoria en humanos, primates no humanos y roedores que comparten la característica de requerir al hipocampo para ejecutar de forma normal dichas tareas (Sullivan, 2000).

Un estudio hecho por Lichtman et al., 1995, en el cual administraron a ratas de manera sistémica e intrahipocampal tanto Δ^9 -THC como otros cannabinoides, mostró que los roedores administrados con Δ^9 -THC tuvieron más errores y tardaron más tiempo en resolver el laberinto radial de ocho brazos respecto a los grupos control. Con la administración de cannabinoides en las regiones CA1, CA3 o giro dentado del hipocampo, se presentó el mismo aumento en el número de errores que con la administración sistémica. Sin embargo, en las administraciones intrahipocampales, las ratas no presentaron analgesia, catalepsia e hipotermia, efectos que se observan con la administración sistémica. Lo anterior evidencia el efecto que ejercen los cannabinoides en el hipocampo y la consecuente alteración que provocan sobre la memoria.

Por otro lado, estudios han mostrado que la administración sistémica de Δ^9 -THC a roedores inhibe la liberación de acetilcolina en el hipocampo.

Además, se ha propuesto que los cannabinoides pueden dañar la memoria al aumentar la inhibición GABAérgica en el hipocampo, la cual modula de manera importante la transmisión sináptica en esta estructura. Otros estudios sugieren que los cannabinoides disminuyen la liberación de glutamato a

través de un mecanismo presináptico mediado por una proteína G inhibidora (Sullivan, 2000), fenómeno descrito anteriormente como DSE.

Parece que la inhibición mediada por proteínas G de los canales de calcio presinápticos tipo N y P/Q, es el mecanismo molecular primario a través del cual los cannabinoides inhiben la liberación de glutamato en el hipocampo, aunque la modulación de proteínas involucradas en la liberación de vesículas es probable que juegue un papel importante (Sullivan, 2000).

Hasta ahora se habla de tres sistemas de neurotransmisión a través de los cuales los cannabinoides ejercen su acción en el hipocampo, que son el colinérgico, el glutamatérgico y el GABAérgico.

2.3.2. Bases electrofisiológicas y moleculares de la acción de los cannabinoides en la memoria

Los cannabinoides también alteran los patrones de disparo en CA1 (Sullivan, 2000). Registros extracelulares de neuronas CA1 durante una prueba de retardo en igualación a la muestra, muestran que el Δ^9 -THC elimina el marcado aumento de disparo que ocurre normalmente en estas células durante el registro de la tarea, y de manera más sutil altera el patrón de disparo que ocurre durante las fases de retardo e igualación (Heyser et al., 1993). Esta pronunciada inhibición en el disparo durante la fase de prueba sugiere un posible mecanismo para la deficiencia conductual, si es que el disparo durante esta fase refleja la codificación de información que se requiere para una correcta ejecución durante la fase de igualación de la tarea (Sullivan, 2000).

Por otro lado, la activación del CB1 inhibe la inducción de LTP y LTD⁷ en el hipocampo (Sullivan, 2000). A pesar de que aún no se conoce la relación de los mecanismos que subyacen los cambios celulares y moleculares de LTP y el aprendizaje, la evidencia sugiere que cambios como estos parecen mediar algunas formas de memoria (Stevens, 1998).

⁷ LTP: Potenciación a largo plazo y LTD: Depresión a largo plazo, en la transmisión sináptica de CA1 a CA3. Dos modelos in vitro para estudiar el aprendizaje y la memoria.

2.4. Administración crónica de cannabinoides

2.4.1. Administración crónica y tolerancia

Está demostrado que la administración aguda de Δ^9 -THC puede producir trastornos dependientes de la dosis sobre la adquisición de tareas de discriminación compleja⁸ en una variedad de especies que responden a tareas similares. Por ejemplo, la administración aguda de Δ^9 -THC a monos ardilla disminuye la tasa de ejecución así como la precisión del aprendizaje en una tarea de adquisición repetida⁹ (Nakamura-Palacios et al., 2000). En otro estudio con humanos a los que se les administró Δ^9 -THC por vía oral se produjo un deterioro selectivo en la adquisición de secuencias de respuestas cuando los sujetos respondían en una tarea múltiple de adquisición y ejecución¹⁰ (Kamien et al., 1994). Sin embargo, se ha encontrado que muchos de los efectos perjudiciales producidos por el Δ^9 -THC en tareas de aprendizaje y memoria disminuyen durante la administración crónica, es decir, se desarrolla tolerancia¹¹ (Branch et al., 1980, Ferraro y Grilly, 1974; Ferraro y Grisham, 1972; Jones et al., 1981; Pertwee et al., 1993). En un estudio hecho por Ferraro y Grilly en 1974, se entrenó a tres grupos de cuatro chimpancés en una tarea de 20 segundos de retardo en igualación a la muestra y después se les expuso durante 152 días a un tratamiento crónico con Δ^9 -THC. Dos de los chimpancés en cada grupo no habían estado expuestos a la droga. Los otros dos chimpancés en cada grupo habían experimentado 45 dosis de Δ^9 -THC cuatro meses antes del experimento. Un grupo de animales sirvió como control libre de droga, mientras que el segundo grupo recibió una dosis oral de 1 mg de Δ^9 -THC por kilogramo de peso corporal después de cada sesión de igualación a la muestra. Al grupo experimental se le administró la misma dosis de Δ^9 -THC pero a diferencia del segundo grupo éste la recibió antes de cada sesión diaria. Las administraciones iniciales de la droga antes pero no después de cada sesión produjeron una disminución significativa en la precisión de la igualación a la muestra. Durante el curso del tratamiento crónico, los animales

⁸ Véase definición en apéndice, pág. 72.

⁹ ídem

¹⁰ ídem

¹¹ ídem

del grupo experimental se recuperaron muy lentamente del deterioro inicial en la ejecución de la tarea. La razón por la cual los animales experimentales se recuperan parece depender de la historia de exposición a la droga previa al experimento. Los animales que habían experimentado una exposición previa a la droga desarrollaron una completa tolerancia en cinco semanas, mientras que los animales que nunca habían sido expuestos a la droga no desarrollaron tolerancia aun después de cinco meses de exposición a ésta. Además, no se observaron efectos residuales o de largo plazo al término del tratamiento¹² (Ferraro y Grilly, 1974).

Otro estudio propuso que un tratamiento crónico de Δ^9 -THC (2 mg/kg durante 20 días) en monos ardilla podía inducir tolerancia a los efectos perjudiciales de la droga en la memoria (Branch et al., 1980). Estos monos ardilla desarrollaron tolerancia al disminuir los efectos del Δ^9 -THC en el deterioro de la tasa y la precisión de la ejecución cuando los monos respondían a una tarea conductual de dos o cinco claves. Además, se mostró cómo la tolerancia que desarrollaron los sujetos en la ejecución de la tarea estaba relacionada con la complejidad de ésta, ya que los monos desarrollaron menos tolerancia con la tarea de cinco claves (la más compleja) que con la de dos claves (menos compleja).

Estas investigaciones con chimpancés y monos ardilla muestran que conforme más compleja es la tarea, los sujetos son más susceptibles al efecto de los cannabinoides en la memoria y por lo tanto es más difícil que el cerebro restituya su eficiencia. También que la historia de consumo de la droga en cada sujeto influye en el desarrollo de la tolerancia.

Por otra parte, existen otros efectos producidos por el Δ^9 -THC sobre los que no necesariamente el organismo desarrolla una tolerancia al ser expuesto de manera crónica. Por ejemplo, en un estudio hecho por Nava et al., 2001, se administró de manera crónica Δ^9 -THC (5 mg/kg de Δ^9 -THC dos veces al día por un período de dos semanas) a un grupo de ratas y se evaluó si se producía tolerancia tanto en la inhibición de la liberación de acetilcolina en el hipocampo, como en el deterioro de la memoria. Se evaluó la memoria de trabajo en ratas entrenadas para resolver una tarea de alternancia retardada en el laberinto en

¹² Véase apéndice, pág. 72.

T. Los hallazgos de este estudio mostraron que no se desarrolló tolerancia a los efectos perjudiciales del Δ^9 -THC, tanto en la liberación de acetilcolina, como en la resolución del laberinto en T. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales no existe tolerancia a estos efectos. Después de 12 horas de la última administración crónica de Δ^9 -THC en este experimento, ya no se presentaron los efectos ni en la reducción en la tarea de alternancia correcta en el laberinto en T ni en los niveles de acetilcolina en el hipocampo, lo cual indica que a pesar del tratamiento crónico, no hay efectos residuales del Δ^9 -THC en una tarea que involucra a la memoria.

Otros datos experimentales han mostrado que un tratamiento crónico y fuerte de Δ^9 -THC (10 mg/kg por 35 días), puede inducir en ratas tolerancia a los efectos desfavorables en la memoria inducidos por la droga (Deadwyler et al., 1995).

Por otro lado, se ha encontrado que la exposición prolongada a canabinoides induce una reducción e insensibilización del CB1 (Breivogel et al., 1999; Fan et al., 1996; Oviedo et al., 1993; Rodríguez de Fonseca et al., 1992; Rodríguez de Fonseca et al., 1994; Sim et al., 1996). Se sabe también que el SR141716A (antagonista del CB1), revierte los efectos negativos inducidos por la administración crónica de Δ^9 -THC, con lo cual no se puede descartar un papel directo, aunque aun desconocido, de los receptores CB1 en el control de los efectos perjudiciales inducidos por un tratamiento crónico de Δ^9 -THC (Nava et al., 2001).

Existe evidencia de que el sistema dopaminérgico está involucrado en el déficit cognitivo que inducen los canabinoides (Nava et al., 2001). Se ha encontrado que la exposición repetida e intermitente a canabinoides provoca una reducción en la transmisión dopaminérgica de la corteza prefrontal, lo cual puede justificar, en parte, el déficit de memoria que induce el Δ^9 -THC (Jentsch et al., 1998). Sin embargo, un estudio de Nava et al. en 2000, mostró de manera inesperada¹³, que sulpiride, un antagonista de los receptores dopaminérgicos D2, revierte los efectos negativos inducidos por el Δ^9 -THC y

¹³ Se esperaría que el antagonista (sulpiride), que es el que bloquea al receptor e impide la liberación de dopamina, incrementara el déficit de memoria y que en cambio, el agonista (quinpirole), quien mimetiza la acción del neurotransmisor (dopamina en este caso), aumentara la transmisión dopaminérgica y por lo tanto se revirtiera el déficit de memoria presentado ante la exposición de canabinoides.

que en cambio, un agonista del D2 –quinpirole-, potencia el déficit de memoria (Nava et al., 2000). Estos datos, aunque controversiales, sugieren una estrecha interacción del sistema dopaminérgico y canabinérgico.

Por otro lado, Wu y French demostraron en el 2000 que durante el tratamiento crónico con Δ^9 -THC, las neuronas de la pars compacta de la sustancia negra desarrollaron tolerancia a los efectos del Δ^9 -THC, mientras que las neuronas del área ventral tegmental (VTA) mostraron un incremento continuo en la tasa de disparo cuando eran expuestas de manera repetida a una dosis de Δ^9 -THC¹⁴. Estos autores han demostrado que no se desarrolla tolerancia después del tratamiento crónico de Δ^9 -THC en el aumento del disparo de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas.

Debido a que la liberación de dopamina en las áreas límbicas y corticales es el sustrato neuroquímico que subyace las propiedades de reforzamiento de diferentes drogas de abuso, incluyendo la marihuana (Gardner y Lowinson, 1991), la falta de tolerancia al aumento en la tasa de disparo en las neuronas del VTA podría representar un posible mecanismo por el cual no se desarrolla tolerancia a los efectos euforigénicos inducidos por la marihuana (Dewey, 1986; Pérez-Reyes et al., 1991).

Así, se ha encontrado que la transmisión dopaminérgica se afecta en la corteza cerebral bajo la acción de los cannabinoides y que esto forma parte del deterioro en la memoria que se observa durante un tratamiento con cannabinoides. Sin embargo, no podemos dejar a un lado la importancia que juegan estructuras como el hipocampo, el núcleo estriado o la amígdala en los procesos cognitivos y su afección a través de los receptores CB1 dada por la acción de los cannabinoides. Podríamos hablar entonces de la acción de los cannabinoides como inhibidores de la transmisión no solamente dopaminérgica, sino también glutamatérgica, colinérgica e inclusive como potenciadores de la propia inhibición GABAérgica en las estructuras relacionadas con la memoria.

El hecho de que no se hayan encontrado efectos residuales en la memoria de trabajo y la liberación de acetilcolina después de 12 horas de la

¹⁴ La tasa de disparo en las neuronas dopaminérgicas del VTA se mantuvo elevada (+44%) después de 14 días de dos inyecciones al día de 5mg/kg de Δ^9 -THC. En cambio, la respuesta de las neuronas dopaminérgicas a la estimulación del Δ^9 -THC en la sustancia negra pars compacta disminuyó significativamente (+3%, $P < 0.01$) después de catorce días de administración.

última administración de Δ^9 -THC en el tratamiento crónico (Nava et al., 2001), sostiene la idea de que el Δ^9 -THC no produce un daño persistente en los procesos de memoria de corto plazo, aunque el abuso crónico de *Cannabis* puede inducir una reducción de diferentes funciones cognitivas (Pope y Yurgelun-Todd, 1996; Solowij, 1995).

Las investigaciones presentadas sugieren que el tratamiento crónico de Δ^9 -THC puede o no inducir tolerancia a los efectos negativos en la memoria. Un trabajo en 1995 indicó que el uso excesivo de marihuana está asociado con efectos neuropsicológicos residuales aún después de un día de abstinencia de la droga (Pope et al., 1995)

Por lo tanto, aún está por resolverse si el uso crónico de la marihuana induce un déficit cognitivo persistente, o es sólo un déficit pasajero que el organismo logra restituir al término de su consumo. Además, aun no se sabe si el deterioro en la memoria es debido un efecto residual de la droga en el cerebro, si es que éste existe, a un síndrome de abstinencia o a un efecto neurotóxico de la misma.

2.4.2. Administración crónica y abstinencia

Además de producir tolerancia, la administración crónica de Δ^9 -THC puede producir dependencia¹⁵ (Delatte et al., 2002). La dependencia física se ha demostrado en varias especies por la presencia del síndrome de abstinencia¹⁶ después de que se suspende una administración crónica de Δ^9 -THC (abstinencia espontánea) o después de que se administra un antagonista (se precipita la abstinencia) (Delatte et al., 2002). En humanos, Jones et al., en 1981 reportaron que el síndrome de abstinencia ocurría cuando se suspendía temporalmente la administración crónica de Δ^9 -THC. Este síndrome fue caracterizado por inquietud, irritabilidad e insomnio. Por otro lado, se ha

¹⁵ La dependencia es el uso de una sustancia para evitar los efectos que tendría su carencia. Los diabéticos, por ejemplo, que deben utilizar insulina constituyen un grupo dependiente. La dependencia a sustancias psicoactivas es el uso de sustancias con el objeto de evitar ya sea los efectos que provoca su suspensión (uso preventivo) o para disminuir los síntomas de la suspensión cuando ya se ha producido (uso paliativo) (es.wikipedia.org)

¹⁶ El síndrome de abstinencia es un conjunto de síntomas que afectan a un individuo cuando se ve privado bruscamente de algún tóxico o droga que anteriormente había consumido con regularidad y de la que tiene dependencia física (es.wikipedia.org).

reportado en varios estudios la ausencia de signos somáticos de abstinencia luego de una administración crónica de Δ^9 -THC en diversos modelos animales (Citado en Prospéro-García, et al., 2004). Sin embargo, al inducir abstinencia mediante antagonistas del CB1 como el SR141716A, administrado a ratas crónicamente tratadas con Δ^9 -THC, se logró observar un síndrome de abstinencia característico que incluye sacudidas de perro mojado, sacudidas de cabeza, sacudidas de extremidades anteriores, ataxia, ptosis palpebral, piloerección, hipolocomoción, masticación, temblor corporal y rascado (Citado en Prospéro-García et al. 2004).

En ratones knock-out para CB1 a los que se les administró Δ^9 -THC de manera crónica no se encontró síndrome de abstinencia luego de aplicarles SR141716A, lo que reafirma la dependencia del sistema al Δ^9 -THC mediada por el CB1 (Prospéro-García et al. 2004). Además, en ratones knock-out de los receptores opioides μ y δ se observó un síndrome de abstinencia al Δ^9 -THC aunque reducido, lo que sugiere una acción cooperativa del sistema opioidérgico en la dependencia al Δ^9 -THC (Citado en Prospéro-García et al. 2004). En el laboratorio del Doctor Prospéro-García, se llevaron a cabo administraciones intracerebroventriculares crónicas -14 días- de anandamida y oleamida a ratas y se encontraron algunos signos asociados a la abstinencia (Prospéro-García et al. 2004). Dichos signos como masticación, sacudidas de cabeza, piloerección y rascado se observaron claramente dentro de los primeros dos días de abstinencia y luego dejaron de aparecer, lo que sugiere una rápida adaptación a las nuevas condiciones (Prospéro-García et al. 2004).

Por otro lado, la abstinencia a cannabinoides provoca un aumento en los niveles extracelulares del factor liberador de corticotropina y una marcada inhibición de la actividad dopaminérgica en el sistema mesolímbico (Prospéro-García et al. 2004). Esta alteración en el sistema límbico puede manifestarse en los síntomas de estrés y disforia que acompañan al síndrome de abstinencia (Prospéro-García et al. 2004). Aunado a lo anterior, durante la abstinencia se aprecia una baja sensible en la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Citado en Prospéro-García et al. 2004).

