



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**CAMBIOS EN EL SISTEMA ENDOCANABINOIDE INDUCIDOS
POR EL TRATAMIENTO SUBCRÓNICO
DE WIN 55,212-2 EN RATAS WISTAR**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

P R E S E N T A

MOSCOSA ORTIZ LIZBETH

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Oscar Prospéro García

REVISORA DE TESIS

Dra. Alejandra Evelyn Ruiz Contreras

SINODALES

Dra. Gabriela Orozco Calderón

Dr. Hugo Sánchez Castillo

Dra. Beatriz Gómez González



México D.F.

Marzo 2014



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

CAMBIOS EN EL SISTEMA ENDOCANABINOIDE INDUCIDOS

POR EL TRATAMIENTO SUBCRÓNICO

DE WIN 55,212-2 EN RATAS WISTAR

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

PRESENTA

LIZBETH MOSCOSA ORTIZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. OSCAR PROSPÉRO GARCÍA

REVISORA DE TESIS

DRA. ALEJANDRA EVELYN RUIZ CONTRERAS

SINODALES

DRA. GABRIELA OROZCO CALDERÓN

DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO

DRA. BEATRIZ GÓMEZ GONZÁLEZ

Agradecimientos

Esta tesis fue apoyada con recursos del proyecto IN220712 otorgado al Doctor Oscar Próspero García por parte de la Dirección General Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a mi tutor el Dr. Oscar Próspero García por el apoyo y la atención para realizar este trabajo. Al grupo de Neurociencias del Laboratorio de Canabinoides de la Facultad de Medicina de la UNAM y a mi revisora, la doctora Alejandra Evelyn Ruíz Contreras por su apoyo y paciencia.

Agradezco también a mis sinodales, la Dra. Gabriela Orozco, al Dr. Hugo Sánchez y a la Dra. Beatriz Gómez, por sus valiosas sugerencias a este trabajo.

Esta tesis está dedicada a mi familia y amigos.

A mi hija que ya viene en camino. Aun eres muy pequeñita y ya eres mi principal motivo para seguir superándome profesionalmente.

A mi mamá por ser mi ejemplo a seguir. Por enseñarme a no rendirme en las situaciones más difíciles de la vida.

Mamá, gracias por transmitirme tu fortaleza y esperanza. Por siempre confiar en mí, en que lograría concluir esta etapa de mi vida.

A mi papá por el cariño y el apoyo económico que me brindó la mayor parte de la carrera. Gracias papá, por haberme inculcado el gusto por la lectura que tanto me ayudó en la carrera.

A mis hermanas, Norma y Rosalba por darme ánimos y por creer en mí. Por escucharme, consolarme y darme sus puntos de vista sobre los problemas que tuve a lo largo de la carrera.

A mi esposo, Antonio, por todo el amor, amistad y apoyo económico. Gracias también por ayudarme a sonreír y a relajarme cada vez que me sentía estresada porque los experimentos no salían.

A mis amigos del laboratorio, Linda y Toño por ayudarme amistosa y experimentalmente. Y por haberme acompañado en los días pesados de trabajo.

A mi familia materna, la familia Ortiz por el apoyo, el cariño y la diversión que siempre me han dado desde pequeña.

A todos mis amigos, quienes no menciono específicamente, pero que me han escuchado en los momentos difíciles y me han brindado su valiosa amistad.

Índice

Resumen.....	8
Introducción	9
Trastorno por uso de sustancia.....	9
Impulsividad-Compulsión.....	12
Reforzamiento Positivo-Reforzamiento Negativo	12
La teoría de los procesos oponentes.....	13
La motivación y el sistema de la recompensa	19
El sistema de la recompensa en la adicción	20
Corteza Prefrontal	23
Hipocampo	24
Amígdala.....	25
Dependencia a la marihuana	28
Consumo de Cannabis a nivel mundial y Nacional	29
La planta.....	30
El sistema endocanabinoide	33
Los receptores a cannabinoides.....	33
Expresión del receptor CB1 en regiones específicas del Sistema Nervioso Central.....	34
Los endocannabinoides	38
Efectos de los cannabinoides	41
Cannabinoide sintético WIN-55,212-2	44
Trastorno asociado al Cannabis	46
Síndrome de abstinencia a cannabinoides.....	48
Cambios en la expresión del receptor CB1 provocados por la administración de cannabinoides	52
Justificación.....	54
Objetivos	55
Preguntas de Investigación.....	55
Hipótesis.....	55
Materiales y método.....	56
Animales	56
Fármacos	56

Evaluación del síndrome de Abstinencia	56
Medición del receptor CB1, FAAH y NAPE-PLD.....	57
Tipo de Diseño y Análisis Estadístico	58
Resultados.....	59
Síndrome de Abstinencia	59
Expresión del receptor CB1 y enzimas FAAH y NAPE PLD	69
Discusión	77
Limitaciones y sugerencias	82
Anexo 1.....	84
Referencias.....	85