Aparte de los signos de la abstinencia antes mencionados, la dependencia también se ha visto mediante cambios en las respuestas operantes. Por ejemplo, se ha demostrado que en ratas entrenadas para

presionar una palanca que reciben como reforzador comida con Δ^9 -THC, disminuye la tasa de respuestas cuando se les precipita un síndrome de abstinencia con SR141716A¹⁷ (Beardsley y Martin, 2000). Los datos de estos estudios sobre dependencia indican que la administración crónica de Δ^9 -THC puede producir cambios fisiológicos y conductuales tanto en humanos como en ratas, los cuales son observables cuando la abstinencia es espontánea o se precipita (Delatte et al., 2002).

2.4.3. Estudios con humanos

Como ya hemos visto, existen datos controversiales respecto al deterioro cognitivo que producen los cannabinoides cuando son consumidos de manera crónica. A continuación revisaremos algunos estudios que se han realizado con humanos en los últimos años respecto al papel que juega el consumo prolongado y excesivo de marihuana en el deterioro de la memoria, pues no se sabe con exactitud si éste permanece y es irreversible, si se presenta sólo cuando está presente el Δ^9 -THC en el sistema nervioso central del consumidor, o por una abstinencia debida a la dependencia a la droga.

Un trabajo de Fletcher en 1996 sugiere que el deterioro en la memoria es mayor en usuarios que han consumido *Cannabis* por largo tiempo, comparado con aquellos que llevan poco tiempo consumiéndola o con los que no la consumen (Fletcher et al., 1996), lo cual apunta a un deterioro de la memoria por el consumo crónico de marihuana.

Estudios con neuroimagenología han mostrado que no existe una anomalía anatómica del cerebro¹⁸ en usuarios crónicos de *Cannabis* (Co et al., 1997; Kuehnle et al., 1997), aunque Volkow et al., en 1996 demostraron

¹⁷ Las ratas fueron entrenadas para presionar una palanca de acuerdo a un itinerario variable de 10 segundos durante sesiones experimentales diarias compuestas de seis períodos de reforzamiento de comida que constaban de tres minutos cada uno. Fueron tratadas dos veces al día por seis días con dietas a las que se les añadió vehículo o Δ^9 -THC. En los días 7 y 8, se expuso a las ratas al vehículo y a dosis acumulativas de SR141716A por arriba de 3 y 9 mg/kg respectivamente. La tasa de respuestas aumentó durante la abstinencia al THC y en aquellas que recibieron el vehículo como tratamiento, sugiriendo una disminución de los efectos directos del THC. El SR141716A redujo la tasa de respuestas pero sólo en las ratas que fueron tratadas con THC. Estos datos sugieren que la dependencia al THC fue inducida y el síndrome de abstinencia precipitado con el SR141716A.

¹⁸El sistema ventricular y los espacios subaracnoides se mostraron normales en tamaño y no mostraron indicación alguna de cambio atrófico.

que consumidores crónicos de marihuana presentaban una alteración en el metabolismo de la glucosa en el cerebro¹⁹.

Regresando a estudios con animales, los hallazgos que muestran que los efectos negativos del Δ^9 -THC sobre la memoria de trabajo no se presentan en ratas doce horas después de la última administración tanto en tratamiento agudo como crónico (Nava et al., 2001), apoyan la idea de que el Δ^9 -THC no produce daños persistentes en los procesos de memoria de corto plazo. Sin embargo, Pope et al., en 1996, encontraron que el uso crónico de *Cannabis* puede inducir en humanos una reducción en funciones cognitivas, específicamente en el deterioro de los sistemas de atención y ejecución (Pope y Yurgelun-Todd, 1996; Solowij, 1995). Esta misma investigación reporta que 65 estudiantes universitarios que habían fumado marihuana 29 días en los últimos 30 días (rango de 22 a 30 días) y que también habían presentado cannabinoides en la orina, recuerdan pobremente una lista de palabras comparados con 64 fumadores que habían fumado un día en los últimos 30 días (rango de 0 a 9 días) y que no presentaban cannabinoides en la orina después de un día de abstinencia de la marihuana (Pope y Yurgelun-Todd, 1996). En otros estudios se encontraron anomalías electroencefalográficas en usuarios crónicos de marihuana después de 24 horas de abstinencia²⁰ (Struve et al., 1999; Patrick et al., 2000), pero otra investigación no encontró una alteración significativa en la respuesta P300²¹ auditiva o visual (Patrick et al., 1997).

¹⁹ Se evaluó el metabolismo de la glucosa en el cerebro en ocho sujetos normales y ocho usuarios crónicos de marihuana por medio de una tomografía por emisión de positrones. Antes de administrar THC los usuarios de marihuana presentaron un metabolismo del cerebro menor que los sujetos control. Al darles THC a los sujetos aumentó el metabolismo del cerebro en todos ellos pero sólo los usuarios crónicos mostraron aumentos en la corteza orbitofrontal, corteza prefrontal y los ganglios basales.

²⁰ Se analizaron sujetos que habían fumado marihuana diario por 15 a 24 años consecutivos comparados con controles que no habían fumado y con sujetos que habían fumado por periodos más cortos de tiempo. Los usuarios crónicos mostraron una elevada potencia absoluta de actividad theta sobre la corteza central-frontal bilateral, así como un aumento significativo en la coherencia interhemisférica de la actividad theta a través de las regiones central y posterior. Los tiempos de reacción del estudio sugieren que una larga exposición a la marihuana podría estar asociada con un procesamiento cognitivo lento. Se identificó un EEG adicional que correlaciona la exposición crónica al THC con una frecuencia alfa reducida.

²¹ La P300 es un potencial neural evocado, componente del electroencefalograma. Este potencial relacionado al evento aparece como una desviación positiva del voltaje del EEG a los 300 ms aproximadamente. Se supone que la P300 sigue un estímulo sensorial inesperado o un estímulo que provee información útil a los sujetos de acuerdo a su tarea ([http://en.wikipedia.org/wiki/P300_\(Neuroscience\)](http://en.wikipedia.org/wiki/P300_(Neuroscience))).

Además, en otro estudio no se encontraron retrasos significativos en las respuestas P300 auditivas en usuarios crónicos examinados después de al menos 12 horas de abstinencia (Solowij, 1998). Los usuarios de marihuana también desplegaron tiempos de reacción significativamente más lentos y una reducida precisión en una tarea de atención selectiva.

Sin embargo, es difícil determinar si este déficit observado sólo después de 12 o 72 horas de abstinencia es temporal. Por ejemplo, debido a un metabolito activo de los cannabinoides en el cerebro. Si se debe, en cambio, a los efectos agudos de la abstinencia a la marihuana, o si el déficit es de largo plazo debido a un efecto neurotóxico por la exposición prolongada a la *Cannabis* (Pope et al., 2001).

Lyketsos et al., en 1999 examinaron 1318 sujetos durante 12 años con edad menor a los 65 años y no encontraron diferencias significativas entre los usuarios crónicos de marihuana, los usuarios poco frecuentes y los que no la consumen en el grado de declinamiento cognitivo en la “Mini-Mental State Examination”²². En contraste, Struve et al., en 1998 sugirieron que las anomalías electroencefalográficas fueron mayores en los usuarios que llevaban fumando más tiempo marihuana. Además, Solowij (1998) encontró una fuerte correlación entre la duración del uso de la *Cannabis* y la disminución del procesamiento de estímulos complejos irrelevantes en una tarea de atención selectiva, aun en usuarios con una media de abstinencia de 2 años.

En un estudio hecho por Pope et al., en el 2001, se examinó la ejecución neuropsicológica²³ en 108 usuarios crónicos de *Cannabis*, entre 30 y 55 años, con 28 días de abstinencia monitoreada, los cuales estaban divididos en tres grupos: 63 usuarios actuales o en curso, quienes habían fumado al menos 5000 veces en su vida y seguían fumando diario hasta el día del estudio, 45 usuarios retirados, quienes habían fumado al menos 5000 veces en su vida

²² La MMSE (Mini Mental State Examination) es una herramienta que puede ser usada para evaluar el estado mental de manera sistemática y completa. Consiste en una prueba de 11 preguntas que evalúan 5 áreas de funciones cognitivas: orientación, registro, atención y cálculo, recuerdo y lenguaje. La calificación más alta es 30, una calificación de 23 o menor indica un déficit cognitivo. Esta prueba toma de 5 a 10 minutos en ser aplicada y es muy práctica para ser usada de manera repetida y rutinaria (<http://www.chcr.brown.edu/MMSE.PDF>)

²³ La evaluación neuropsicológica comprende distintas pruebas que efectúan los psicólogos. Sirve para conocer la capacidad de los sujetos para procesar la información que éstos reciben, así como para conocer sus respuestas a los diferentes estímulos del entorno. Con estas evaluaciones, nos podemos percatar del adecuado funcionamiento de las estructuras cerebrales o de alguna deficiencia en el funcionamiento de éstas, dada esta última por la acción de alguna droga o por alguna enfermedad no detectada.

pero menos de 12 veces en los últimos 3 meses y 72 sujetos control, que habían fumado menos de 50 veces en su vida, todos similares en edad, distribución étnica y sexo. Los sujetos fueron sometidos a abstinencia durante 28 días y se monitorearon por muestras de orina. En los días 0, 1, 7 y 28 se realizó una prueba neuropsicológica para evaluar la función intelectual general, habilidad de abstracción, atención sostenida, fluencia verbal y habilidad para aprender y recordar nueva información verbal y visuoespacial. Se encontró un deterioro en la memoria de una lista de palabras, detectable hasta los 7 días después de discontinuar la droga y relacionado con las concentraciones de THCCOOH²⁴ en orina. Después de 28 días de abstinencia, los usuarios no mostraron diferencias significativas respecto a los sujetos control en 10 pruebas neuropsicológicas (Pope et al., 2001).

Los usuarios crónicos retirados, que habían consumido muy poquito o nada de marihuana en los tres meses antes de la prueba, no mostraron diferencias significativas respecto a los sujetos control en cualquiera de los días y tipo de pruebas. La falta de diferencias significativas entre los consumidores de marihuana y los grupos control en el día 28, junto con la carencia de asociaciones significativas entre el puntaje de las pruebas y el tiempo de consumo de marihuana, sugieren que el déficit cognitivo asociado con la *Cannabis* puede ser un fenómeno reversible asociado con una exposición reciente a la droga, en vez de un fenómeno irreversible asociado con el uso prolongado. El hecho de que persista el déficit en la memoria de una lista de palabras después de discontinuar el consumo de marihuana, se puede atribuir a la persistencia de los canabinoides en el sistema nervioso central o a un síndrome de abstinencia debido a la interrupción abrupta de la droga (Pope et al., 2001).

Estos hallazgos son congruentes con estudios previos en tanto que muestran una deficiencia neuropsicológica dentro de los primeros días después de que el uso de la marihuana es interrumpido. Sin embargo, no se encontró una asociación entre el efecto acumulado a lo largo del tiempo de consumo de la *Cannabis* y el deterioro cognitivo. Tal vez el tipo de estudio no detecta

²⁴ Ácido carboxílico de THC, es un metabolito inactivo del THC que aparece en las pruebas de orina en los usuarios de marihuana y puede persistir por varias semanas después de su uso crónico.

sutilezas (como lo haría un electroencefalograma) que indicarían un daño permanente de los procesos cognitivos (Pope et al., 2001).

En el estudio arriba descrito no se sostiene la hipótesis de que el uso crónico de marihuana causa un deterioro cognitivo irreversible, al menos al nivel detectable con los instrumentos y el tamaño de muestra utilizados. Sin embargo, de acuerdo a reportes previos, se ha encontrado evidencia de que los usuarios crónicos de *Cannabis* presentan deficiencias cognitivas que duran por varios días, y posiblemente por semanas, después de discontinuar el uso de la marihuana (Pope et al, 2001).

3. Justificación

A pesar de que los estudios citados en este trabajo proveen de información acerca de la farmacología de los cannabinoides bajo condiciones tanto agudas como crónicas, aún quedan muchas preguntas acerca de cómo procesos tan complejos como el aprendizaje pueden afectarse por la tolerancia y la dependencia al Δ^9 -THC. Se necesitan estudios crónicos con cannabinoides para conocer si la calidad de la respuesta (i.e. la precisión), puede afectarse independientemente de la cantidad de la respuesta (i.e. la tasa de respuesta); y para determinar el grado en el que cada una de estas medidas de conducta se ven afectadas por la abstinencia.

Los antecedentes de esta investigación muestran que el deterioro cognitivo inducido por cannabinoides es uno de los aspectos menos entendidos dentro de la neurobiología de los mismos. Entre otras cosas, los estudios sobre los efectos crónicos de la marihuana son importantes para poder evaluar el daño que pueden tener los cannabinoides empleados en la medicina así como para esclarecer los mecanismos que subyacen el déficit cognitivo que provoca el abuso de esta droga.

A pesar de que existen estudios sobre el uso crónico de cannabinoides y la memoria, los datos que éstos arrojan siguen causando controversia, pues mientras algunas investigaciones sugieren que los usuarios crónicos de marihuana desarrollan una tolerancia a los efectos perjudiciales de la droga sobre la memoria, otras afirman que no se desarrolla tolerancia alguna al THC ante sus efectos negativos sobre la memoria, y otras más que entre más larga es la historia de consumo de la marihuana, el deterioro en la memoria es mayor.

No se ha encontrado un deterioro permanente e irreversible en la memoria en usuarios crónicos de *Cannabis* hasta ahora. Además, se conoce la tolerancia que se desarrolla durante este tipo de tratamientos crónicos, así como la abstinencia, prueba de la dependencia a esta droga de abuso y posible factor que influye en el deterioro cognitivo encontrado en estos usuarios. Sin embargo, se requiere de análisis más detallados para encontrar algún deterioro permanente, si es que lo hay, a nivel conductual, anatómico, fisiológico o molecular, tal vez utilizando pruebas conductuales diferentes a las reportadas,

en individuos de fácil manejo (ratas) bajo un tratamiento controlado con los fármacos indicados.

Los estudios realizados con cronicidad y cannabinoides son variados y tratan de abordar distintos puntos relacionados con la cognición, sin embargo, el tratamiento crónico varía de un autor a otro, por un lado, en cuanto a la cantidad administrada y el número de días que dura, y por el otro, en cuanto a lo que se evalúa. Mientras que para algunos autores un tratamiento crónico refiere a una administración continua del fármaco durante 15 días, para otros éste es apenas un tratamiento semicrónico y llaman crónico a uno de más de 30 días o hasta cinco meses. Por otro lado, los distintos estudios que utilizan un tratamiento crónico lo llevan a cabo con Δ^9 -THC y algunos otros cannabinoides sintéticos. Es cierto que si queremos semejar las condiciones de un usuario crónico de marihuana con una rata de laboratorio, lo más recomendable es utilizar el Δ^9 -THC, sin embargo, en México aún no es posible trabajar con este fármaco de manera legal, es por esto que para la realización de este proyecto utilizamos los cannabinoides endógenos anandamida (ANA) y oleamida (OLE), que comparten la característica con el Δ^9 -THC de unirse y activar al CB1.

Además, los estudios de tratamiento crónico y cannabinoides abordan distintos aspectos de la cognición, pues ésta es en realidad un proceso muy complejo que involucra muchas partes. Entre estas partes se encuentran la memoria de corto y de largo plazo, la memoria declarativa dentro de la cual se encuentran la memoria espacial y la memoria de trabajo. También está la memoria de procedimiento y la atención, entre otras; mismas que se intentan evaluar con tareas conductuales de propósitos distintos.

Durante esta investigación se evaluó la memoria espacial y de procedimiento en la rata mediante una prueba conductual llamada laberinto de Barnes.

Como hemos revisado a lo largo de la introducción, el sistema canabinérgico participa en la regulación de la memoria y el aprendizaje a través del receptor CB1, el cual se encuentra altamente expresado en el hipocampo y el núcleo estriado de la rata. Se ha visto que este receptor sufre una regulación a la baja "downregulation" durante una exposición prolongada a cannabinoides. Además, se ha encontrado que el CB1 varía su expresión en función del ciclo

luz-oscuridad en el hipocampo (Martínez-Vargas et. al., 2003) y el núcleo estriado de la rata. En el hipocampo presenta un máximo de expresión (mRNA) a las 13:00 hrs. y un mínimo a la 1:00 hrs. (Fig. 2).

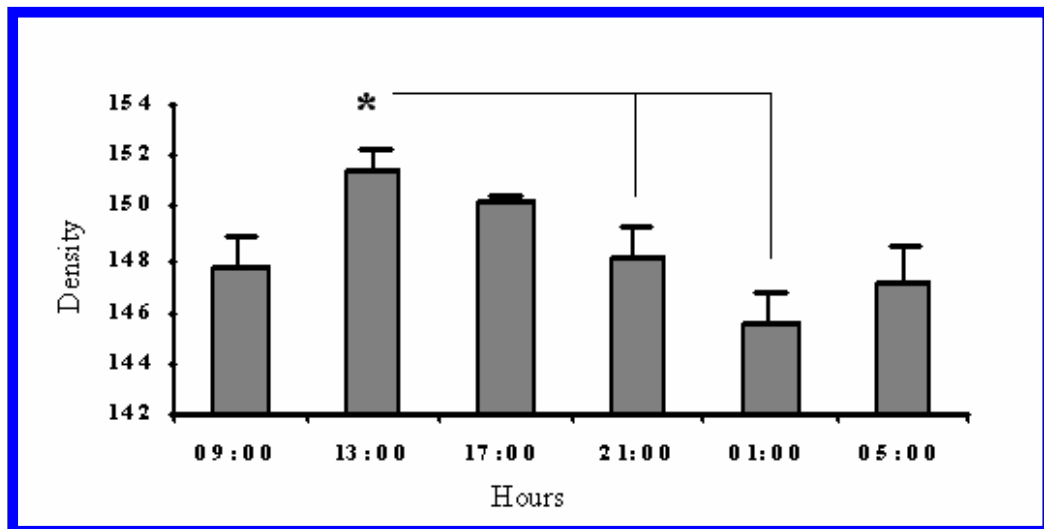


Figura 2. Expresión de CB1 en hipocampo. Martínez-Vargas et al., 2003.