Índice de figuras

Figura 1. Patrón estándar de la dinámica afectiva.....	15
Figura 2. Proceso oponente después de estimulaciones repetidas	17
Figura 3. Circuito cerebral de la motivación y recompensa.....	25
Figura 4. Efecto de la administración intravenosa de THC sobre la liberación de dopamina	29
Figura 5. Tendencias del consumo de drogas en población de 12 a 65 años	30
Figura 6. Mecanismos de transducción de señales estimulados por el receptor CB1 de una terminal presináptica	35
Figura 7. Inmunohistoquímica del receptor CB1	36
Figura 8. Principales agonistas y antagonista de receptores canabinoides	40
Figura 9. Organización sináptica del sistema endocanabinoide.....	42
Figura 10. Efecto de la administración intravenosa de WIN 55,212-2 sobre la liberación de dopamina ...	46
Figura 11. Conductas de síndrome de abstinencia en ratones tratados con THC	49
Figura 12. Conductas de síndrome de abstinencia en ratones tratados con WIN 55,212-2	51
Figura 13. Pegado de [3 H]SR141716A en distintas áreas cerebrales en ratones tratados con THC y WIN 55,212-2	53
Figura 14. Procedimiento metodológico seguido después de las administraciones de WIN 55-212,2.....	57
Figura 15. Promedio de frecuencia por minuto del total de 8 conductas del síndrome de abstinencia.....	61
Figura 16. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta frotamiento facial	62
Figura 17. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta ptosis palpebral	63
Figura 18. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta sacudidas de perro mojado	64
Figura 19. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta temblor de patas delanteras	65
Figura 20. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta temblor general	66
Figura 21. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta piloerección.....	67
Figura 22. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta masticación	68
Figura 23. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta lamida de pene	69
Figura 24. Densidad óptica del receptor CB1 en el estriado ventral.....	70
Figura 25. Densidad óptica del receptor CB1 en el hipocampo.....	70
Figura 26. Densidad óptica del receptor CB1 en la corteza frontal	71
Figura 27. Densidad óptica del receptor CB1 en la amígdala.....	71
Figura 28. Densidad óptica de la NAPE-PLD en el estriado ventral	72
Figura 29. Densidad óptica de la NAPE-PLD en el hipocampo	73
Figura 30. Densidad óptica de la NAPE-PLD en la corteza frontal.....	73
Figura 31. Densidad óptica de la NAPE-PLD en la amígdala	74
Figura 32. Densidad óptica de la FAAH en el estriado ventral	75
Figura 33. Densidad óptica de la FAAH en el hipocampo	75
Figura 34. Densidad óptica de la FAAH en la corteza frontal	76
Figura 35. Densidad óptica de la FAAH en la amígdala.....	76

Resumen

El trastorno por uso de sustancias es una enfermedad de recaída crónica. Es un problema de salud pública muy importante en México y en el mundo. En el plano mundial, se estima que en 2011 entre el 3,6% y el 6,9% de personas de 15 a 64 años, han usado por lo menos una vez en su vida una sustancia ilícita en el último año. La marihuana es la sustancia ilícita de mayor consumo mundial. La prevalencia anual estimada de consumo de esta se situó en 2010 entre el 2,6% y el 5% de la población adulta (entre 15 a 64 años de edad). Se sabe también que existe un sistema endógeno canabinoide capaz de interactuar con el principal componente de la marihuana, delta-9-tetrahidrocanabinol (THC), y con cualquier otro canabinoide natural o sintético. Además, el síndrome de abstinencia asociado al uso de la marihuana (uno de los criterios diagnósticos descritos recientemente en el *DSM -V*) ha sido señalado como un componente importante que contribuye a la recaída. Por todo lo anterior, el primer objetivo de este estudio es observar el síndrome de abstinencia, inducido por la administración aguda de un antagonista sintético (AM251) de receptor CB1 después de la administración subcrónica de un agonista sintético canabinoide (WIN 55,212-2). El segundo objetivo es estudiar los cambios en el nivel de expresión del receptor CB1 y de las enzimas que sintetizan y degradan a uno de sus principales ligandos que siguen a la administración subcrónica de WIN 55,212-2 en las estructuras del Núcleo Accumbens, Amígdala, Corteza Frontal e Hipocampo. Las ratas que recibieron tratamiento con WIN y después AM251 mostraron un incremento en las conductas relacionadas con el síndrome de abstinencia en comparación con su grupo control. Se encontró también una disminución en la expresión del receptor CB1 en el Núcleo Accumbens y en el Hipocampo en las ratas tratadas con WIN con respecto al grupo control, mientras que las otras estructuras no presentaron cambios. Las enzimas NAPE-PLD y FAAH no resultaron modificadas. Estos resultados muestran que existe una modificación en el sistema endocanabinoide inducida por la administración subcrónica de WIN55212, 2. Se sugiere que estos cambios subyacen a la expresión del síndrome de abstinencia y son probablemente responsables de la expresión de este.

Introducción

Trastorno por uso de sustancia

Antes de que los humanos comenzaran a cultivar y a domesticar las plantas, iban en búsqueda de plantas seguras y nutritivas. Entre muchas de las plantas que los humanos probaron, un pequeño número producía cambios en la percepción, humor, cognición, y activación. De estas, una pequeña cantidad, como las amapolas, la coca, el tabaco, la marihuana, contienen sustancias que producen una sensación subjetiva de placer que facilita una gran recompensa. Aun sabiendo que éstas carecen de valor nutricional se siguieron consumiendo. Los humanos aprendieron a purificar estas sustancias y después a sintetizar compuestos relacionados para su uso como medicamentos (Kandel, Schwartz, Jessell, Siegelbaum, y Hudspeth, 2013).

De acuerdo al Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, (5th ed., *DSM-V*; American Psychiatric Association, 2013) las sustancias que producen trastornos debidos a su uso en exceso, abarcan 10 clases separadas de drogas; alcohol, cafeína, cannabis, alucinógenos, inhalantes, opioides, sedantes, estimulantes, tabaco y otras (no conocidas) sustancias. Estas 10 clases de sustancias no son completamente distintas puesto que todas las drogas que son tomadas en exceso tienen en común la activación directa del sistema cerebral de recompensa, el cual está involucrado en el reforzamiento de conductas y producción de memorias asociadas al abuso de estas sustancias. Estas sustancias producen una activación tan intensa del sistema de recompensa que las actividades normales (ir a la escuela y/o al trabajo etc.) pueden ser descuidadas con tal de consumir dicha sustancia (American Psychiatric Association, 2013). A continuación se hablará sobre la dependencia a sustancias y sus características conductuales para después abordar algunos aspectos fisiológicos de esta misma.