Así también, el ligando endógeno anandamida tiene su máxima expresión en hipocampo durante la fase de oscuridad de la rata, presentando el pico máximo a las 5:00 hrs. y el mínimo en la fase de luz (9:00, 13:00 y 17:00 hrs.) (Fig. 3.) (Murillo-Rodríguez et. al., 1998).

Aún se desconoce qué es lo que provoca la regulación a la baja del CB1 dada por la exposición prolongada a cannabinoides sobre la memoria espacial y de procedimiento de la rata y qué es lo que provoca en la conducta que en cierta hora del día este receptor se exprese más en una estructura como el hipocampo, el cual ha sido relacionado clásicamente con la memoria espacial.

Es por esto que al administrar ANA y OLE durante 15 días consecutivos una vez al día y evaluar a la rata los últimos cinco días en el paradigma conductual laberinto de Barnes, deseamos observar si estos tratamientos influyen en la ejecución de la rata en dicho laberinto, tanto en el aspecto cualitativo de la prueba (tipo de estrategia usada) como en el aspecto cuantitativo (tiempo de resolución, número de errores y de perseverancias), y así poder evaluar si existen diferencias significativas entre las ratas administradas con endocannabinoides y las que se les administró únicamente el vehículo o las que no fueron administradas.

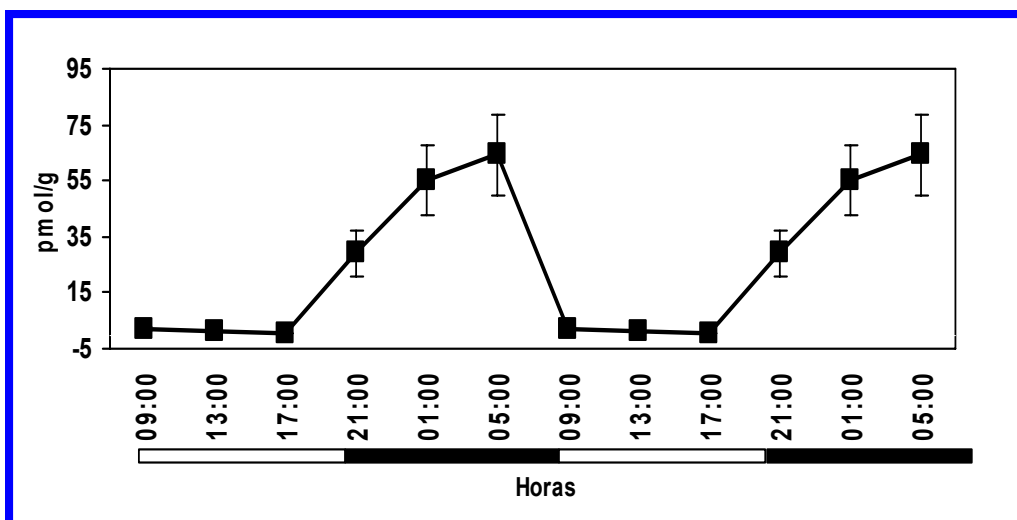


Figura 3. Niveles de anandamida en hipocampo. Murillo-Rodríguez, *et al.*, 1998.

Específicamente deseamos observar si se desarrolla una tolerancia a la administración crónica de endocannabinoides o si existe un deterioro o alteración en alguno o todos de los siguientes tipos de memoria: memoria de trabajo, memoria espacial y memoria de procedimiento.

Con esto pretendemos acercarnos más a los mecanismos que subyacen a la alteración del sistema canabinérgico por una administración crónica de endocannabinoides.

Así pues, si hay evidencia de que el sistema canabinérgico participa modulando la actividad de los sistemas tanto excitadores como inhibidores en el cerebro, y se conocen los efectos por el consumo de marihuana tanto en humanos como en animales, entonces, ¿cómo influyen los endocannabinoides durante una administración crónica en la resolución del laberinto de Barnes? (tiempo de ejecución, número de errores, número de perseverancias, tipo de estrategia utilizada).

4. Hipótesis y Objetivos

4.1. Hipótesis

Las ratas administradas crónicamente con ANA y OLE presentarán un menor desempeño en la ejecución del laberinto de Barnes (harán mayor tiempo en el laberinto, cometerán más errores y más perseverancias, y resolverán usando

una estrategia menos eficiente) que las ratas a las que no se les administró fármaco o a las que se les administró el VEH.

4.2. Objetivos

Determinar si la administración crónica de endocannabinoides afecta la memoria espacial, la memoria de procedimiento y la memoria de trabajo.

4.2.1. Objetivos particulares

Determinar si la administración crónica de ANA y OLE afecta la ejecución del laberinto de Barnes (aumento del tiempo de resolución y/o número de errores y perseverancias).

Determinar si la administración crónica de ANA y OLE influye sobre la elección de la estrategia utilizada para la resolución del laberinto de Barnes.

5. Material y Método

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar con un peso de 250-300 g. Cada rata fue colocada de manera individual en cajas de acrílico de 35x20 cm. Con comida y agua *ad libitum*. Se insertó una cánula en el ventrículo lateral a cada una de las ratas mediante cirugía estereotáxica. Las coordenadas fueron: Posterior = -0.8, Lateral = +1.5, Vertical = -3.8. Los grupos experimentales se componen de 10 ratas cada uno:

Fase de luz:

1. Administración crónica de anandamida + Entrenamiento
2. Administración crónica de oleamida + Entrenamiento
3. Administración crónica de vehículo (Etanol al 5 %) + Entrenamiento
4. Grupo sin administrar (control de caja) + Entrenamiento

Fase de oscuridad:

5. Administración crónica de anandamida + Entrenamiento
6. Administración crónica de oleamida + Entrenamiento
7. Administración crónica de vehículo (Etanol al 5 %) + Entrenamiento
8. Grupo sin administrar (control de caja) + Entrenamiento

Se administraron 5 µg del endocanabinoide correspondiente vía intracerebroventricular (ICV) durante 15 días. El volumen administrado fue 5 µl. A partir del doceavo día de administración, se evaluó la resolución del laberinto de Barnes (entrenamiento) a las 13:00 hrs. (fase de luz) y 1:00 hrs. (fase de oscuridad) durante los cinco días restantes.

5.1. Laberinto de Barnes

El laberinto de Barnes está ubicado en una habitación de paredes blancas donde se encuentran colgados algunos cuadros u objetos de manera permanente, con el fin de contar con ciertas claves visuales que permiten a la rata ubicarse en el espacio. El laberinto consta de una plataforma circular

blanca de 120 cm. de diámetro levantada 90 cm. del piso. Tiene en la periferia 40 agujeros de 6 cm. de diámetro que dan al vacío. Al momento de realizar la prueba, se coloca el túnel de escape -también llamado meta- de manera aleatoria debajo de uno de éstos. El túnel de escape es una caja rectangular negra destapada en una de sus caras por donde la rata entra, mide 21.5 x 9 x 9.5 cm. Por encima del laberinto se encuentra una cámara de video donde se registra la conducta de la rata durante la resolución de la prueba.

La prueba consiste en colocar a la rata dentro de un cilindro en el centro de la plataforma, bajo una bocina que cuando se conecta, emite un ruido de 90 decibeles que a la rata le resulta aversivo (ruido blanco). Se expone a la rata a este ruido por diez segundos y se retira el cilindro, dejándola en el centro en libre movimiento. Debido a que el ruido y los espacios abiertos e iluminados son desagradables para las ratas, éstas comienzan a explorar alrededor del laberinto, asomándose en los agujeros hasta encontrar el túnel de escape. Cabe mencionar que antes de iniciar el primer ensayo en el día 1, se coloca a la rata dentro del túnel de escape o meta una sola vez durante un minuto, con el fin de habituarla y mostrarle que allí está segura, pues el túnel es oscuro y no se le presenta ningún ruido. El ensayo termina cuando la rata se introduce al túnel de escape o pasan cuatro minutos, lo que ocurra primero. Al introducirse la rata al túnel, el ruido blanco se apaga y el animal es regresado a su caja. Si la rata no se mete al túnel la primera vez en cuatro minutos, se le introduce en éste de manera gentil y se apaga el ruido blanco. Si las subsiguientes ocasiones no se mete sola, ya no se le vuelve a meter al túnel. El entrenamiento consta de 4 ensayos diarios durante cinco días consecutivos.

5.1.1. Evaluación del laberinto

Entendiendo a la estrategia como la manera en la que un sujeto resuelve cierta tarea, en la prueba del laberinto de Barnes existen tres formas en las cuales la rata encuentra la meta o túnel de escape. Cuando las ratas apenas comienzan, lo que hacen en general es explorar de manera aleatoria el laberinto, esto es, van en todas direcciones y de manera desordenada

asomándose en cada agujero, volteando y olfateando todo cuanto ven. Conforme aprenden a que hay un túnel en el cual se meten y se acaba el ruido y la luz que les molesta, las ratas adoptan otras formas, además de la aleatoria, para explorar el laberinto y llegar a la meta. Se le llama estrategia serial cuando las ratas exploran uno por uno y de manera consecutiva los agujeros hasta encontrar el túnel de escape e introducirse en él. Por otro lado, la estrategia espacial ocurre cuando las ratas ubican claves visuales en el recinto (el investigador, los cuadros, la puerta) y se guían a través de éstas dirigiéndose en primera instancia hacia el lugar del túnel de escape (Fig. 4).

Además de evaluarse el tipo de estrategia que la rata utiliza (calidad de la respuesta), en el laberinto de Barnes también se toma en cuenta el tiempo que tarda el roedor en resolver el laberinto, así como el número de errores que éste comete, es decir, las veces que introduce la cabeza en un agujero donde no está el túnel o la llega a introducir en el correspondiente al túnel pero no se introduce por completo (cantidad de la respuesta). También se cuentan las veces que la rata visita el mismo agujero en dos o más ocasiones, a lo que se denomina número de perseverancias.

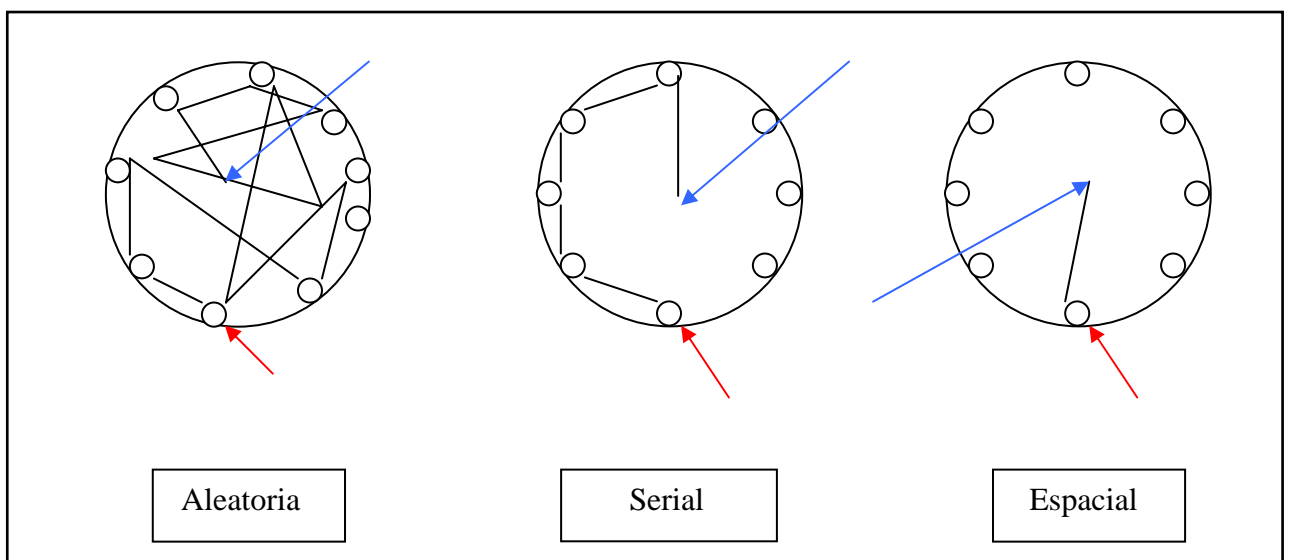


Figura 4. Estrategias usadas para resolver el laberinto de Barnes. Las flechas rojas indican el lugar donde se encuentra la meta o túnel de escape. Las flechas azules indican el centro de donde comienza la rata la trayectoria. Las líneas negras indican la trayectoria que sigue la rata hasta encontrar el túnel de escape.

El laberinto de Barnes evalúa la memoria espacial, la memoria de procedimiento y la memoria de trabajo. El uso de la estrategia espacial se relaciona con la actividad del hipocampo, ya que éste tiene que ver con el almacenamiento de mapas cognitivos en un determinado lugar, mismos que pueden ser usados para reconocer un lugar, para transportarse en él, y para codificar un contexto (Kesner, 1998). Así pues, con la estrategia espacial se evalúa el uso de la memoria espacial. La estrategia serial, por otra parte, se ha relacionado con el uso de la memoria de procedimiento, y la activación del caudado-putamen de la rata (Packard y McGaugh, 1996). Por último, con el número de perseverancias pretendemos observar cómo se desempeña la memoria de trabajo de la rata durante la prueba.

5.2. Administración de anandamida y oleamida

El momento en que se administre la droga es crucial para el efecto que se desee obtener, ya que si se administra después del entrenamiento, la sustancia estará interviniendo únicamente en el proceso de consolidación de la memoria, pues antes el sujeto pudo realizar la prueba en un estado libre de la droga (White y Salinas, 1998).

En este experimento se comenzó a administrar la sustancia once días antes de realizar la prueba de memoria (laberinto de Barnes), para poder observar cambios en la memoria espacial, de procedimiento y de trabajo de la rata una vez que se ha iniciado una administración crónica. Asimismo, la administración ICV de los fármacos se llevó a cabo durante los 15 días a las 7:00 hrs. para la fase de luz y a las 19:00 hrs. para la fase de oscuridad. La evaluación en el laberinto de Barnes se llevó a cabo a las 13:00 hrs. y 1:00 hrs. respectivamente once días después de haber comenzado con la administración. Existe pues una diferencia de tiempo de seis horas entre el suministro del canabinoide y la ejecución de la tarea durante los últimos cuatro días de administración. Esta ventana de tiempo nos permite asegurar que la droga no está interviniendo en el período de consolidación, pues lo que

queremos evaluar en este estudio son los cambios conductuales debidos a una administración crónica, (posibles daños permanentes o tolerancia).

5.3. Control motor y peso

Para descartar que los resultados de los tratamientos con endocannabinoides en la prueba a evaluar se deban a una alteración en el sistema motor del roedor, el último día de la prueba en el laberinto de Barnes, finalizando ésta, se evaluó a cada una de las ratas en un Rota Rod, el cual es un cilindro que rota a una velocidad creciente en donde se coloca a la rata y ésta camina por el tiempo que soporte. Se realizan tres ensayos por rata y se toma el tiempo que el animal permanece caminando sobre el cilindro. Así podemos evaluar el control motor de las ratas y asegurarnos que no sea un efecto de los cannabinoides sobre éste el que provoque una alteración en la prueba conductual de Barnes.

También se les tomó el peso a las ratas antes de iniciar el tratamiento crónico (peso inicial) y al final del mismo (peso final). Se obtuvo la diferencia del peso final menos el inicial, esto como un control para asegurar que la administración de los endocannabinoides no altera su estado general de salud y por lo tanto no sea esto la consecuencia de una mala ejecución en la prueba. Recordemos que algunos autores toman el peso como un control del estado de salud de los sujetos en experimentación para comprobar que no existan efectos residuales de los fármacos administrados.

5.4. Análisis Estadístico

Se realizó un ANOVA de una vía para observar si existen diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos aplicados en los parámetros número de errores, número de perseverancias y tiempo de resolución del laberinto, a un nivel de confiabilidad de 0.05 utilizando las pruebas post hoc de Scheffe y Bonferroni.

El análisis estadístico de las estrategias se realizó en dos pasos. El primero consistió en la elaboración de tablas de contingencia que nos permiten

conocer si existe una dependencia entre dos variables evaluadas. Por ejemplo, en un caso se analizó si el tipo de estrategia que utiliza la rata depende del día en que ésta es entrenada, mientras que en el segundo caso se analizó si la estrategia depende del tratamiento aplicado a las ratas, esto para aproximarnos al hecho de que exista alguna preferencia por determinada estrategia que tenga que ver con la sustancia administrada.

La segunda parte del análisis de las estrategias consistió en evaluar el porcentaje de las diferentes estrategias respecto a los distintos tratamientos en los cinco días de la prueba, comparando entre medias de los grupos mediante un modelo general lineal de medidas repetidas, a un nivel de significancia de 0.05 y con pruebas post hoc de Tukey, LSD y Bonferroni.

6. Resultados

6.1. GRUPOS ENTRENADOS EN FASE DE LUZ

6.1.1. Tiempo de resolución en laberinto de Barnes fase de luz

En el día 2 se observan diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos entre las ratas tratadas con vehículo respecto al grupo de ratas control de caja, y entre las administradas con oleamida respecto a las de vehículo.

En el día 5 se observan diferencias significativas entre las medias del tratamiento de vehículo respecto al control de caja. Estos resultados apuntan a que el tratamiento crónico con un vehículo compuesto de etanol al 5% aumenta significativamente el tiempo de resolución en el laberinto de Barnes, al menos en el día 2 y 5 de la prueba respecto a las ratas control de caja.

Entre los demás tratamientos no se encuentran diferencias significativas. De hecho, si quitamos al grupo de ratas control de caja del análisis, no encontramos diferencias significativas entre los diferentes tratamientos excepto para la oleamida respecto del vehículo en el día 2. Estos resultados indican que la administración crónica de anandamida y oleamida no altera el tiempo de resolución en el laberinto de Barnes durante la fase de luz. Sin embargo, el tiempo se ve afectado por la administración crónica de etanol al 5% que es el vehículo en el que se diluyen los endocannabinoides administrados, comparado con el grupo control de caja. Las diferencias más notables se observan en los días 1 y 2 entre el vehículo y los grupos de anandamida y oleamida, pero del día 3 al 5 los valores de los tres tratamientos se aproximan mucho.