El trastorno por uso de sustancia es un problema de salud pública muy importante en México y en el mundo. Coloquialmente se conoce también como drogadicción y es una enfermedad de recaída crónica (Koob y Volkow, 2010). En el plano mundial, se estima que en 2011 entre 167 y 315 millones de personas de 15 a 64 años, han usado por lo menos una vez en su vida una sustancia ilícita en el último año (entre el 3.6% y el 6.9% de la población mundial de ese grupo de edad). Con respecto a los consumidores problemáticos de drogas, estos suman aproximadamente 16 millones, y siguen siendo motivo de especial preocupación (UNODC, 2013).

De la población usuaria de drogas ilícitas, la que ha recibido mayor atención es aquella que tiene problemas con su uso; es decir, las personas que presentan trastornos por el uso de determinada sustancia y que se han enfrentado a las consecuencias sociales y de salud a causa del uso de esta misma (UNODC, 2013). La característica esencial del trastorno por uso de sustancia es un conjunto de síntomas cognitivos, conductuales y fisiológicos promoviendo que el individuo continúe usando la sustancia a pesar de los problemas significativos que le produce. Una importante característica de los trastornos por uso de sustancias es un cambio en la circuitería cerebral subyacente que persiste más allá de la desintoxicación, particularmente en individuos con trastornos severos. Los efectos conductuales de estos cambios cerebrales pueden ser exhibidos con las recurrentes recaídas y el antojo intenso por la droga cuando el individuo es expuesto a un estímulo relacionado con la droga. En general el diagnóstico de trastorno por uso de sustancia está basado en un patrón patológico de conductas relacionadas al uso de la sustancia. El trastorno por uso de sustancia ocurre en un rango amplio de severidad, desde la leve a la severa, con la severidad basada en el número de síntomas (criterios diagnósticos). Un trastorno leve es sugerido por la presencia de 2 a 3 síntomas, el moderado por 4 a 5 síntomas y el severo por 6 o más. A continuación se enlistan los criterios diagnósticos según el *DSM-V* (American Psychiatric Association, 2013):

1. El individuo puede tomar la sustancia en grandes cantidades o por un periodo más prolongado del originalmente pretendido.
2. El individuo puede expresar un deseo persistente de reducir o regular el uso de la sustancia y puede reportar múltiples esfuerzos fallidos por disminuir o discontinuar su uso.
3. El individuo puede gastar una gran cantidad de tiempo obteniendo la sustancia, usándola o recuperándose de sus efectos.
4. El *craving* (antojo) está manifestado por un deseo intenso o urgencia por la droga que puede ocurrir en cualquier momento, pero es más probable que se presente en un ambiente donde la droga fue previamente obtenida.
5. El uso recurrente de la sustancia puede dar como resultado una falla para cumplir obligaciones importantes en el trabajo, escuela o casa.

6. El individuo puede continuar usando la sustancia a pesar de tener persistentes o recurrentes problemas interpersonales o sociales causados o exacerbados por los efectos de la sustancia.
7. Las actividades importantes sociales, ocupacionales o recreacionales pueden dejarse o reducirse debido al uso de la sustancia.
8. El uso recurrente de la sustancia en situaciones en las cuales puede ser físicamente peligroso.
9. El individuo puede continuar usando la sustancia a pesar de saber que tiene un problema persistente o recurrente físico o psicológico que probablemente ha sido causado o exacerbado por la sustancia.
10. Desarrollo de tolerancia. Esta es señalada por el requerimiento de un notable incremento en la dosis de la sustancia para lograr el efecto deseado, o una notable reducción del efecto cuando la dosis usual es consumida. El grado al cual la tolerancia se desarrolla varía enormemente a través de los diferentes individuos, así como de las sustancias y puede involucrar una variedad de efectos en el sistema nervioso central.
11. Presencia del síndrome de abstinencia. Ocurre cuando la concentración de una sustancia en la sangre o en el tejido disminuyen en un individuo quien ha mantenido un uso intenso prolongado de la sustancia. Después de que se desarrollan los síntomas de abstinencia, el individuo probablemente consumirá la sustancia para aliviar los síntomas. Los síntomas de abstinencia varían ampliamente de acuerdo a los tipos de sustancias.

Cabe mencionar que ni la tolerancia, ni el síndrome de abstinencia son necesarias para un diagnóstico de trastorno por uso de sustancia. Sin embargo, para muchos tipos de sustancias, una historia previa de síndrome de abstinencia es asociada con un curso clínico más severo (American Psychiatric Association, 2013).

Es importante también mencionar que los criterios 1 a 4 están señalando un daño o pérdida de control sobre el uso de la sustancia, los criterios 5 a 7, deficiencia social, el 8 y el 9 un uso riesgoso de la sustancia y los criterios 10 y 11 características farmacológicas (American Psychiatric Association, 2013).

Impulsividad-Compulsión

Algunos neurocientíficos que estudian el trastorno por uso de sustancia, como George Koob y Nora Volkow, han conceptualizado la drogadicción, o trastorno por uso de sustancia, como una enfermedad que progresa de la impulsividad a la compulsión. El trastorno en el control de impulsos está caracterizado por una sensación incrementada de tensión o activación antes de cometer el acto impulsivo (placer, gratificación o alivio al momento de cometer dicho acto) y puede o no haber autoreproche o culpa seguido al acto. Por otro lado, el desorden compulsivo está caracterizado por ansiedad y estrés (debido a pensamientos persistentes y recurrentes, es decir, obsesiones) antes de cometer una conducta repetitiva compulsiva y hay alivio del estrés cuando la conducta compulsiva es ejecutada. Cuando un individuo se mueve del trastorno impulsivo al compulsivo, hay un cambio de reforzamiento positivo, el cual dirige la conducta motivada, a un reforzamiento negativo, que ahora es el que mantiene la conducta. Este fenómeno se desarrolla en un ciclo colapsado de la adicción que comprende tres etapas: preocupación-anticipación, atracón-intoxicación y el efecto negativo del síndrome de abstinencia. Estas tres etapas se conceptualizan como la interacción de una con otra, siendo cada vez más intensas y empeoran conforme transcurre el tiempo e involucran cambios alostáticos en el sistema cerebral de recompensa y estrés (Koob, 2003; Koob y Volkow, 2010; Koob, 2013).