En general, como se observa en el *Gráfico 1*, podemos decir que la administración de endocannabinoides no altera el tiempo de resolución del laberinto de Barnes, ya que se observa una tendencia muy parecida en todos los grupos probados a disminuir el número de errores conforme transcurren los días de la prueba.

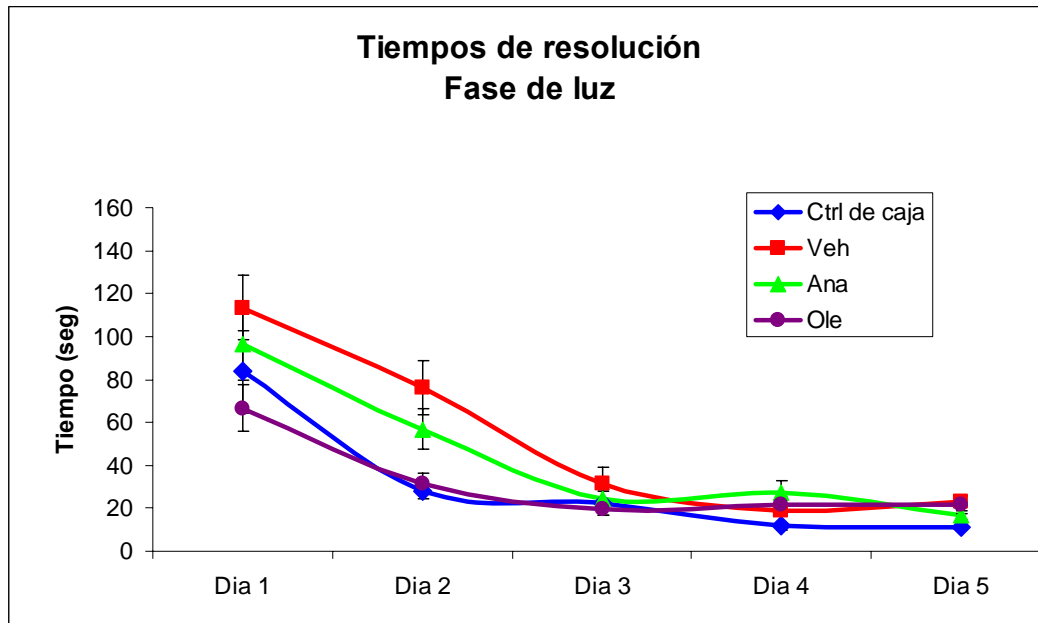


Gráfico 1. Tiempos que tardaron las ratas entrenadas a las 13:00 hrs. en resolver la prueba.

A pesar de que la administración del vehículo causa un aumento en el tiempo de resolución del paradigma, en los días 2 y 5 de la prueba respecto al control de caja, la combinación de este vehículo con anandamida y oleamida no afecta de igual manera. Parecería que la administración de estos dos endocannabinoides revirtiera el efecto perjudicial que el etanol causa sobre el tiempo de ejecución de la prueba, resolviendo entonces las ratas administradas con estos endocannabinoides de manera parecida a las ratas intactas.

6.1.2. Errores en laberinto de Barnes fase de luz

No se observan diferencias significativas en el número de errores a lo largo de los cinco días de la prueba entre los diferentes tratamientos.

Aunque las diferencias no sean significativas, vale la pena mencionar el comportamiento de la curva del grupo tratado con anandamida a lo largo de los cinco días, el cual muestra una ligera tendencia hacia el aumento del número de errores en el cuarto día, es decir, este tratamiento parece disminuir el número de errores hasta el tercer día, aumentarlo un poco para el cuarto día y recuperar la tendencia a disminuir el número de errores hacia el último día del entrenamiento.

En el caso de la oleamida, los errores disminuyen hasta el tercer día, en donde ya no aumentan ni disminuyen, sino que permanecen constantes hasta el quinto día del entrenamiento. El grupo administrado con vehículo presenta un punto mínimo en el cuarto día el cual invierte la pendiente en el quinto día del entrenamiento, indicando un aumento en los errores para el último día. Este mismo patrón de aumento en el número de errores en el quinto día se observa para el grupo de ratas intactas, aunque un poco menos pronunciado que el del vehículo. Como el patrón descrito para el control de caja en muy parecido al del vehículo en el quinto día, y debido a que no hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, deducimos que esto se encuentra dentro de los límites “normales” en una resolución por ratas del laberinto de Barnes.

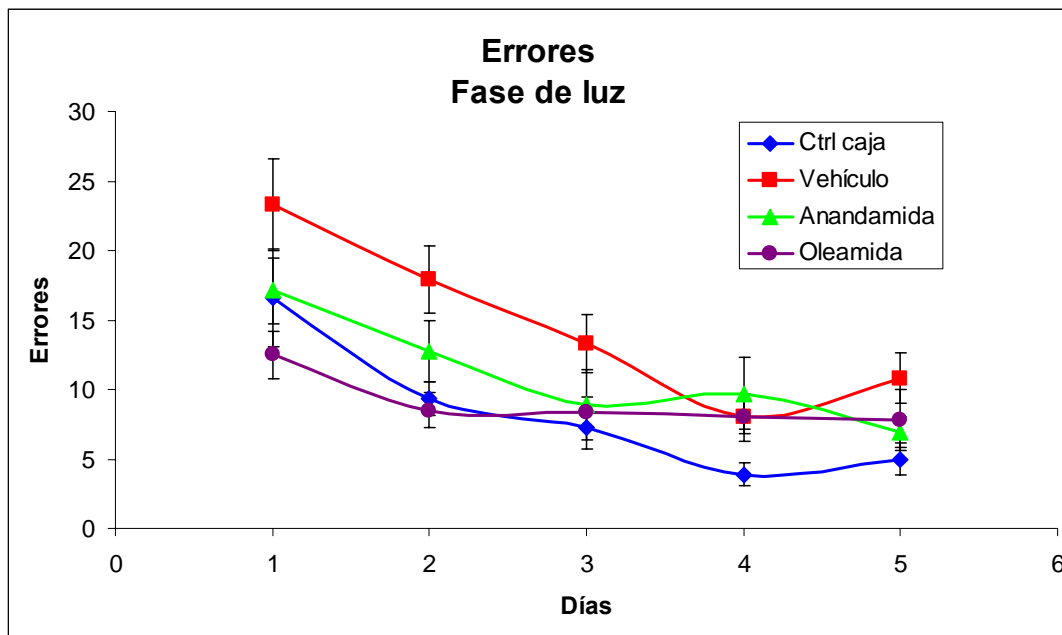


Gráfico 2. Promedio de errores que cometieron las ratas entrenadas a las 13:00 hrs.

Además, al no encontrar diferencias significativas en el número de errores cometidos entre los diferentes tratamientos, podemos aproximarnos al hecho de que la anandamida y la oleamida no afectan este parámetro de la prueba en la fase de luz de las ratas al ser administradas de manera crónica.

6.1.3. Perseverancias en laberinto de Barnes fase de luz

En el día 2 observamos diferencias significativas entre el control de caja respecto al grupo tratado con vehículo, y entre el tratamiento con oleamida y el de vehículo, presentando este último un número de perseverancias significativamente mayor respecto a las ratas control de caja y a las tratadas con oleamida. Las perseverancias reflejan el estado de la memoria de trabajo de las ratas en el laberinto de Barnes.

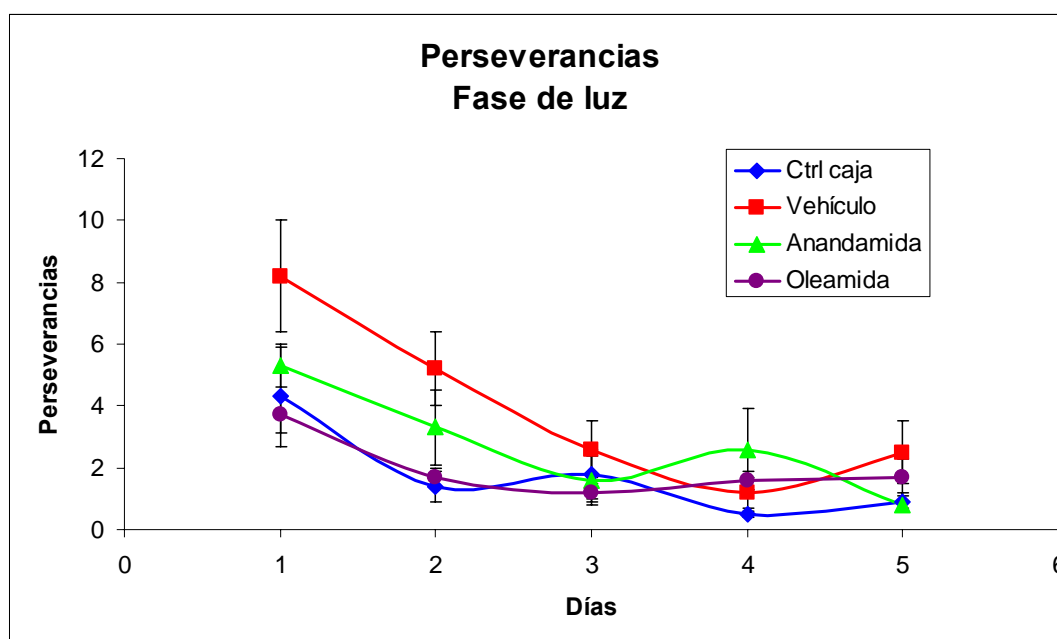


Gráfico 3. Promedio de perseverancias que cometieron las ratas entrenadas a las 13:00 hrs.

En las ratas tratadas con vehículo y en las control de caja aumenta el número de perseverancias hacia el último día de la prueba aunque éste no sea significativo, parecido al comportamiento en los errores para los mismos grupos en el *Gráfico 2*. Es interesante observar que el patrón de las curvas en el *Gráfico 3* es muy parecido al patrón del gráfico de los errores (*Gráfico 2*), la anandamida aumenta en el cuarto día las perseverancias para disminuirlas nuevamente en el quinto día, mientras que la oleamida permanece como una constante del tercero al quinto día. Respecto a las diferencias significativas, se presentan únicamente en el día 2, siendo nuevamente el vehículo el tratamiento que presenta un mayor número de perseverancias respecto al control de caja y a la oleamida, lo que nos podría sugerir que el etanol al 5% afecta la

memoria de trabajo únicamente en el día 2 de la prueba. Sin embargo, no podemos afirmar por un solo día que la memoria de trabajo se deteriora, puesto que en el resto de los días la tendencia de las curvas es parecida y sin diferencias significativas entre las medias. En general, parece que los endocannabinoides no deterioran la memoria de trabajo evaluada por el número de perseverancias en el laberinto de Barnes en ratas entrenadas a las 13:00 hrs. (fase de luz).

6.2. GRUPOS ENTRENADOS EN FASE DE OSCURIDAD

6.2.1. Tiempo de resolución en laberinto de Barnes fase de oscuridad

No se encontraron diferencias significativas en los tiempos de resolución entre los cuatro grupos probados en el laberinto de Barnes para la fase de oscuridad (Gráfico 4).

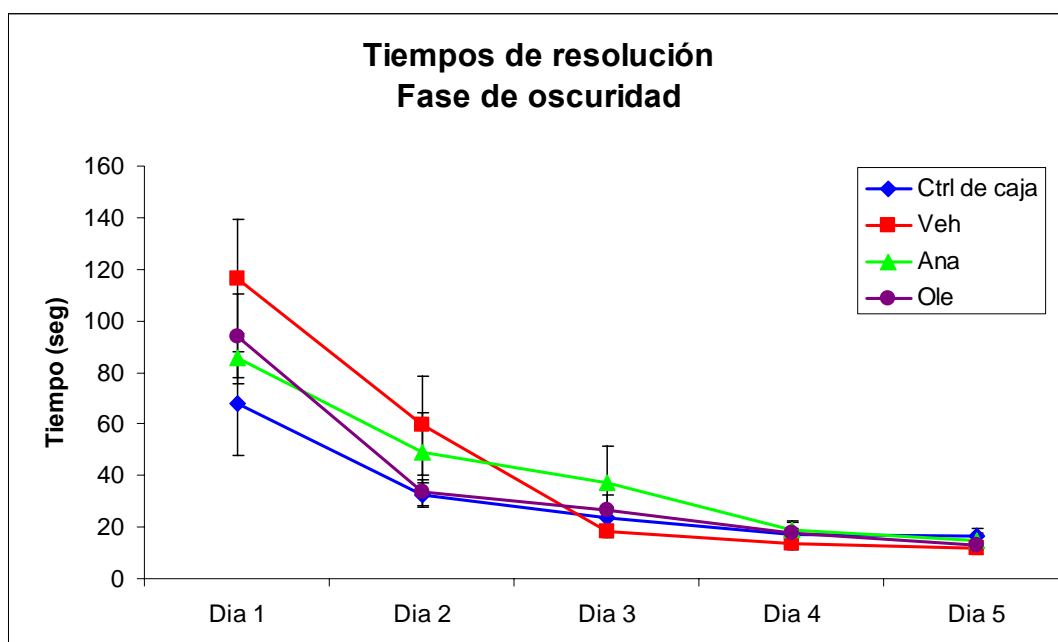


Gráfico 4. Tiempo promedio de las ratas en resolver el laberinto entrenadas a la 1:00 hrs.

En general, el patrón de descenso de las cuatro curvas es muy parejo y cercano, y tiende hacia un mínimo de errores para los tres días finales. Obsérvese que en los

primeros dos días el vehículo es el que más tiempo hace, aunque esta diferencia no alcance significancia en el análisis estadístico.

Sin embargo, esta diferencia disminuye rápidamente para los últimos tres días, encontrándose muy cercanos los valores entre los cuatro tratamientos, de lo cual podemos concluir que la administración crónica de anadamida, oleamida y vehículo no altera el tiempo de resolución en el laberinto de Barnes en ratas probadas en la fase de oscuridad (*Gráfico 4*).

6.2.2. Errores en laberinto de Barnes fase de oscuridad

No se encontraron diferencias significativas entre los cuatro tratamientos probados respecto al número de errores cometidos durante los cinco días del entrenamiento en el laberinto de Barnes en la fase de oscuridad. Se puede observar una tendencia a la disminución en el número de errores conforme pasan los días de entrenamiento. Se observa un comportamiento muy parecido en los grupos de anadamida y oleamida, aumentando ligeramente el número de errores en el día 3 para luego disminuir nuevamente en el día 4 y 5. Para el control de caja se observa una tendencia a permanecer constante en los errores a partir del día 2, como si disminuyera muy poco en los últimos tres días.

El vehículo es el que presenta una curva muy armoniosa, sin máximos ni mínimos, que se acerca de manera asintótica al eje de las X, lo que nos habla de que el vehículo en esta fase del ciclo disminuye de manera continua el número de errores (*Gráfico 5*).

De lo anterior concluimos que no se modifica el número de errores cometidos por las ratas en el laberinto de Barnes debido a la administración crónica de anadamida y oleamida.

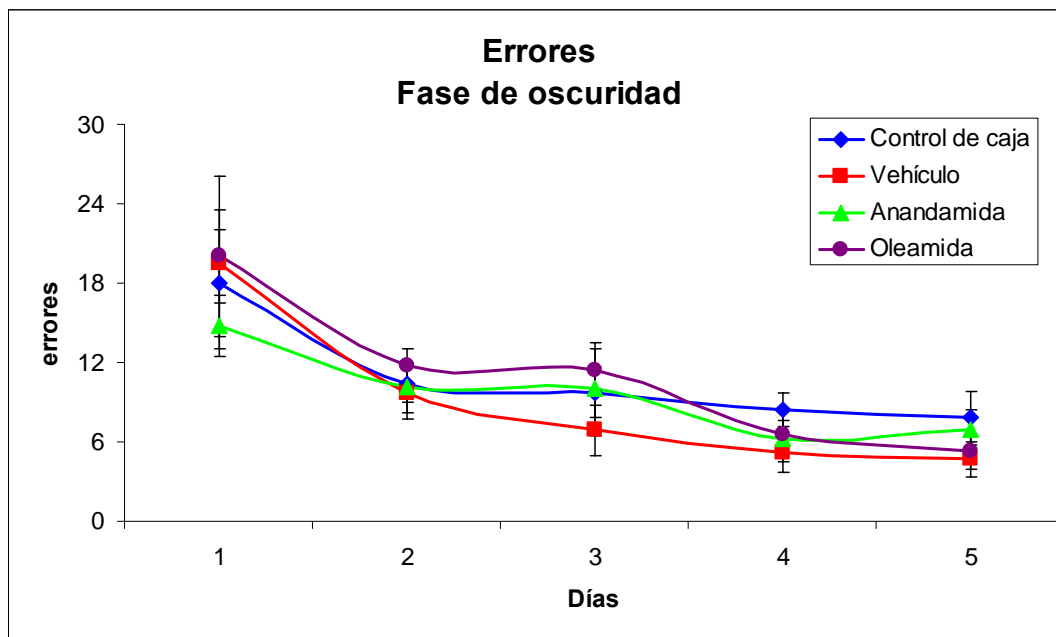


Gráfico 5. Promedio de errores que cometieron las ratas entrenadas a la 1:00 hrs.

6.2.3. Perseverancias en laberinto de Barnes fase de oscuridad

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos respecto al número de perseverancias para la fase de oscuridad en el laberinto de Barnes. Obsérvese la misma tendencia de aumentar el número de perseverancias hacia el tercer día para el grupo de anandamida y oleamida y en esta ocasión también para el control de caja respecto al número de errores presentado anteriormente (*Gráfico 5*). De igual forma que en el gráfico anterior, la curva del vehículo disminuye continuamente el número de perseverancias (“se acuesta” a partir del día 3), siendo la más parecida a una parábola. A pesar de estas observaciones en el comportamiento de las curvas, el análisis estadístico no muestra una alteración en la memoria de trabajo dada por la administración crónica de anandamida y oleamida, medida con el número de perseverancias en el Laberinto de Barnes en ratas entrenadas durante la fase de oscuridad (*Gráfico 6*).

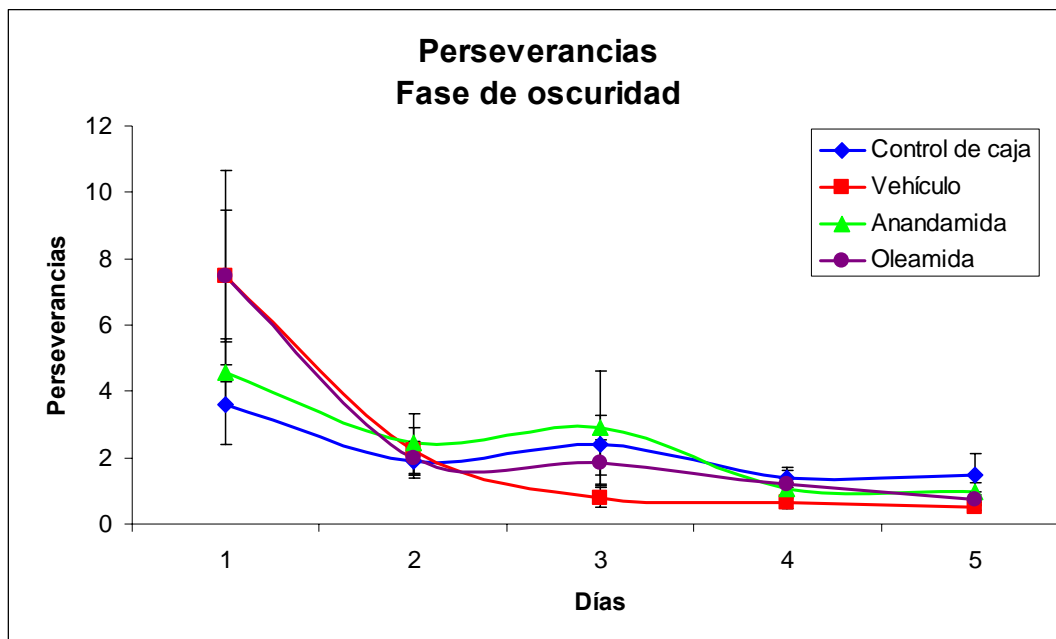


Gráfico 6. Promedio de perseverancias que cometieron las ratas entrenadas a la 1:00 hrs.

Como podemos observar, en la fase de oscuridad no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los tratamientos en los parámetros tiempo de resolución, número de errores y número de perseverancias en el laberinto de Barnes. Esto nos sugiere que la administración de anadamida, oleamida y etanol al 5% durante 15 días no afecta la ejecución de esta prueba que involucra al aprendizaje y la memoria en ratas administradas a las 7:00 horas y evaluadas a la 1:00 de la mañana. Podemos decir que con este tipo de paradigma conductual no observamos un deterioro en la memoria con un tratamiento crónico de endocannabinoides.

6.3. Incremento de peso y control motor

Se encontró una diferencia significativamente mayor de incremento de peso entre el grupo de oleamida respecto al del vehículo para la fase de luz, mientras que en la fase de oscuridad no se observó diferencia significativa en el incremento de peso entre los tratamientos (Gráfico 7).

El peso corporal inicial y final durante el tratamiento crónico con endocannabinoides es una forma de conocer el estado de salud de las ratas y también es una medida indirecta de la ingestión de alimento de las ratas. La disminución en la ingestión de alimento de las ratas puede relacionarse con el detrimento de sus capacidades motivacionales, las cuales podrían repercutir de manera negativa en la exploración y resolución del laberinto de Barnes.

En esta diferencia significativa de peso corporal de ratas administradas con oleamida respecto a las administradas con vehículo en la fase de luz se infiere un aumento en la ingestión de alimento. Está reportado que algunos cannabinoides como la oleamida aumentan el apetito de las ratas. Aquí comprobamos esto sólo para la oleamida y las ratas de fase de luz. Cabe mencionar que todas las ratas incrementaron su peso corporal, como era lo esperado en 15 días, hacia el final de la prueba dentro de los parámetros normales.

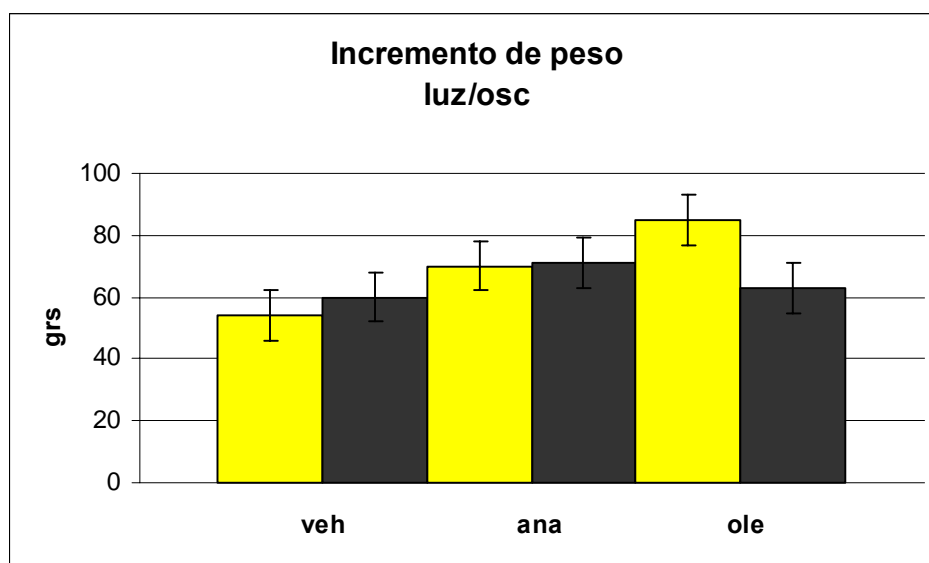


Gráfico 7. Incremento de peso para ambas fases del ciclo, las barras amarillas representan la fase de luz y las barras grises la fase de oscuridad.

En la prueba de Rota-Rod que evalúa el control motor, no se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos probados tanto en la fase de luz como en la de oscuridad. Lo cual indica que los cannabinoides endógenos administrados durante 15 días ICV no alteran el control motor de las ratas y descarta la posibilidad de

que si hubiera existido alguna alteración dada por el tratamiento crónico con estas sustancias, la causa fuera la alteración del sistema motor de los animales probados (Gráfico 8 y 9).

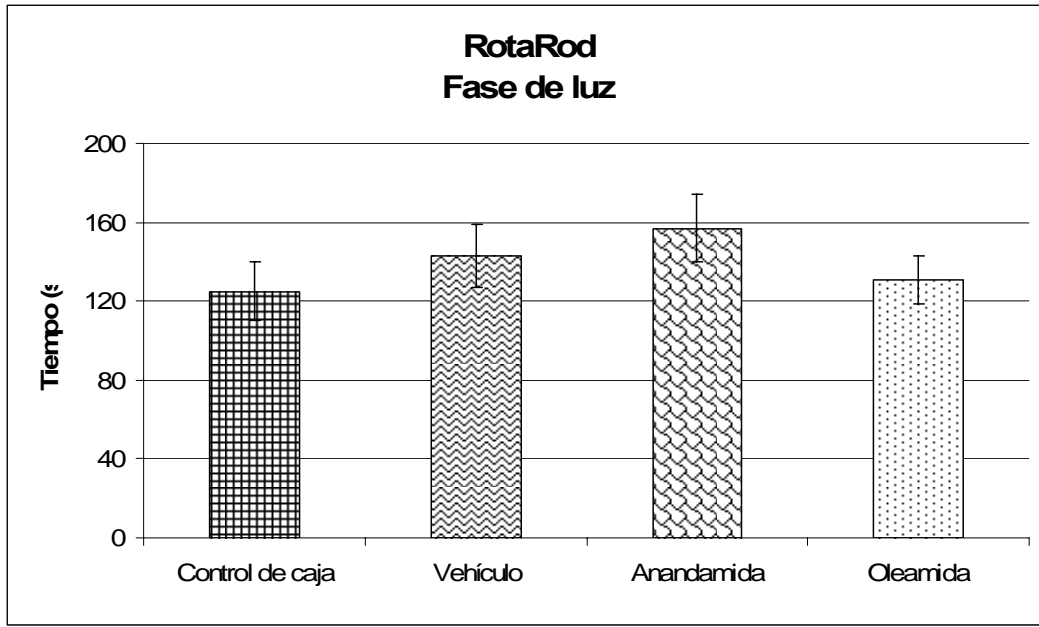


Gráfico 8. Control motor en fase de luz.

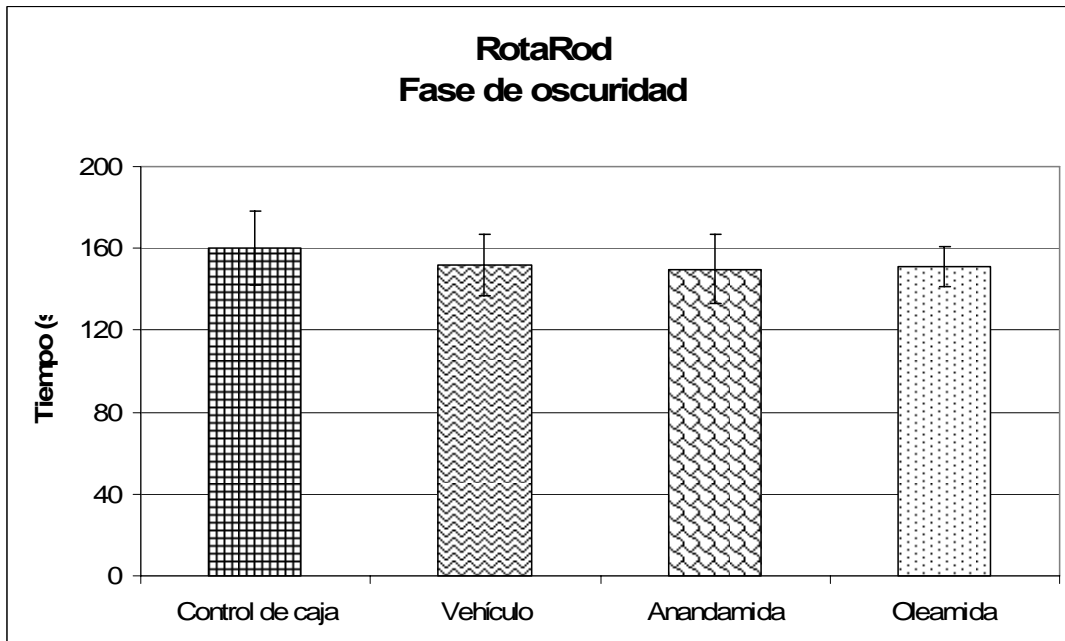


Gráfico 9. Control motor en fase de oscuridad.

6.4. Estrategias de resolución para el laberinto de Barnes

6.4.1. Dependencia de las estrategias respecto al tiempo y al tratamiento

Resultados para tablas de contingencia:

TABLA 1. Conteos observados y esperados para tabla de contingencia.

¿La estrategia depende del tiempo?

		Estrategia			TOTALES
		Tiempo (días)	ALEAT	SER	
OBS	1	120	13	27	160
ESP		96.2	24.8	39	160
OBS	2	112	21	27	160
ESP		96.2	24.8	39	160
OBS	3	86	40	34	160
ESP		96.2	24.8	39	160
OBS	4	79	31	50	160
ESP		96.2	24.8	39	160
OBS	5	84	19	57	160
ESP		96.2	24.8	39	160
TOTALES		962	248	390	1600

De acuerdo a los resultados de la prueba de ji cuadrada, ($X^2_{\text{calc}}=52.04 > X^2_{\alpha}=15.5$, g.l.=5, $p<0.05$), la estrategia usada por las ratas depende del día en el que éstas son entrenadas, es decir, que el día de la prueba está relacionado con el tipo de estrategia que las ratas usan para resolverla (si es el primer día del entrenamiento usarán mayoritariamente la estrategia aleatoria mientras a lo largo de los días de entrenamiento, 3º, 4º, 5º días, adoptarán una estrategia más eficiente, como lo serían la estrategia espacial o la estrategia serial).

TABLA 2. Conteos observados y esperados para tabla de contingencia.

¿La estrategia depende del tratamiento?

		Tratamiento				
	Estrategia	CTRL	VEH	ANA	OLE	Total
obs	ALEAT	109	127	120	124	1204
esp		302.35	299.95	298.74	302.95	
obs	SERIAL	28	41	28	25	314
esp		78.85	78.22	77.91	79	
obs	ESPACIAL	63	29	52	51	485
esp		121.79	120.83	120.34	122.04	
total		503	499	497	504	2003

Los resultados de esta prueba ($X^2_{\text{calc}}=733.7338 > X^2_{\alpha} = 12.59$, g.l.=4 $p<0.05$), muestran que la variable estrategia depende de la variable tratamiento. Esto nos sugiere que hay una relación entre el tipo de estrategia que usa la rata respecto al tipo de tratamiento que ésta recibe, es decir, que hay una incidencia directa del fármaco administrado, ya sea vehículo, anandamida u oleamida, sobre la manera en que los animales resuelven el paradigma conductual asignado.

Asimismo, el que la estrategia que usan las ratas dependa del número de días de entrenamiento (son cinco días de entrenamiento consecutivos), concuerda con las observaciones hechas por Carol Barnes en 1979 (creadora del laberinto de Barnes), en las cuales reporta que las ratas resuelven los primeros días del experimento el laberinto de una manera estocástica (estrategia aleatoria), mientras que al transcurrir los días de entrenamiento, las ratas presentan un patrón de exploración más o menos secuencial entre un agujero y el siguiente (estrategia serial), para que finalmente, en los últimos días (4º ó 5º días) los roedores se dirijan en forma mucho más directa hacia donde se encuentra la meta o túnel de escape (estrategia espacial). A pesar de que un análisis de datos categóricos con tabla de contingencia no es determinante, sí nos podemos aproximar al hecho de que la elección de la estrategia para resolver el laberinto está relacionada con el número de días en que la rata es entrenada (1º,2º,...,5º día de entrenamiento) así como con el tratamiento que se le aplica. El siguiente paso es analizar el porcentaje de cada estrategia usada para resolver el laberinto y si existe alguna relación entre la elección de una estrategia en particular con el ciclo luz-oscuridad de la rata.

6.4.2. Análisis de las estrategias utilizadas en la resolución del laberinto de Barnes

6.4.2.1. Estrategia Aleatoria, fase de luz

Se observa cómo la estrategia aleatoria es la preferida por las ratas en los primeros días de entrenamiento, y después cómo disminuye el porcentaje de su uso conforme transcurren los días de la prueba (Gráfico 10). Sin embargo, la disminución en el uso de estrategia aleatoria no es muy grande, en el grupo que se observa una mayor tendencia a disminuir la estrategia aleatoria es en el control de caja, pues el vehículo aunque presenta una tendencia a la disminución del día 1º al 4º, en el 5º se observa como si aumentara ligeramente su porcentaje. Por otro lado, los tratamientos con anandamida y oleamida también tienden a disminuir la frecuencia de estrategia aleatoria pero con diferencias muy pequeñas, específicamente el tratamiento con oleamida parece que no disminuye el porcentaje de estrategia aleatoria de manera notable, pues la línea de tendencia es prácticamente horizontal.

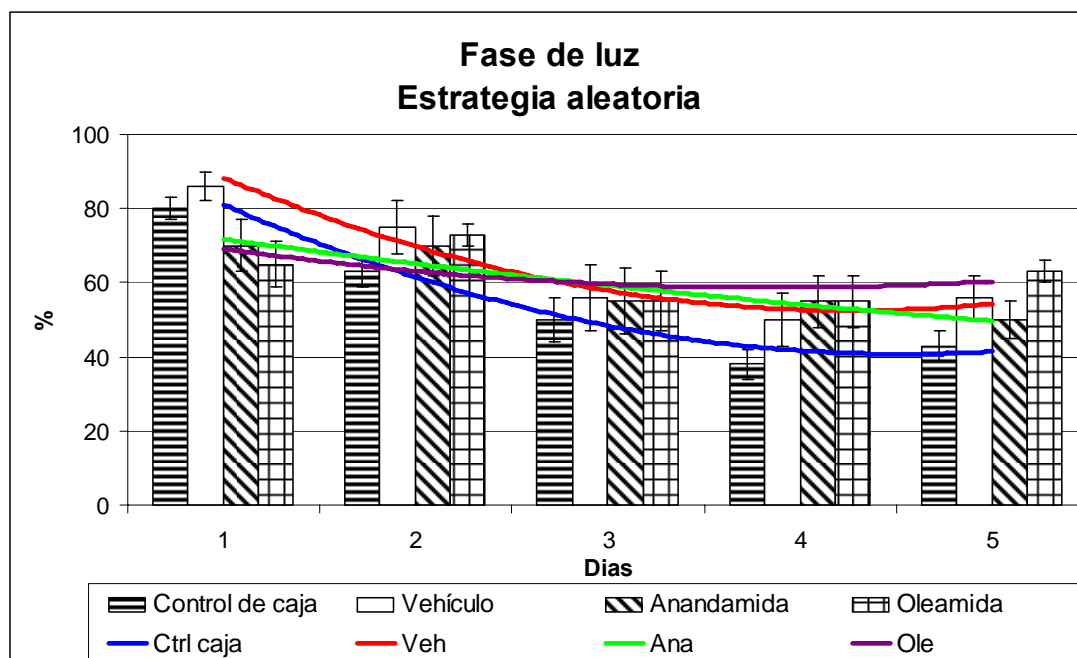


Gráfico 10. Porcentaje de estrategia aleatoria para fase de luz y líneas de tendencia polinómicas para cada tratamiento.