Reforzamiento Positivo-Reforzamiento Negativo

La motivación para la búsqueda patológica de la droga involucre dos distintos tipos de reforzamiento: el que distingue al uso inicial de la droga y el que distingue la dependencia a la droga; es decir, el reforzamiento positivo y el reforzamiento negativo. El reforzamiento positivo ocurre cuando la presentación de un estímulo incrementa la probabilidad de la respuesta y usualmente hace referencia a la generación de un estado hedónico (recompensante) positivo (Koob y Le Moal, 2008; Edwards y Koob, 2010). En contraste, el reforzamiento negativo ocurre con el alivio de un estado aversivo existente o el alivio de un estado aversivo generado por drogas (por ejemplo, el síndrome de abstinencia), incluyendo disforia, ansiedad, irritabilidad y disturbios en el sueño (Koob y Le Moal, 2001, 2008).

Se ha observado que se presenta un efecto de reforzamiento positivo de segundo orden, es decir, un reforzamiento asociado a la presencia de un estímulo previamente neutro, como la jeringa, en el caso de una persona dependiente que se inyecta o el sonar de los hielos en un vaso,

para una persona que bebe alcohol. Además, se presenta un reforzamiento negativo de segundo orden, en el cual un estímulo previamente neutro, como el tener dinero para poder comprar la droga o hacer una llamada telefónica a la persona que provee la droga, ahora tiene el mismo efecto que el de la eliminación de los síntomas del síndrome de abstinencia al consumir la droga (Koob y Le Moal, 2001).

Se puede relacionar entonces los tres principales componentes en el ciclo de la adicción; preocupación-anticipación, atracón-intoxicación y el afecto negativo del síndrome de abstinencia, con los distintos tipos de reforzamiento. El componente del atracón-intoxicación está ampliamente asociado con el reforzamiento positivo y la etapa de efecto negativo del síndrome de abstinencia es asociada con el reforzamiento negativo. El reforzamiento negativo y positivo de segundo orden estarían hipotéticamente asociados con el componente de preocupación-anticipación (Koob y Le Moal, 2001).

Diferentes drogas producen diferentes patrones de adicción con énfasis en los diferentes componentes del ciclo de la adicción. La dependencia a la marihuana, por ejemplo, presenta una etapa importante de intoxicación, así, conforme el uso crónico continúa, el sujeto comienza a mostrar un patrón de intoxicación crónica durante la vigilia (Koob y Le Moal, 2008b).

La teoría de los procesos oponentes

Ahondando más en la etapa del síndrome de abstinencia, como ya se mencionó, ésta viene después de la etapa de intoxicación con la droga, difiere marcadamente entre drogas y se ve influida por la cronicidad y la frecuencia de su abuso. Todas las drogas de abuso son asociadas con un síndrome de abstinencia motivacional; es decir, que dicho síndrome lleva a la persona a consumir la droga para poder eliminar los síntomas como la ansiedad, disforia, irritabilidad, angustia psicológica y trastornos en el sueño que persisten aun después de una abstinencia prolongada (la cual ha sido ligada a un incremento en los umbrales de recompensa, y en conductas como la ansiedad) (Koob y Le Moal, 2008b; Koob y Volkow, 2010).

Existe una teoría motivacional que podría explicar el componente afectivo del síndrome de abstinencia del ciclo de la adicción y la tolerancia producida por el consumo constante de la droga. La presencia de un estado afectivo negativo (síndrome de abstinencia) no solo es señal del comienzo del desarrollo de la dependencia, sino también contribuye a la vulnerabilidad hacia la recaída, ya que el inicio de un estado afectivo negativo puede tener propiedades motivacionales

en el mantenimiento de la conducta de búsqueda de la droga (Koob, 1997). La teoría de los procesos oponentes de Solomon y Corbit (1974) da una explicación tentativa de por qué se presenta este estado negativo (síndrome de abstinencia), al parecer esencial para que exista una recaída hacia el consumo de la droga. Según dichos autores, se pueden distinguir algunas características comunes importantes que pueden ser vistas como la base de muchas experiencias afectivas, emocionales o hedónicas. Primero, a consecuencia de la repentina introducción de un estímulo E, ya sea de valencia positiva (placentero) o de valencia negativa (aversivo), la intensidad de la reacción hedónica comienza y rápidamente se eleva hacia un pico (proceso “a”). Este proceso “a”, con el tiempo declina lentamente hacia un nivel constante donde permanece si la calidad, es decir, intensidad del estímulo E, es mantenida. La súbita terminación del estímulo E causa que el proceso “a” rápidamente desaparezca y de lugar a un tipo de reacción afectiva cualitativamente muy distinta (de valencia opuesta, proceso “b”), el cual alcanza un pico de intensidad y desaparece lentamente con el tiempo. En la Figura 1 se ilustran los cambios de un estado hedónico, así como el llamado patrón estándar de la dinámica afectiva. El patrón tiene cinco características distintas que siguen la misma lógica ya mencionada: a) un pico del proceso hedónico primario precipitado por el inicio de un estímulo; b) un periodo de adaptación hedónica durante la cual la intensidad del estado hedónico declina, aunque la intensidad del estímulo se mantenga; c) un nivel constante del proceso hedónico el cual continua tanto tiempo como la intensidad del estímulo se mantenga; d) un pico de la reacción secundaria, el cual rápidamente sigue a la finalización del estímulo y cuya cualidad es hedónicamente opuesta al estado hedónico primario; y e) finalmente, el decaimiento y subsecuentemente la desaparición de la reacción secundaria (Solomon y Corbit, 1974; Zorrilla, Logrip y Koob, 2014).

Poniendo estas etapas en un ejemplo, llevándolo al plano de la dependencia a sustancias, Solomon y Corbit (1974) hacen referencia al proceso que se daría en un usuario de opiáceos. Al principio el usuario experimenta el “*rush*” (un sentimiento intensamente placentero. Valencia positiva) justo después de la inyección del opiáceo (estímulo E), seguido por un periodo de euforia menos intensa (proceso “a”). Así, conforme el tiempo pasa, el estímulo E desaparece, el opiáceo es eliminado del organismo y el usuario sufre los síntomas somáticos aversivos, dolorosos y aterradores del síndrome de abstinencia (proceso “b”. Valencia negativa) junto con un sentimiento de *craving*.

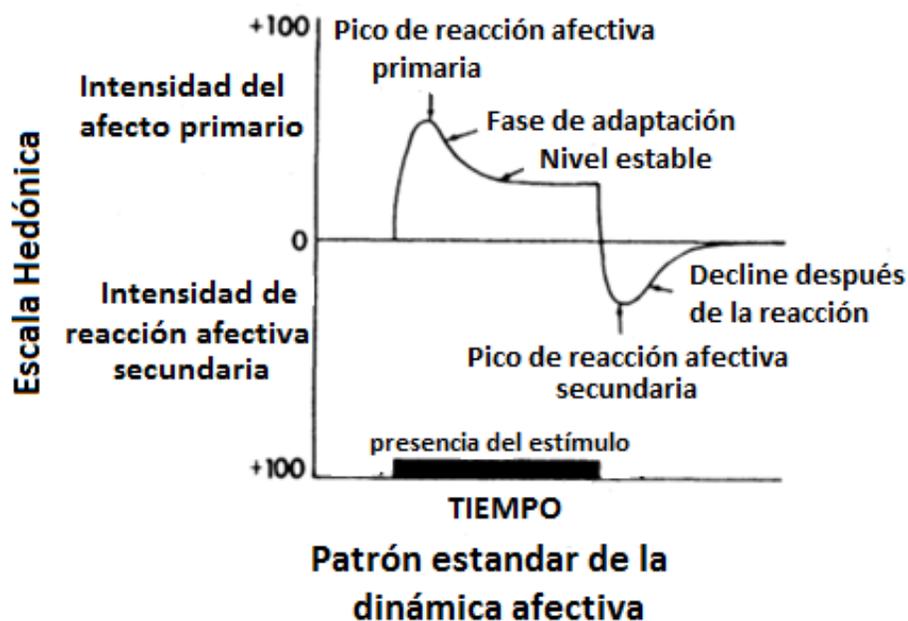


Figura 1. Patrón estándar de la dinámica afectiva

Se muestra el patrón estándar de la dinámica afectiva con las cinco características distintivas. El pico de la reacción afectiva primaria, que correspondería al proceso “a”, la fase de adaptación, el mantenimiento del nivel, un pico de reacción afectiva secundaria, cualitativamente distinto al primero, es decir, el proceso oponente, y finalmente el decline de este último pico. La barra gruesa en la parte inferior de la figura indica la presencia del estímulo inicial (anteriormente nombrado como estímulo E). El eje de las ordenadas representa dos escalas hedónicas, cada una de estas partiendo de la neutralidad. Una es la de reacción afectiva primaria y la otra de la reacción afectiva secundaria. (Figura modificada de Solomon y Corbit, 1974).

Después de repetidas dosis de opiáceos el estado de valencia positiva comienza a debilitarse y al mismo tiempo el proceso “b” comienza a intensificarse y le toma más tiempo regresar a la línea base. Para este momento el proceso “a” inicial ahora es un estado de “normalidad” más que de euforia. El *rush* experimentado previamente ahora ya no existe y aún más el proceso “b” es fisiológicamente más perturbante y duradero comparado con las características del mismo en las primeras administraciones. En cuanto al *craving* experimentado por el proceso “b” se vuelve extremadamente intenso, aversivo y duradero. Pueden pasar meses antes de que el proceso “b” regrese a la línea base, incluso puede que no regrese nunca a la línea base. Es entonces cuando el repetido uso de alguna drogas da como resultado el fenómeno de

dependencia o adicción, en el cual las personas se encuentran deseando intensamente una sustancia que previamente les causaba poco interés.

Cabe mencionar que en esta teoría de los procesos oponentes se asumen dos principios: 1. Que el estímulo E induce una emoción de una valencia positiva (placer) o de valencia negativa (miedo) en el sujeto, la cual termina no porque el sujeto esté exhausto, sino porque un sistema oponente, un sistema generador de una emoción de valencia opuesta, reduce o elimina dicha emoción. Es decir, la función del proceso oponente es promover una emoción de valencia contraria a la que provocó el estímulo E. 2. Que por lo tanto, en consecuencia de muchas repeticiones de las conductas que le causan la emoción al sujeto (de valencia positiva o negativa) se fortalecerá el proceso oponente (ver Figura 2) que generará una emoción de valencia opuesta. Es decir, los estados aversivos, manifestados en sí mismos por la finalización repentina de estímulos placenteros se vuelven más intensos con experiencias repetidas.

Entonces, por ejemplo, el ejercicio prolongado de un sistema que promueve una emoción de valencia positiva, promueve colateralmente la activación y fortalecimiento del proceso oponente, en este caso, aversivo, lo que causa estrés fisiológico. Es decir, muchos recursos fisiológicos pueden ser requeridos con el fin de mantener con fuerza al proceso oponente, para que sea capaz de neutralizar al sistema activado por el estímulo E. Se argumenta entonces que existen ciertos sistemas en el cerebro que se encargan de suprimir o reducir todo lo que se desvíe de la neutralidad hedónica, ya sea algo apetitoso o aversivo o placentero o no placentero (Solomon y Corbit, 1974; Zorrilla y col., 2014).