Lo anterior nos indica que los grupos administrados con endocannabinoides y el vehículo no presentan la clara y marcada tendencia a la disminución de la estrategia aleatoria conforme transcurren los días de la prueba como lo hace el control de caja. A pesar de que el análisis estadístico utilizado no arroja diferencias significativas entre los cuatro tratamientos, las líneas de tendencia nos proporcionan una aproximación a las diferencias que son observables a simple vista aunque no tengan significancia estadística. Esto nos podría sugerir que los tratamientos administrados con anandamida, oleamida y vehículo afectan la ejecución del laberinto en cuanto a que aumenta el porcentaje de estrategia aleatoria comparado con el control de caja conforme transcurren los días de la prueba.

6.4.2.2. Estrategia Serial, fase de luz

En el *Gráfico 11* podemos observar una tendencia a aumentar el porcentaje de estrategia serial a la mitad de la prueba (día 3) de los cuatro tratamientos y a disminuirla nuevamente para los días 4 y 5. Si trazamos líneas de tendencia polinómicas para cada tratamiento vemos parábolas que se abren hacia abajo, con el punto máximo en el día 3 y los mínimos en el primero y último días.

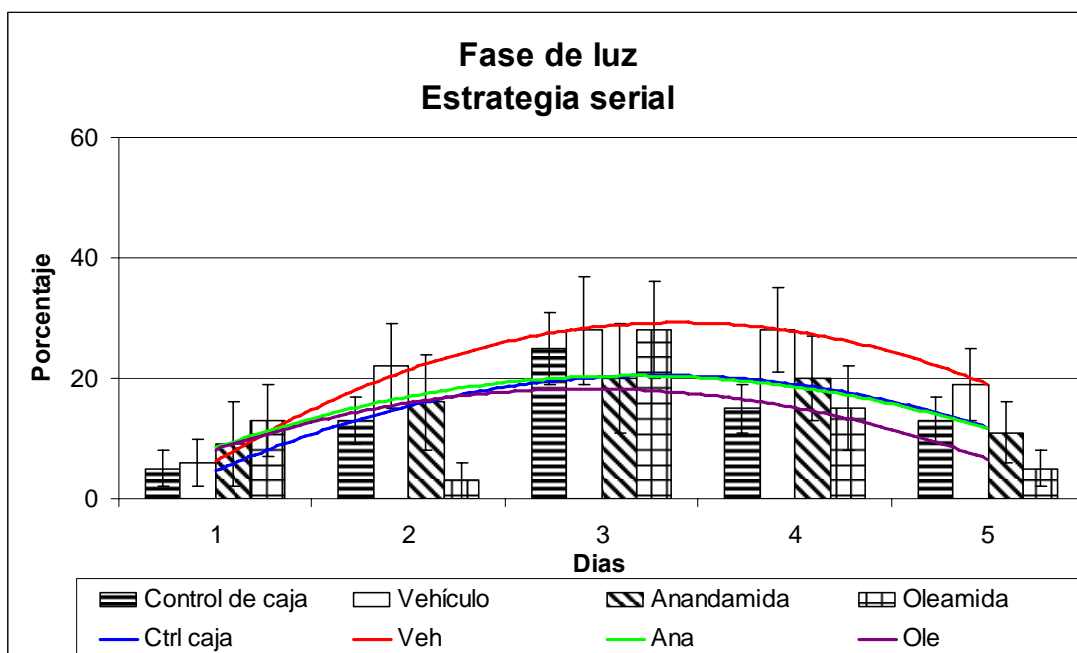


Gráfico 11. Porcentaje de estrategia serial para fase de luz y líneas de tendencia polinómicas para cada tratamiento.

Esta tendencia sugiere que la estrategia serial no es seleccionada por ninguno de los grupos tratados en la fase de luz, pues a pesar del aumento global del porcentaje en el día 3, éste vuelve a disminuir para el último día. El máximo porcentaje de estrategia serial es de 28% y lo presenta el tratamiento de vehículo en los días 3 y 4 y el de oleamida en el día 3.

6.4.2.3. Estrategia Espacial, fase de luz

En el *Gráfico 12* podemos ver una tendencia general en todos los grupos al aumento de la estrategia espacial conforme transcurren los días de entrenamiento. El grupo control de caja es el de mayor porcentaje (48% en el día 4 y 45% en el día 5), esto indica que las ratas sin ningún tratamiento resuelven de una forma más espacial durante la fase de luz.

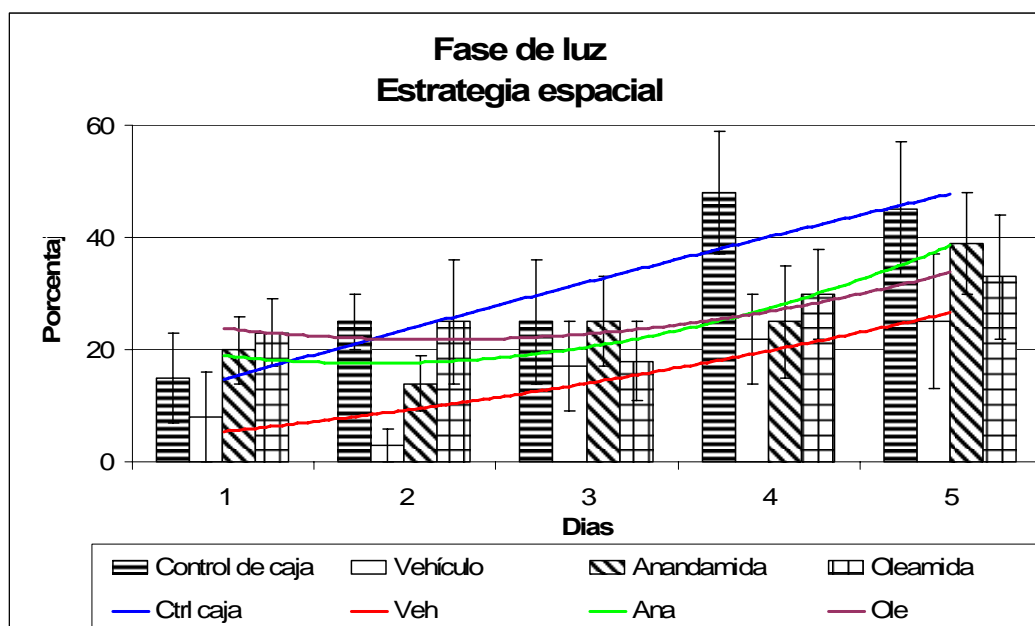


Gráfico 12. Porcentaje de estrategia espacial para fase de luz y líneas de tendencia polinómicas para cada tratamiento.

Por otro lado, a pesar de que el vehículo es el que presenta los valores más bajos en la estrategia espacial en la fase de luz, el comportamiento de la tendencia es creciente, con una pendiente similar a la del control de caja. Los grupos con

anandamida y oleamida se mantienen más o menos constantes en los primeros cuatro días y para el quinto día el de anandamida aumenta el porcentaje de estrategia espacial y el de oleamida aumenta en el 4º y 5º días. Estos últimos grupos presentan una tendencia a seleccionar la estrategia espacial hacia los últimos días aunque menor que la que presentan el control de caja y el vehículo.

6.4.2.4. Estrategia Aleatoria, fase de oscuridad

Se observa una tendencia general a disminuir el porcentaje de estrategia aleatoria conforme transcurren los días de entrenamiento para los cuatro tratamientos (Gráfico 13). La más marcada la presentan el vehículo y el tratamiento con oleamida. Sin embargo para el control de caja y la anandamida se observa una tendencia a permanecer constante el uso de la estrategia aleatoria a lo largo de los días del entrenamiento (líneas azul y verde, Gráfico 13). No sabemos a qué se deban estas diferencias que a pesar de que no alcanzan significancia en las pruebas estadísticas usadas, nos dan una idea de que el vehículo y la oleamida reducen más su preferencia por la estrategia aleatoria, mientras que para el control de caja y la anandamida, esta reducción en la estrategia aleatoria es casi imperceptible.

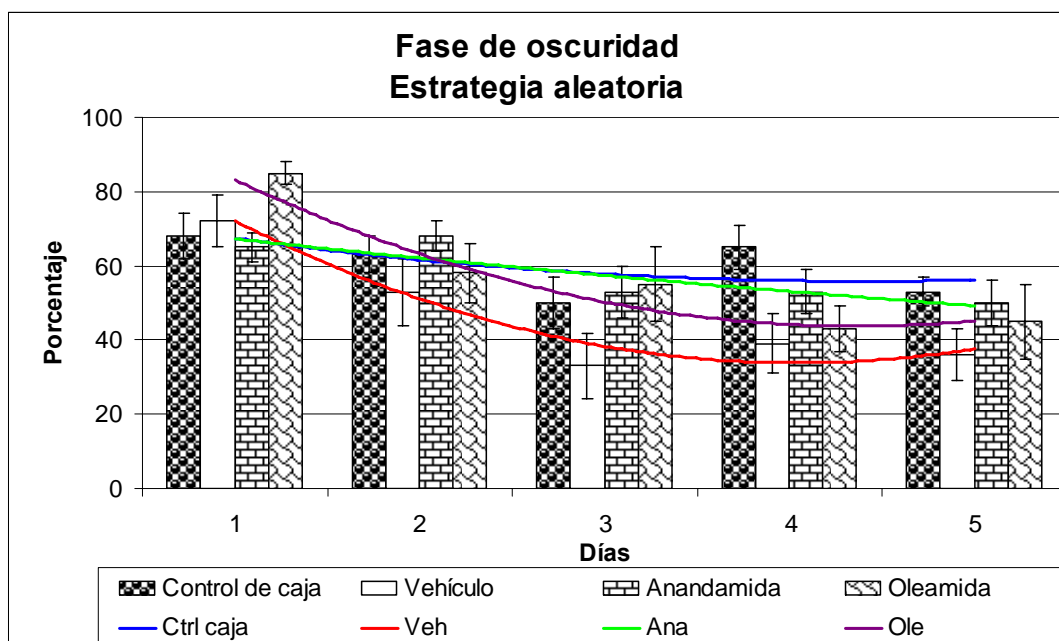


Gráfico 13. Porcentaje de estrategia aleatoria para la fase de oscuridad y líneas de tendencia para cada tratamiento.

6.4.2.5. Estrategia Serial, fase de oscuridad

En la fase de oscuridad se observa un bajo porcentaje de estrategia serial para todos los grupos durante los cinco días del entrenamiento. El grupo de ratas que resolvió con el mayor porcentaje de estrategia serial fue el administrado con oleamida con un 33% en el día 2, sin embargo, este porcentaje decrece rápidamente en los días subsiguientes acabando en 13% para el último día. El control de caja se mantiene muy constante en 15% los días 3, 4 y 5. El grupo con anandamida también se mantiene muy constante a lo largo del tiempo. En general, observamos que la estrategia serial no es la más utilizada por las ratas en la fase de oscuridad para resolver el laberinto, ya que los porcentajes son bajos en todos los tratamientos (*Gráfico 14*). Si trazamos para el caso de la oleamida una línea de tendencia polinomial, se observa una parábola que abre hacia abajo, parecida al vehículo en la fase de luz (*Gráfico 11*); parecería que estos dos grupos (veh/luz y ole/osc) aprenden primero con la estrategia serial y después seleccionan la estrategia espacial (ver gráficas 12 y 15). Para los grupos restantes no se presenta esta tendencia, sino que se observa algo cercano a una función constante (una línea recta horizontal), pues los valores en porcentaje varían muy poco entre uno y otro día para los tratamientos con anandamida, vehículo y control de caja.

Podemos concluir entonces que la estrategia serial no es seleccionada por las ratas en fase de oscuridad para resolver el laberinto en ninguno de los tratamientos analizados.

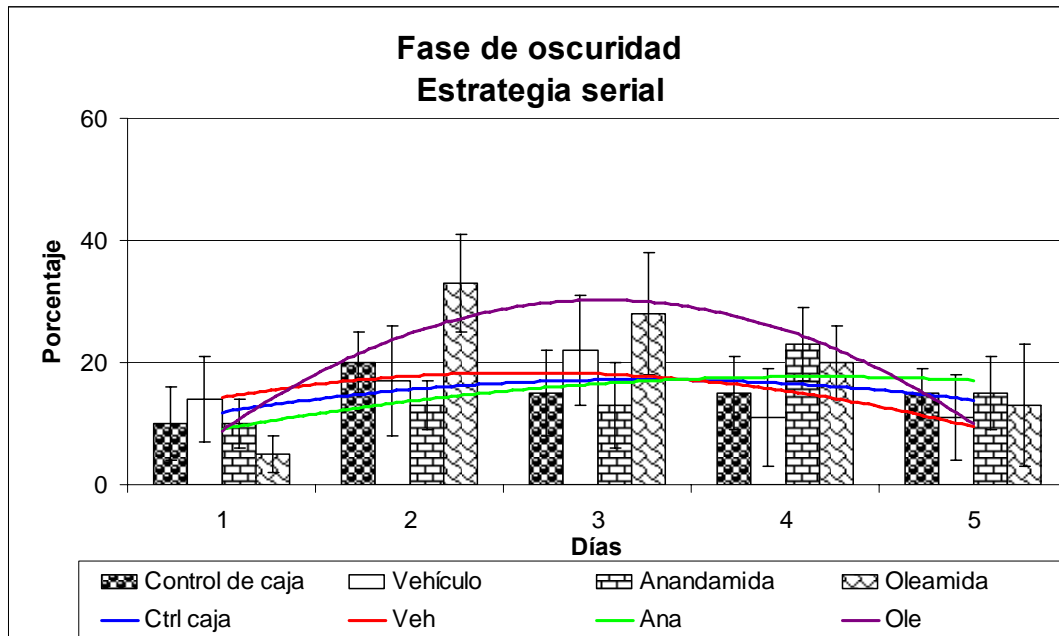


Gráfico 14. Porcentaje de estrategia serial para la fase de oscuridad y líneas de tendencia.

6.4.2.5. Estrategia Espacial, fase de oscuridad

En el grupo del vehículo se observan los mayores porcentajes de estrategia espacial (53% en el 5º día) y una tendencia creciente a seleccionar ésta conforme transcurren los días de entrenamiento. En el grupo con oleamida también se observa esta tendencia creciente hacia la estrategia espacial aunque los valores son menores que los del vehículo (43% en el 5º día). Los grupos control de caja y anandamida presentan valores muy cercanos en todos los días y no eligen la estrategia espacial para resolver el laberinto. Se ve cómo hacia el día 3 aumentan ligeramente la estrategia espacial pero luego vuelven a disminuirla en el 4º día y a aumentarla muy poco para el 5º día (Gráfico 15). Con las líneas de tendencia se observa cómo no hay cambios significativos en el uso de la estrategia espacial en la fase de oscuridad por los grupos control de caja y anandamida. En cambio, los grupos de oleamida y vehículo en la fase de oscuridad adoptan la estrategia espacial de manera creciente para la resolución del laberinto de Barnes (líneas naranja y morada).

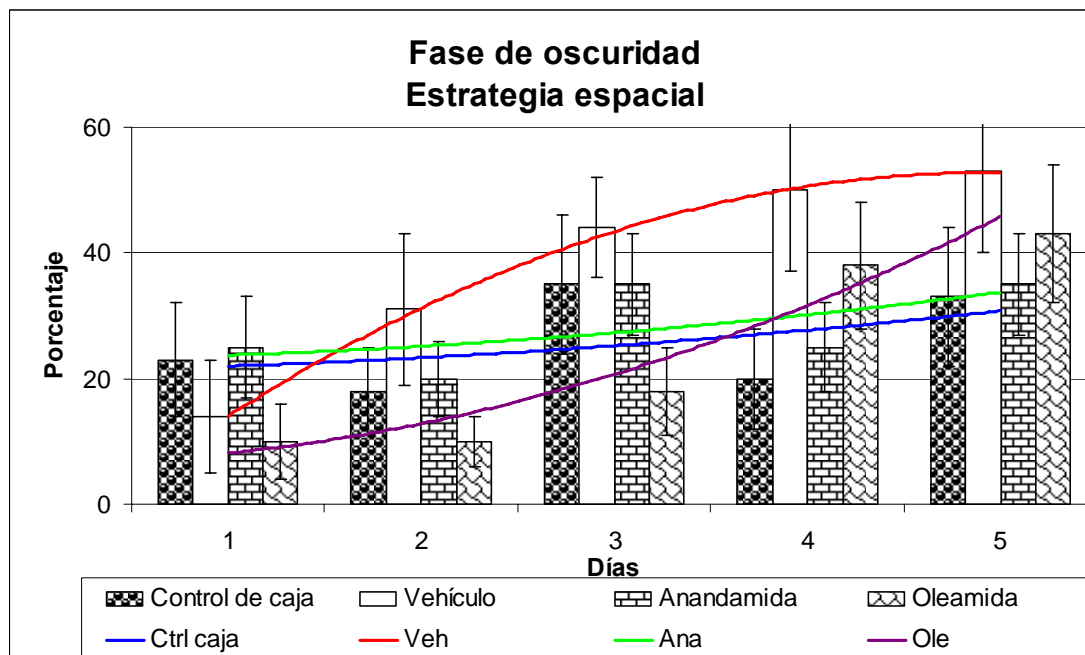


Gráfico 15. Porcentaje de estrategia espacial para la fase de oscuridad y líneas de tendencia.

7. Discusión y conclusiones

En esta investigación, observamos que la administración crónica de anandamida y oleamida ICV no afecta el aprendizaje de las ratas, pues no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en ratas entrenadas en las dos fases del ciclo luz-oscuridad respecto a la evaluación de los parámetros tiempo de resolución, número de errores y número de perseverancias, los cuales reflejan la **cantidad de la respuesta**¹ en esta prueba de memoria llamada laberinto de Barnes.

Un trabajo de Rueda-Orozco, et al., en el 2007, en el que realizó administraciones intrahipocampales e intraestriatales de anandamida a concentraciones de 0.5µg, 1µg y 2µg a ratas que fueron administradas inmediatamente después del entrenamiento en el laberinto de Barnes (afectando la consolidación), mostró que no hubo efecto del tratamiento en el tiempo de ejecución o total de errores durante la fase de luz o de oscuridad del ciclo, semejante a los resultados que describe este trabajo.

¹ La cantidad de la respuesta es un parámetro de evaluación cuantitativo y puede ser la tasa de respuesta (ver justificación, pág. 32). En el laberinto de Barnes una forma de medir la cantidad de la respuesta es con el número de errores, perseverancias y tiempo de resolución.

Suponiendo que una estrategia es mejor que otra para la resolución del laberinto (estrategia espacial y serial mejor que estrategia aleatoria), tomamos el tipo de estrategia usada como **la calidad de la respuesta de la rata**². En esta investigación, en el grupo de ratas control de caja de fase de luz se observó una tendencia a elegir la estrategia espacial, sin embargo, en las ratas control de caja que fueron evaluadas en la oscuridad no se observó tendencia alguna hacia la elección de una estrategia espacial o serial. Cabe mencionar que las ratas control de caja de ambas fases del ciclo no usaron de manera importante la estrategia serial para resolver el laberinto.

En sus resultados, Rueda-Orozco (2007) mostró una elección de estrategias dependiente del ciclo luz-oscuridad. Las ratas del grupo control (inyectadas con DMSO como vehículo en el hipocampo) mostraron una preferencia significativa por la estrategia espacial en la fase de luz del ciclo, mientras que las que fueron entrenadas durante la fase de oscuridad mostraron una inclinación para resolver el laberinto de forma serial. Al administrarles a las ratas 1µg y 2µg respectivamente de anandamida en el hipocampo, Rueda-Orozco observó una disminución significativa de la estrategia espacial en la fase de luz, y un aumento en el porcentaje de la estrategia serial utilizada respecto a los grupos control. Mientras que durante la fase de oscuridad no se encontraron efectos significativos de la anandamida sobre la estrategia (Rueda-Orozco et al., 2007).

Sin embargo, en la presente investigación, las ratas de fase de luz, administradas de manera crónica con ANA, OLE y VEH, mostraron la misma tendencia que los controles de caja a resolver el laberinto usando en mayor porcentaje la estrategia espacial, lo cual demuestra que no existe un efecto de los endocannabinoides administrados crónicamente en la elección de una u otra estrategia para la ejecución de la tarea, o que se desarrolla tolerancia a los efectos de los endocannabinoides sobre la memoria en el laberinto de Barnes. Lo anterior nos habla de que el momento en el que se administra un fármaco es crucial para lo que se desea obtener, ya que Rueda-Orozco (2007) administró a las ratas inmediatamente después de la prueba de Barnes, afectando la consolidación de la memoria. Además de que el lugar donde administró el

² La calidad de la respuesta es la precisión con que el sujeto ejecuta la prueba. En este caso medida con el tipo de estrategia utilizada partiendo del hecho que la manera espacial o serial de resolver el laberinto requieren de una mayor "precisión" por parte de la rata respecto a la forma aleatoria.

canabinoide (ANA) fue el hipocampo directamente, mientras que nosotros lo hicimos en el líquido cefalorraquídeo presente en los ventrículos cerebrales, pudiendo afectar a otras estructuras involucradas con la memoria que expresan el CB1 (estriado, cerebelo, amígdala y corteza cerebral) además del hipocampo.

Durante la fase de oscuridad, los grupos administrados con oleamida y vehículo mostraron una tendencia a resolver con estrategia espacial mientras que el grupo administrado con anandamida y el control de caja no seleccionaron ni la estrategia espacial ni la estrategia serial, de hecho, estos grupos utilizaron mayoritariamente la estrategia aleatoria. En contraposición con los resultados de Rueda-Orozco, en los que se mostró una mayor expresión de la estrategia serial para la fase de oscuridad en el grupo control y una consecuente disminución de la misma al administrar anandamida 2µg, además de aumentar la expresión de la estrategia espacial a esta misma concentración de endocanabinoide.

De lo anterior se puede concluir que las ratas de los cuatro tratamientos (no administradas y administradas), mostraron una tendencia a resolver de manera espacial el laberinto para la fase de luz. Por otra parte, en la fase de oscuridad los tratamientos de OLE y VEH eligieron la estrategia espacial, mientras que el grupo administrado con ANA y el control de caja resolvieron usando en su mayoría la estrategia aleatoria para la resolución de la prueba. Por último, en ninguna fase del ciclo y para ningún tratamiento se observó la elección de la estrategia serial.

Se sabe que la actividad del hipocampo está relacionada con la memoria espacial. En términos específicos correspondería a un aprendizaje espacial en el laberinto de Barnes. Por otra parte, la actividad del caudado-putamen (núcleo estriado) está relacionada con la memoria de procedimiento, llamada también aprendizaje de respuesta, y que corresponde a la resolución del laberinto utilizando la estrategia serial. Si esto es así, podríamos explicar que el aprendizaje espacial es seleccionado por las ratas que no reciben ningún tratamiento y son entrenadas en la fase de luz. Tal vez a las 13:00 hrs. está más activo el hipocampo.

De acuerdo a lo anterior podríamos decir que el hipocampo está más activo en las horas de luz de la rata, a pesar de que ésta sea la fase en la que ellas duermen la mayor parte del tiempo. Recuérdese que el CB1 se expresa mayoritariamente a las

13:00 hrs. y su ligando endógeno anandamida presenta su mínima expresión a esta misma hora (ver introducción, Fig. 2 y 3). Lo cual quiere decir que si el hipocampo expresa un mínimo de ANA a las 13:00 hrs. (hora en que se evalúa a la rata en el laberinto de Barnes), y es a esta hora cuando todos los tratamientos presentan una preferencia por el aprendizaje espacial, entonces supondríamos que los receptores CB1 se encuentran inactivos por la ausencia de su ligando, lo que facilitaría el aprendizaje espacial. Existen reportes en la literatura que dicen que los cannabinoides son inhibidores tanto de la excitación como de la propia inhibición, y que inactivan o modulan a la baja la función del hipocampo. Nótese que solamente estamos hablando de la expresión de un solo ligando endógeno a diferentes horas del día (ANA). Si buscamos las variaciones diurnas de otros ligandos del CB1 como el 2-AG, encontramos que éste tiene una expresión mayor en el hipocampo durante la fase de luz (Valenti et al., 2004), contrario a lo que esperaríamos si su expresión fuera igual que la de anandamida.

Por otro lado, no debemos olvidar que el aprendizaje espacial puede involucrar otras estructuras además del hipocampo. Un estudio realizado por Colombo y Gessa en el 2004, en el que entrenaron a ratas para resolver el laberinto acuático de Morris con una estrategia espacial y una de respuesta, observaron cómo se activaban tanto el hipocampo como el estriado a lo largo de los días de la prueba para estos dos tipos de aprendizaje; mostraron que el hipocampo se activa durante los primeros días de la prueba (cuando las ratas están aprendiendo de manera espacial), mientras que hacia el final de los días de la prueba, es el núcleo estriado el que se activa y el hipocampo disminuye su actividad, aún cuando la rata sigue resolviendo de manera espacial. Es como si aprendieran con el hipocampo y después le “pasaran” la función al estriado. Esto nos podría estar hablando de una intrincada relación hipocampo – estriado difícil de separar.

Cabe subrayar que en nuestros resultados no se observa diferencia entre tratamientos y grupo control de caja para la fase de luz, lo que sugiere un posible desarrollo de tolerancia por parte de los grupos administrados. Además, si se presentara un efecto dado por anandamida u oleamida se esperaría que su administración provocara una disminución en la activación del hipocampo y una

consecuente disminución del uso de la estrategia espacial. También se podría dar un detrimento en la ejecución del laberinto de Barnes, dado por un cambio en la curva de aprendizaje (aumento en el número de errores y perseverancias o aumento en el tiempo de ejecución de la prueba), sin embargo, esto no es así.

Por otro lado, los grupos probados en la oscuridad presentan controversia, pues se esperaría que el grupo control de caja adoptara una estrategia más eficiente para resolver el laberinto (espacial o serial). Sin embargo esto no es así, este grupo junto con el de ANA no eligen una estrategia eficiente y resuelven en su mayoría aleatoriamente. Por el otro lado, los grupos VEH y OLE resuelven mayoritariamente con estrategia espacial, suponiendo una mayor actividad del hipocampo, el control de caja y el tratamiento con ANA, al no seleccionar esta estrategia en la fase de oscuridad reflejarían una menor actividad de esta estructura. Si en las ratas control entrenadas en la fase de oscuridad (a la 1:00 hrs.) está inhibida la actividad del hipocampo por la gran expresión del ligando endógeno anandamida sintetizado de manera natural (ver Figs. 2 y 3), tal vez en las ratas administradas con anandamida disminuye aun más la actividad del hipocampo y por lo tanto continúa inhibido el aprendizaje espacial. En cambio, las ratas administradas con etanol al 5% (VEH) y con OLE tienden a resolver el laberinto de forma espacial porque tanto el etanol como la OLE podrían estar facilitando el aprendizaje espacial.

También podría ser que en el tratamiento con ANA las ratas desarrollan tolerancia y se comportan parecidas a las controles de caja. Sin embargo, los tratamientos con OLE y VEH no desarrollarían tolerancia a esta hora del ciclo luz-oscuridad ejerciendo un efecto contrario al de los controles de caja, usando así más la estrategia espacial a la 1:00 hr.

Siendo el CB1 un modulador de la inhibición o la excitación, según su localización célula-específica, se podría pensar que la actividad del núcleo estriado de la rata es mayor en la mitad de la prueba (en el caso de OLE y VEH mayor porcentaje de estrategia serial en el día 2 y 3) y después le “transfiere” la actividad al hipocampo hacia los últimos días y por esto los tratamientos con oleamida y vehículo resuelven hacia los últimos días con estrategia espacial. Tal vez simplemente se selecciona la estrategia espacial hacia el final de los días de entrenamiento porque con ésta las ratas

resuelven el laberinto en menos tiempo, ahorrando así energía (la estrategia menos costosa energéticamente hablando). Quizá es la manera más práctica y eficiente de resolver la prueba en términos globales, aunque hemos observado en la práctica, que usando la estrategia serial e inclusive la aleatoria pueden llegar a hacer tiempos tan reducidos como los que hacen usando la estrategia espacial (i.e. 8 s).

Las diferencias que se observaron entre algunos de los tratamientos en cuanto a las estrategias utilizadas, no son consistentes para todos los días del entrenamiento. Así pues con el análisis realizado anteriormente podemos concluir de manera global que la administración crónica de endocannabinoides no altera o modifica la elección de las estrategias en el laberinto de Barnes.

Asimismo, para los parámetros tiempo de resolución, número de errores y perseverancias no se observaron cambios importantes entre los diferentes tratamientos y el control de caja, por lo que concluimos que la administración crónica de anandamida y oleamida no disminuye la tasa de respuesta en el laberinto de Barnes. Por lo tanto, se concluye de manera global que durante la administración crónica de ANA y OLE las ratas desarrollan tolerancia a los efectos que estos cannabinoides ejercen sobre una tarea de aprendizaje espacial y de respuesta.

APÉNDICE

¹¹ Una **tarea de discriminación compleja** tiene como base al condicionamiento operante. La prueba de discriminación (operant testing) ha existido desde la década de 1940 y se asocia con los experimentos de B.F. Skinner. El entrenamiento y los principios de las pruebas que se usan para probar a los roedores en la prueba de discriminación se aplican a la mayoría de los organismos, incluyendo los humanos. En esencia, en el condicionamiento operante, un reforzador positivo tenderá a incrementar la probabilidad de que el evento anterior ocurra de nuevo. Dentro del aparato de la prueba de discriminación, se entrena a un roedor a presionar una palanca, acción que es seguida por un reforzador positivo (comúnmente una pequeña cantidad de agua o comida). Una vez que se establece en el roedor la conducta de presionar la palanca, las conductas asociadas con esta última pueden ser alteradas de manera dramática para adaptarse a las necesidades del experimentador. (<http://www.usm.edu/neurolab/OperantChambers.html>)

¹² Las **tareas de adquisición repetida** varían de un experimento a otro. La adquisición se mide de acuerdo a la reducción en el número de errores en cada sesión de la tarea. En este ejemplo los monos adquirieron una secuencia de tres respuestas diferentes cada sesión y la respuesta se mantuvo con la presentación de comida bajo 5 itinerarios de segundo orden de razón fija. En otro ejemplo (Klapdor K., 1998) podemos mencionar la tarea de escape del laberinto acuático de Morris. Esta tarea de adquisición repetida, consiste de ensayos pares en los cuales el animal comienza dos veces desde el mismo punto de partida y nada, guiándose por claves espaciales colocadas en el cuarto de experimentación, hasta encontrar la plataforma en donde estará "a salvo". El objetivo es que los animales hagan el menor tiempo para encontrar la plataforma en el segundo de los dos ensayos. En este ejemplo, ratones de la cepa C57BL macho fueron entrenados en esta tarea con ensayos masivos espaciados o espaciados con retardo en los cuales había un retardo de 90 minutos entre el primero y el segundo ensayo. Los ratones entrenados con ensayos espaciados aprendieron la tarea de adquisición repetida, mientras que los ratones con ensayos masivos o espaciados con retardo no fueron consistentes en haberlo hecho. Una vez que se obtiene una ejecución basal estable, se realiza el evento a evaluar que pretenda interrumpir este proceso (puede ser la oclusión de cierta arteria, la administración de algún fármaco de abuso, etc.).

¹³ En cada componente de una lista múltiple, los sujetos completaron una secuencia diferente de 10 respuestas usando tres teclas de un teclado numérico. En el componente de adquisición, los sujetos aprendieron una nueva secuencia con cada serie de 20 ensayos. En el componente de ejecución, la secuencia permaneció constante durante el estudio. Las escalas de la lista múltiple y de valoración se presentaron antes de la droga, después de la droga, y en intervalos de 30 minutos a partir de entonces por 5 horas. El THC (10-20 mg. p.o.) aumentó el pico del porcentaje de errores durante el componente de adquisición de 7.0% a 9.3%, pero la respuesta durante el componente de ejecución permaneció sin cambio.

¹⁴ Las sustancias capaces de provocar dependencia inducen un fenómeno llamado "tolerancia", que consiste en la disminución de los efectos típicos de una sustancia cuando se usa de manera regular, o bien, un efecto que se mantiene similar aún cuando se aumenta la cantidad de sustancia (es.wikipedia.org). La tolerancia aparece sobre algunos efectos de las sustancias psicoactivas y no sobre otros (es.wikipedia.org). La tolerancia se desarrolla cuando las neuronas ajustan tanto el número de receptores como la trasducción de la señal a la administración crónica de canabinoides (Howlett, 2004). En la administración crónica de Δ^9 -THC, la tolerancia se observa cuando los sujetos se adaptan a su nuevo estado (alostasis) y pueden resolver una tarea que involucre a la memoria de la misma manera que los sujetos control.

¹⁵ Además del porcentaje total de igualación correcta, se registraron otras medidas dependientes durante el experimento, como cuánto tardaban en responder a la muestra y a la elección de estímulos y el número de ensayos de igualación a la muestra completados cada sesión. No se observaron efectos confiables entre los grupos para ninguna de estas medidas dependientes durante las fases de tratamiento y post-tratamiento. También se pesó a los animales cada semana durante el experimento y se les proporcionaron rutinas físicas periódicas en intervalos de cuatro meses. Ninguno de estos procedimientos incluyendo observaciones gruesas del comportamiento general y disposición de cada animal proporcionaron evidencia que sugiriera la ocurrencia de efectos de largo plazo relacionados con la droga.