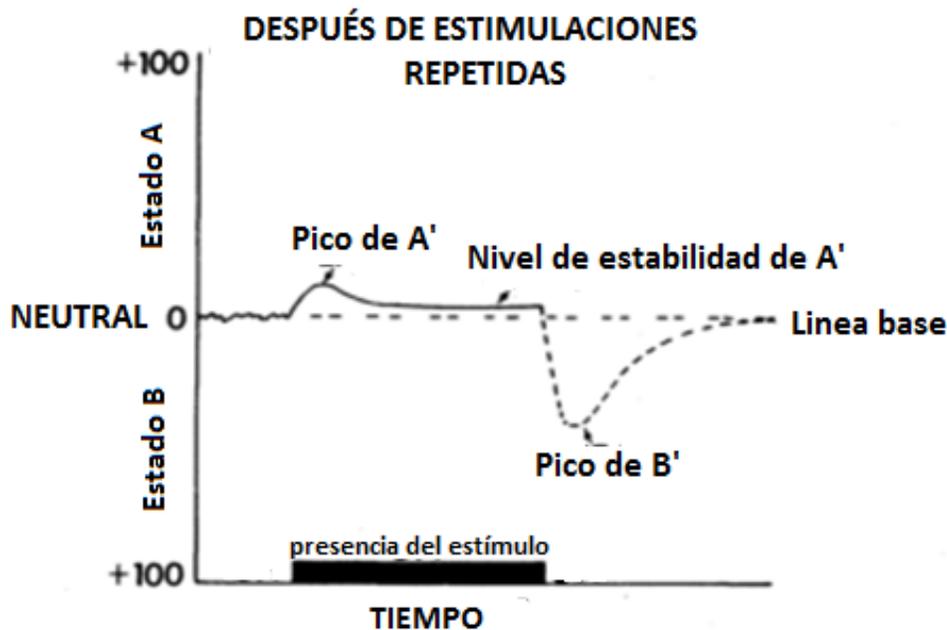


Figura 2. Proceso oponente después de estimulación repetidas

Se muestra la dinámica temporal generada por el sistema del proceso oponente después de estimulación repetidas. El pico de A' será menos intenso debido a que la latencia del proceso "b" es decrementada y su intensidad incrementada. El nivel de estabilidad de A' durante el mantenimiento del estímulo será cercano a la línea base y tal vez aún más bajo en algunos casos. El pico de B' será más intenso y de larga duración comparado con el pico que se generaba en las primeras estimulaciónes. (Figura modificada de Solomon y Corbit, 1974).

En este marco teórico, la dependencia a sustancias se conceptualiza como un ciclo de desregulación de los mecanismos cerebrales de recompensa y antirecompensa o defensa que incrementa progresivamente dando como resultado el uso compulsivo de drogas. Los procesos contraadaptativos, tal como el proceso oponente, que forman parte de las limitaciones homeostáticas normales de la función de la recompensa, no logran regresar al rango homeostático normal se cree que forman un estado alostático.

La Homeostasis en un principio, corresponde a los mecanismos que mantienen la estabilidad dentro de los sistemas fisiológicos y mantienen todos los parámetros del medio interno de los organismos dentro de los límites que permiten a un organismo sobrevivir (Sterling, 2012). Esto originalmente implicaba que 1) las desviaciones de los puntos de ajuste normales son automáticamente corregidas por medio de retroalimentación negativa y 2) los órganos corporales son considerados con función autónoma. Subsecuentemente, la homeostasis ha sido descrita

como un proceso de autoregulación para mantener los parámetros corporales alrededor del punto de ajuste crítico (*set point*) para sobrevivir. Esto incluye una coordinación multi-sistema de la respuesta del organismo ante un cambio agudo, incluyendo el cerebro, la glándula pituitaria, el sistema autónomo y el musculoesquelético (Koob y Le Moal, 2001). Sin embargo, mientras unos parámetros del medio interno se mantienen constantes (como la temperatura corporal), otros parámetros como las hormonas del estrés son variados dentro de un amplio rango en un intento por mantener la homeóstasis. En contraste, el principio de alostasis propone un mantenimiento de la estabilidad fuera del rango homeostático normal (Sterling, 2012). La alostasis puede ser definida como un proceso adaptativo e integrativo el cual mantiene la estabilidad a través del cambio y que da como resultado un estado de desviación crónica del estado de operación normal de los sistemas reguladores, con un nuevo punto de ajuste establecido. Lo que implica que muchas, sino es que todas, las funciones fisiológicas son movilizadas o reorganizadas para contender con las demandas del medio, como se refleja en una cascada de interacciones organismo-cerebro remplazando la regulación local. Controlando simultáneamente todos los mecanismos, el cerebro puede hacerse cargo e introducir la experiencia, recuerdos, anticipación y la reevaluación de necesidades para la anticipación de requerimientos fisiológicos (Koob y Le Moal, 2001, 2008c).

Cuando las demandas se vuelven crónicas, el sistema cuerpo-cerebro tónicamente se adapta prácticamente a todos los niveles de organización, habiendo cambios extensos en los puntos de ajuste, por lo que entrar en una condición relajada puede crear un estado desagradable de retirada de su regulación fisiológica. Tales cambios en las hormonas, opioides, transmisores, etcétera, proveen una base fisiológica para que el individuo continúe buscando una condición de alta demanda, y un nuevo nivel estabilizado de actividad lejano al equilibrio homeostático. Cuando la activación crónica, el estrés repetido y los estados afectivos negativos imponen regulaciones prolongadas fuera de la normalidad, no deja margen para responder a cambios adicionales, sin oportunidad de relajación y sin más capacidad para responder (Koob y Le Moal, 2001, 2008c).

Se tiene la hipótesis de que este estrés y activación crónica llevan a una desregulación de los mecanismos homeostáticos, consecuencias perjudiciales y enfermedad. La dependencia a las drogas involucra un cambio en el punto de ajuste de la recompensa a las drogas y refleja una adaptación alostática más que homeostática, ya que representa una ruptura o disfunción con los mecanismos reguladores cerebrales que se encargan de mediar el estado emocional del sujeto

dependiente. Esto es debido a que la dependencia a sustancias empeora a través del tiempo, lo que está sujeto a significantes influencias medioambientales y deja un trazo residual neuroadaptativo; es decir, un recuerdo que se puede rastrear como cambios sinápticos en sistemas clave, que rápidamente permite la “readicción” o recaída al uso de sustancias, aun después de haber transcurrido meses o años de la desintoxicación y abstinencia (Koob y Le Moal, 2001, 2008c).

La motivación y el sistema de la recompensa

Buscar comida y compañía, y evitar el malestar físico y psicológico son ejemplos de conductas adaptativas motivadas. La conducta motivada clásicamente implica la activación del organismo por medio de estímulos externos o internos y un resultado conductual dirigido (Kalivas y Volkow, 2005). Otras conductas motivadas como dormir, llevar a cabo conducta sexual, nos proveen de una sensación subjetiva de placer cuando las realizamos. El estímulo asociado a cada una de estas conductas (por ejemplo, el alimento) funciona como reforzador. Un reforzador, como anteriormente se definió, es aquel estímulo que aumenta la probabilidad de que el sujeto repita una conducta. En el cerebro existe un sistema que se encarga de detectar estímulos que son reforzantes: el sistema de motivación-recompensa o sistema de placer (Ruiz-Contreras, Méndez-Díaz, Romano-López, Caynas, y Prospéro-García, 2012).

Los reforzadores naturales que promueven la sobrevivencia del individuo (por ejemplo, alimentarse) y de la especie (por ejemplo, llevar a cabo conducta sexual) activan al sistema del placer, generando la sensación de recompensa. Incluso, otros reforzadores, como un buen chiste o escuchar música también lo activan (Mobbs y col., 2003; Menon y Levitin, 2005). Todas las drogas estimulan al sistema mesolímbico, ya sea de manera directa o indirecta, activándolo incluso más que los reforzadores naturales (Ruiz-Contreras y col., 2012).

El circuito que media la estimulación cerebral recompensante se encuentra ampliamente distribuido. Los efectos recompensantes pueden ser producidos por estimulación eléctrica en diversos sitios a todos los niveles del cerebro, desde el bulbo olfatorio hasta el núcleo del tracto solitario. Los sitios particularmente efectivos, yacen a lo largo de la trayectoria del haz prosencefálico medial y a lo largo del haz de fibras orientadas longitudinalmente cursando cerca de la línea media del tallo cerebral. La estimulación de estas dos vías activa a las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (AVT) del mesencéfalo; estas neuronas proyectan al núcleo accumbens (NAcc) (el componente principal del estriado ventral), a la porción

ventromedial de la cabeza del núcleo caudado (en el estriado dorsal), al cerebro basal y regiones de la corteza prefrontal. Las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo son activadas por un estímulo incentivo y realizan una función crucial en la estimulación cerebral recompensante. La búsqueda de esta recompensa es fortalecida por un incremento en la transmisión sináptica dopaminérgica y debilitada por su decremento. Las neuronas dopaminérgicas reciben señales excitadoras de las células colinérgicas de los núcleos pedunculopontino y tegmental laterodorsal del cerebro posterior o rombencéfalo. La estimulación del haz prosencefálico medial y de la parte caudal del tallo cerebral, activa a estas neuronas colinérgicas. A su vez, el bloqueo de los inputs colinérgicos a las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo reduce los efectos recompensantes de la estimulación eléctrica cerebral (Kandel y col., 2013).

Ratas hambrientas que tienen acceso diario a alimentación por un periodo breve, ignorarán la comida, el agua e incluso soportarán dolor, por ir a presionar una palanca que le dará estimulación cerebral (Chen, 1993; Hernández y col., 2006). Tal búsqueda de un reforzador artificial sin hacer caso de una necesidad biológica es uno de los muchos paralelismos entre la auto-estimulación y el abuso de droga. Evidencias más directas vienen del hecho de que los animales exhiben un trabajo más intenso para auto-estimularse cuando se le da una droga como cocaína, amfetamina, heroína y nicotina (Kandel y col., 2013).

El sistema de la recompensa en la adicción

El entendimiento de los sustratos neurobiológicos de los efectos reforzantes de las drogas de abuso comenzó con el temprano trabajo de la identificación del sistema de la recompensa en el cerebro, con la identificación de la búsqueda y gratificación de la recompensa o de la auto-estimulación intracraneal por Olds y Milner en 1954. La recompensa por estimulación cerebral, como ya se mencionó arriba, involucra un circuito cerebral amplio, pero los sitios más efectivos definidos por los umbrales más bajos involucran la trayectoria del haz prosencefálico medial (ya antes mencionado), que conecta el AVT con el cerebro basal anterior. Todas las drogas de abuso cuando son administradas de manera aguda, decrementan los umbrales de percepción de la recompensa resultante de diversos estímulos (Koob y Volkow, 2010).

Volviendo nuevamente al sistema de recompensa, el neurotransmisor crucial liberado por la administración de sustancias que producen dependencia, es la dopamina (DA) del AVT al NAcc y a otras estructuras como la amígdala, tubérculo olfatorio, y corteza límbica (Ruiz-Contreras y col., 2012). Se cree que las drogas usurpan estos sistemas cerebrales que naturalmente

están destinados a dirigir al animal a estímulos con relevancia para la preservación de la especie (Koob y Volkow, 2010).

Los principales tipos de receptores de dopamina en el estriado dorsal y en el NAcc son los receptores D1 y D2 acoplados a proteínas G activadora e inhibidora respectivamente. Los receptores D1 predominan en la corteza prefrontal. Un transportador de dopamina localizado en las neuronas presinápticas finaliza las acciones de la dopamina liberada presinápticamente, llevándola de regreso a la terminal que la liberó (Kandel y col., 2013).