Referencias

1. Adams, I.B., Martin, B.R. 1996. **Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans.** *Addiction*. 91:1585-1614.
2. Aigner, T.G. 1988. **Delta-9-tetrahydrocannabinol impairs visual recognition memory but not discrimination learning in rhesus monkeys.** *Psychopharmacology (Berlin)* 95: 507-511.
3. Alger, B.E., Pitler, T.A. 1995. **Retrograde signaling at GABA_A-receptor synapses in the mammalian CNS.** *Trends in Neuroscience*. Vol. 18, No. 8: 333-340.
4. Baddeley, A. 1998. **Memoria Humana.** McGraw-Hill, 496 pp.
5. Baddeley, A. 2003. **Working memory: looking back and looking forward.** *Nature Reviews*, 4:829-839.
6. Barnes C.A. 1979. **Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat.** *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 93,1: 74-104.
7. Beardsley P.M., Martin, B.R. 2000. **Effects of the cannabinoid CB(1) receptor antagonist, SR141716A after Delta(9)-tetrahydrocannabinol withdrawal.** *European Journal of Pharmacology* 387:47-53
8. Branch, M.N., Dearing., M.E., Lee, D.M. 1980. **Acute and chronic effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on complex behavior of squirrel monkeys.** *Psychopharmacology (Berlin)*. 71: 247-256.
9. Breivogel, C.S., Childers, S.R., Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., Vogt, L.J., Sim-Selley, C.J. 1999. **Chronic Δ^9 -tetrahydrocannabinol treatment produces a time-dependent loss of cannabinoid receptors and cannabinoid receptor-activated G proteins in rat brain.** *Journal of Neuroscience*. 73: 2447-2459.
10. Campbell, K.A., Foster, T.C., Hampson, R.E., Deadwyler, S.A. 1986. **Δ^9 -THC differentially affects sensory-evoked potentials in the rat dentate gyrus.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239:936-940.
11. Chait, L.D., Pierri, J. 1992. **Effects of smoked marijuana on human performance: a critical review.** *En Marijuana/cannabinoids: Neurobiology and neurophysiology.* Murphy, L., Bartke, A. (eds.) pp. 387-423. CRC Press, Boca Raton, FL.
12. Chait, L.D., Perry, J.L. 1994. **Acute and residual effects of alcohol and marijuana, alone and in combination, on mood and performance.** *Psychopharmacology*. 115: 340-349.
13. Co, B.T., Goodwin, D.W., Gado, M., Mikhael, M., Hill, S.Y. 1997. **Absence of cerebral atrophy in chronic cannabis users by computerized transaxial tomography.** *Journal of the American Medical Association*. 237: 1229-1230.
14. Cravatt, B.F., Prospero-Garcia, O., Siuzdak, G., Gilula, N.B., Henriksen, S.J., Boger, D.L., Lerner, R.A. **Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep.** 1995. *Science*. 268:1506-1509.
15. Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B. 1996. **Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides.** *Nature*. 384:83-87.
16. Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., Mu, J., Whyte, A., Childers, S. 1995. **Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A current in hippocampal neurons via a cAMP-**

- dependent process. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 273: 734-743.
17. Devane, W.A., Dysarz; F.A., Johnson, M,R., Melvin, S.L., Howlett, A.C. 1988. **Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain.** *Molecular Pharmacology*. 34:605-613.
 18. Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R. 1992. **Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.** *Science*. 258:1946-1949.
 19. Dewey, W.L. 1986. Cannabinoid pharmacology. *Pharmacological Review*. 38: 151-178.
 20. Delatte, M.S., Winsauer, P.J., Moerschbaecher, J.M. 2002. **Tolerance to the disruptive effects of Δ^9 -THC on learning in rats.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 74, 129-140.
 21. Diana, M., Levenes, C., Mackie, K., Marty, A. 2002. **Short-term retrograde inhibition of GABAergic synaptic currents in rat Purkinje cells is mediated by endogenous cannabinoids.** *Journal of Neuroscience*. 22:200-208.
 22. Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., De Petrocellis, L. 1998. **Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action.** *Trends in Neuroscience*. 21(12): 521-528.
 23. Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R. 1992. **Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.** *Science* 258:1946-1949.
 24. Egashira, N., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M. 2002. **Intracerebral microinjections of Δ^9 -THC: search for the impairment of spatial memory in the eight arm radial maze in rats.** *Brain Research* 952, 239-245.
 25. Fan, F., Tao, Q., Abood, M.E., Martin, B.R. 1996. Cannabinoid receptors down-regulation without alteration of the inhibitory effect of CP 55,940 on adenylyl cyclase in the cerebellum of CP 55,940 tolerant mice. *Brain Research*. 706: 13-20.
 26. Ferraro, D.P., Grilly, D.M. 1974. **Effects of chronic exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol on delayed matching-to-sample in chimpanzees.** *Psychopharmacologia (Berl.)* 37: 127-138.
 27. Ferraro, D.P., Grisham, M.G. 1972. **Tolerance to the behavioral effects of marihuana in chimpanzees.** *Physiol. Behav.* 9: 49-54.
 28. Fletcher, J.M., Page, J.B., Francis, D.J., Copeland, K., Naus, M.J., Davis, C.M., Morris, R., Krausskopf, D., Satz, P. 1996. **Cognitive correlates of long-term cannabis use in Costa Rican men.** *Archives of General Psychiatry*. 53: 1051-1057.
 29. Gardner, E.L., Lowinson, J.H. 1991. **Marijuana's interaction with brain reward system: update 1991.** *Pharmacological and Biochemical Behaviour*. 40, 571-580.
 30. Gessa, G.L., Mascia, M.S., Casu, M.A., Carta, G. 1997. **Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: Reversal by SR141716A.** *European Journal of Pharmacology*. 327:R1-2.
 31. Gifford, A.N., Ashby, C.R. Jr. 1996. **Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR141716A.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 277:1431-1436.

32. Hampson, R.E, Deadwyler, S.A. 1998. **Role of cannabinoid receptors in memory storage.** *Neurobiology of Disease.* 5: 474-482.
33. Heyser, C.J., Hampson, R.E., Deadwyler, S.A. 1993. **Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol on delayed match to sample performance in rats: Alterations in short-term memory associated with changes in task specific firing of hippocampal cells.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 264:294-307
34. Howlett, A.C., Breivogel, C.S., Childers, S.R., Deadwyler.S.A., Hampson, R.E., Porrino, L.J. 2004. **Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress.** *Neuropharmacology.* 47 Suppl 1:345-58.
35. Iversen, L. 2003. **Cannabis and the brain.** *Brain.* 126:1252-1270.
36. Jentsch, J.D., Verrico, C.D., Le, D., Roth, R.H. 1998. Repeated exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol reduces prefrontal cortical dopamine metabolism in the rat. *Neuroscience Letters.* 246: 169-172.
37. Jones R.T., Benowitz, N.L., Herning, R.I. 1981. **Clinical relevance of cannabis tolerance and dependence.** *Journal of Clinical Pharmacology.* 21:143S-152S.
38. Kamien, J.B., Bickel, W.B., Higgins, S.T., Hughes, J.R. 1994. **The effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on repeated acquisition and performance of response sequences and on self-reports in humans.** *Behavioral Pharmacol.* 5: 71-78.
39. Kandell, E.R. 2001. **The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses.** *Science.* 294,5544. 1030-1038.
40. Kandell, E, Schwartz, J, Jessell, T. **Principles of Neural Science.** 4th Ed. 2000. McGraw-Hill. 1414 pp.
41. Kesner, R.P. 1998. **Neurobiological Views of Memory.** En *Neurobiology of Learning and Memory.* Martinez, J., Kesner, R. (Eds.) Academic Press. USA. pp. 361-416.
42. Klapdor, K., van der Stay, F.J. 1998. **Repeated acquisition of spatial navigation task in mice: effects of spacing of trials and of unilateral middle cerebral artery occlusion –The search for their neurobiological mechanism in the rat.** *Physiology and Behavior.* Vol. 63, No. 5, 903-909 pp.
43. Kreitzer, A.C., Regehr, W.G. 2001. **Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells.** *Neuron.* 29:717-727.
44. Kreitzer, A.C., Regehr, W.G. 2001. **Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids.** *Journal of Neuroscience.* 21:RC174.
45. Kreitzer, A.C., Regehr, W.G. 2002. **Retrograde signaling by endocannabinoids.** *Current Opinion in Neurobiology.* 12:324-330.
46. Kuehnle, J., Mendelson, J.H., Davis, K.R., New, P.F. 1977. **Computed tomographic examination of heavy marijuana smokers.** *Journal of the American Medical Association.* 237: 1231-1232.
47. Langstein, J., Hofstadter, F., Schwarz, H. **Cis-9, 10-octadecenoamide, an endogenous sleep - inducing CNS compound, inhibits lymphocyte proliferation.** 1996. *Res. Immunol.* 147:389-396.
48. Ledent, C., et al. 1999. **Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice.** *Science.* 283:401-404.

49. Lichtman, A.H., Dimen, K.R., Martin, B.R. 1995. **Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats.** *Psychopharmacology (Berlin)*. 119(3):282-90.
50. Lichtman, A.H., Martin, B.R. 1996. **Δ^9 -THC impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism.** *Psychopharmacology*. 126: 125-131.
51. Lyketsos, C.G., Garrett E., Liang, K.Y., Anthony, J.C. 1999. **Cannabis use and cognitive decline in persons under 65 years of age.** *American Journal of Epidemiology*. 149: 794-800.
52. Martin, B.R., Mechoulam, R., Razdan., R.K. 1999. **Discovery and Characterization of Endogenous Cannabinoids.** *Life Sciences*, Vol. 65, Nos. 6/7, 573-595.
53. Martínez-Vargas, M., Murillo-Rodríguez, E., González-Rivera, R., Landa A., Méndez Díaz, M., Prospéro-García, O., Navarro, L. 2003. **Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats.** *Neuroscience*. 117(1):197-201.
54. Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almong, S., Martin, B.R., Compton, D.R. 1995. **Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors.** *Biochemistry and Pharmacology*. 50:83-90.
55. Mechoulam, R., Fride, E., Di Marzo, V. **Endocannabinoids.** 1998. *European Journal of Pharmacology*. 359, 1-18.
56. Mendenhall, W., Sincich, T. 1997. **Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias.** Prentice-Hall Hispanoamericana. 1182 pp.
57. Miller, L.L. 1984. **Marijuana: Acute effects on human memory.** En *The cannabinoids: Chemical, pharmacological and therapeutic aspects*. Agurell, S., Dewey, W.L., Willette, R.E. (Eds.) Academic Press, New York, N.Y. pp. 21-46.
58. Miller, L.L., Branconnier, R.J. 1983. **Cannabis: Effects on memory and the cholinergic limbic system.** *Psychological Bull.* 93: 441-456.
59. Mister, D.L., Sullivan, J.M. 1999. **Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons.** *Journal of Neuroscience*. 19: 6795-6805.
60. Morgado Bernal, Ignacio. 2005. **Psicobiología del aprendizaje y la memoria.** *Cuadernos de Información y Comunicación*. 10: 221-233.
61. Munro, S., Thomas, K.S., Abu-Shaar, M. 1993. **Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.** *Nature* Sep. 2; 365(6441):61-5.
62. Murillo-Rodríguez, E., Sánchez-Alavez, M., Navarro, L., Martínez-González, D., Drucker-Colin, R., Prospéro-García, O. 1998. **Anandamide modulates sleep and memory in rats.** *Brain Research*. 812:270-274.
63. Murillo-Rodríguez, E., Giordano, M., Cabeza, R., Henriksen, S.J., Méndez-Díaz, M., Navarro, L., Prospéro-García, O. 2001. **Oleamide modulates memory in rats.** *Neuroscience Letters*. 313, 61-64.
64. Nakamura-Palacios, E.M., Winsauer, P.J., Moerschbaeher, J.M. 2000. **Effects of the cannabinoid ligand SR141716A alone or in combination with delta9-tetrahydrocannabinol or scopolamine on learning in squirrel monkeys.** *Behavioral Pharmacol.* 11: 377-386.
65. Nava, F., Carta, G., Battasi, A.M., Gessa, G.L. 2000. **D₂ dopamine receptors enable Δ^9 -tetrahydrocannabinol induced memory impairment and reduction of hippocampal extracellular acetylcholine concentration.** *British Journal of Pharmacology*. 130: 1201-1210.

66. Nava, F., Carta, G., Colombo, G., Gessa, G.L. 2001. **Effects of chronic Δ^9 -THC treatment on hippocampal extracellular acetylcholine concentration and alternation performance in the T-maze.** *Neuropharmacology*. 41, 392-399.
67. Oviedo, A., Glowa, J., Herkenham, M. 1993. **Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study.** *Brain Research*. 618: 293-302.
68. Packard, M.G., McGaugh, J.L. 1992. **Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems.** *Behavioral Neuroscience*. 106:439-446.
69. Packard, M.G., McGaugh, J.L. 1996. **Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning.** *Neurobiology of Learning and Memory*. 65:65-72.
70. Patrick, G., Straumanis, J.J., Struve, F.A., Fitz-Gerald, M.J., Manno, J.E. **Early and middle latency evoked potentials in medically and psychiatrically normal daily marijuana users.** 1997. *Clinical Electroencephalography*. 28: 26-31.
71. Patrick, G., Struve, F.A. **Reduction of auditory P50 gating response in marijuana users: further supporting data.** 2000. *Clinical Electroencephalography*. 31: 88-93.
72. Paxinos, G., Watson, C. 1986. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.** Academic Press, London.
73. Pérez-Reyes, M., White, W.R., McDonald, S.A., Hichs, R.E., Jeffcoat, A.R., Cook, C.E. 1991. **The pharmacological effects of daily marijuana studying in humans.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 40: 691-694.
74. Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G. 1993. **Cross-tolerance between delta-9-tetrahydrocannabinol and the cannabimimetic agents, CP 55,940, WIN55,212-2 and anandamide.** *British Journal of Pharmacology*. 110: 1483-1490
75. Piomelli, D., Beltramo, M., Giuffrida, A., Stella, N. 1998. **Endogenous cannabinoid signaling.** *Neurobiology of Disease* 5: 462-473.
76. Piomelli, D. 2003. **The molecular logic of endocannabinoid signaling.** *Nature Reviews*. 4:873-884.
77. Pope, H.G., Gruber, A.J., Yurgelun-Todd, D. 1995. **The residual neuropsychological effects of cannabis: the current status of research.** *Drug and Alcohol Dependence*. 38: 25-34.
78. Pope, H.G., Yurgelun-Todd. 1996. **The residual cognitive effects of heavy marijuana use in college students.** *Journal of the American Medical Association*. 275: 521-527.
79. Pope, H.G., Gruber, A.J., Hudson, J.I., Huestis, M.A., Yurgelun-Todd. 2001. **Neuropsychological performance in long-term cannabis users.** *Archives of General Psychiatry*. 58: 909-915.
80. Prospéro-García, O., Soria-Gómez, E., Rueda-Orozco, P., Huerta-Saquero, A. **Del placer y el placer a la marijuana.** En: *Temas selectos de neurociencias III*, Ed. Javier Velásquez Moctezuma. UAM, 2004.
81. Rodríguez de Fonseca, F., Fernández-Ruiz, J.J., Murphy, L.L., Cebeira, M., Steger, R.W., Bartke, A., Ramos, J.A. 1992. **Acute effects on delta9-tetrahydrocannabinol on dopaminergic activity in several rat brain areas.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 42: 269-275.

82. Rodríguez de Fonseca, F., Gorriti, M-A., Fernández-Ruiz, J.J., Palomo, T., Ramos, J.A. 1994. **Down-regulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic delta9-tetrahydrocannabinol**. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 47: 33-40.
83. Rueda-Orozco, P., Soria-Gomez, E., Montes-Rodriguez, C., Martinez-Vargas, M., Galicia, O., Navarro, L., Prospero-García, O. 2007. **A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats**. *Psychopharmacology*.
84. Shen, M., Thayer, S.A. 1998. **The cannabinoid agonist WIN55,212-2 inhibits calcium channels by receptor-mediated and direct pathways in cultured rat hippocampal neurons**. *Brain Res*. 783: 77-84.
85. Sim, L.J., Hampson, R.E., Deadwyler, S.A., Childers, S.R. 1996. **Effects of chronic treatment with Δ^9 -tetrahydrocannabinol on cannabinoid stimulated [35 S] GTP γ S autoradiography in rat brain**. *Journal of Neuroscience*. 16: 8057-8066.
86. Solowij, N., 1995. **Do cognitive impairments recover following cessation of cannabis use?** *Life Science*. 56: 2119-2126.
87. Solowij, N. 1998. *Cannabis and Cognitive Functioning*. Cambridge, England: Cambridge University Press.
88. Stevens, C.F. 1998. **A million dollar question: Does LTP = memory?** *Neuron* 20: 1-2.
89. Stiglick, A., Kalant, H. 1985. **Residual effects of chronic cannabis treatment on behaviour in mature rats**. *Psychopharmacology*. 85: 436-439.
90. Struve, F.A., Straumanis, J.J., Patrick, G., Leavitt, J., Manno, J.E., Manno, B.R. 1999. **Topographic quantitative EEG sequelae of chronic marijuana use**. *Drug Alcohol Dependence*. 56: 167-179.
91. Struve F.A., Patrick, G., Straumanis, J.J., Fitz-Gerald, M.J., Manno, J. 1998. **Possible EEG sequelae of very long duration marijuana use**. *Clinical Electroencephalography*. 29: 31-36.
92. Sullivan, J. M. 2000. **Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Learning and Memory Impairments Produced by Cannabinoids**. *Learning and Memory*. 7:132-139.
93. Takahashi, T., Momiyama, A. 1993. **Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission**. *Nature*. 366: 156-158.
94. Twitchell, W., Brown, S., Mackie, K. 1997. **Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons**. *Journal of Neurophysiology* 78: 43-50.
95. Valenti, M., Vigano, D., Casico, M.G., Rubino, T., Steardo, L., Parolaro, D., Di Marzo, V. 2004. **Diferential diurnal variations of anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain**. *Cellular and molecular life sciences*. 61(7-8):945:50.
96. Verrico, C.D., Jentsch, D.J., Roth, R.H., Taylor, J.R., 2004. **Repeated, intermittent Δ^9 -THC administration to rats impairs acquisition and performance of a test of visuospatial divided attention**. *Neuropsychopharmacology*. 29, 522-529.
97. Volkow, N.D., Gillepie, H., Mullan, N., Tancredi, L., Grant, C., Valentine, A., Hollister, L. 1996. **Brain glucose metabolism in chronic marijuana users at baseline and drug marijuana intoxication**. *Psychiatry Research*. 67: 29-38.
98. White, N.M., Salinas, J.A. 1998. **Pharmacological Approaches to the Study of Learning and Memory**. *En Neurobiology of Learning and Memory*. Martinez, J., Kesner, R. (Eds.) Academic Press. USA. pp. 143-176.

99. Wilson, R.I., Nicoll, R.A. 2002. **Endocannabinoid signaling in the Brain**. Science. 296, 678-682.
100. Wu, X., French, E.D. 2000. Effects of chronic Δ^9 -tetrahydrocannabinol on rat midbrain dopamine neurons: an electrophysiological assessment. Neuropharmacology. 39: 391-398.
101. Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hohmann, A.G., Herkenham, M., Bonner, T.I. 1999. **Increased mortality, hypoactivity and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice**. Proceedings of the National Academy of the Sciences USA. 96:5780-5785.
102. www.es.wikipedia.org
103. [http://en.wikipedia.org/wiki/P300_\(Neuroscience\)](http://en.wikipedia.org/wiki/P300_(Neuroscience))
104. www.usm.edu/neurolab/OperantChambers.html
105. <http://www.idmu.co.uk/pdfs/drugtest.pdf> (Independent drug monitoring Unit -Drug testing- Cannabis. Blood and urine drug testing for cannabinoids. December 2000.)
106. <http://www.webliblioteca.com.ar/textos/mente/memoriacorto.htm>
107. <http://www.chcr.brown.edu/MMSE.PDF>