Estudios farmacológicos y el análisis de las consecuencias de lesiones en animales, confirman la importancia de las vías dopaminérgicas en la sensación subjetiva de recompensa. Estudios conductuales de las propiedades recompensantes de las drogas, usando algunos paradigmas como el condicionamiento de preferencia de lugar (CPP) o la autoadministración de drogas, han encontrado que el bloqueo de los receptores D1 y D2 disminuye las propiedades incentivadas de las recompensas naturales y de las drogas (Kandel y col., 2013). Se ha visto también que altos niveles del receptor D2 podría proteger contra la autoadministración de droga; ya que estudios pre-clínicos mostraron que la *up-regulation* (sobrexpresión) del este receptor en el núcleo accumbens reduce dramáticamente el consumo de alcohol en animales previamente entrenados para autoadministrarse esta sustancia. En este mismo sentido, sujetos quienes a pesar de tener una fuerte historia familiar de alcoholismo, no son alcohólicos y expresan niveles más altos del D2 en el estriado comparados con individuos que no tienen esa característica de alcoholismo en su historia familiar (Volkow y col., 2007).

Los cambios en los niveles extracelulares de dopamina dentro del NAcc y otras estructuras cerebrales, pueden ser medidos *in vivo* usando una sonda de microdiálisis. Con este método se ha demostrado que la mayoría de las sustancias de abuso incrementan los niveles extracelulares de dopamina en el NAcc. Sin embargo, hay algunas drogas que liberan dopamina y no son adictivas, como el metilfenidato; mientras que hay otras más que son adictivas y no liberan dopamina, como las benzodiazepinas. Por lo tanto, concluimos que la mayoría de las drogas psicotrópicas que no producen liberación significativa de dopamina en el NAcc no son adictivas (Kandel y col., 2013; Marinelli, 2007).

Existe una excepción importante de mencionar, que es frecuentemente llamada: hipótesis de liberación de dopamina. Algunas drogas como los opiáceos también tienen receptores en las vías de la recompensa que son paralelos o *downstream* con la sinapsis dopaminérgica. De esta

manera los opioides producen recompensa por mecanismos dependientes e independientes de dopamina. Por ejemplo, se ha observado que los ratones genéticamente modificados que carecen de dopamina no buscan la cocaína para ser recompensados, pero parecen obtener recompensa residual significativa de la morfina (Kandel y col., 2013; Marinelli, 2007).

Aunque la habilidad para incrementar liberación de dopamina es una propiedad compartida de todas las drogas adictivas, estas lo hacen por mecanismos distintos. Los psicoestimulantes como la cocaína y la anfetamina, actúan sobre las terminales presinápticas de las neuronas dopaminérgicas y lo hacen en dos diferentes maneras. La cocaína se une y bloquea al transportador de dopamina en la membrana de las terminales presinápticas, causando la acumulación de altos niveles de dopamina después de su liberación. La anfetamina por su parte, entra a las terminales presinápticas de las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina. Una vez en el citoplasma, causan transporte invertido de dopamina fuera de las vesículas de almacenamiento a través del transportador vesicular y fuera de la neurona en la sinapsis a través del transportador de membrana. Así, la acción de la cocaína depende de la liberación vesicular normal de dopamina por neuronas del AVT, mientras que la de anfetamina no lo hace de esta manera. En cuanto a otras drogas adictivas, con la microdiálisis se ha demostrado que la nicotina, el alcohol, el tetrahydrocannabinol, y la feniciclidina causan que la dopamina sea liberada en el NAcc. Adicional a esta liberación de dopamina, cada familia de drogas adictivas tiene propiedades únicas basadas en los receptores con los que interactúa (Kandel y col., 2013; Koob y Volkow, 2010).

De manera reiterativa, el circuito extensamente implicado por su participación en las propiedades reforzantes de estímulos naturales y drogas adictivas, consiste en las proyecciones de los cuerpos celulares del AVT a estructuras límbicas (esto es la vía mesolímbica, tales como la amígdala, el pálido ventral, el hipocampo y el NAcc) y a áreas corticales (esto es, la vía mesocortical, que incluye a la corteza prefrontal (CPF), la corteza orbitofrontal (COF) y el cíngulo anterior. Interesantemente, estos circuitos corticoestriatolímbicos operan en paralelo, pero pueden tener distintos roles en la adicción. Por ejemplo, mientras que el NAcc y el pálido ventral parecen estar involucrados en los efectos reforzadores de las drogas de abuso, la amígdala y el hipocampo juegan un rol importante en la implicación del aprendizaje condicionado en el proceso de la adicción. En el caso de la amígdala y el hipocampo ventral, este aprendizaje involucra asociaciones discretas entre el estímulo y la recompensa, mientras que el

hipocampo dorsal media las asociaciones estímulo-estímulo que pueden ser particularmente importantes para el aprendizaje contextual. Por otro lado, la CPF, la COF y el cíngulo anterior regulan las respuestas emocionales, de control cognitivo y las funciones ejecutivas, con la exposición repetida de la droga, se producen adaptaciones celulares de la vía glutamatérgica CPF-NAcc, lo que contribuye a realizar conductas adictivas persistentes, incluyendo la disminución del control cognitivo y la hipersensibilidad hacia los estímulos asociados a las drogas. En conjunto, estos resultados sugieren que la vía mesolímbica está involucrada en los efectos reforzantes agudos de las drogas y en varias respuestas condicionadas relacionadas a la búsqueda de la droga y la recaída, mientras que los cambios en la vía mesocortical median de manera consiente, la experiencia de la droga, la búsqueda de la droga y la pérdida de la inhibición conductual relacionada a la búsqueda compulsiva de la droga y a las conductas de la toma de la droga (Feltenstein y See, 2008).

Corteza Prefrontal

Muchos estudios de imagen se han concentrado en la función de la dopamina en el proceso de la adicción debido a la habilidad de las drogas de abuso por incrementar la concentración cerebral de dopamina en regiones cerebrales límbicas. Sin embargo, el incremento de dopamina en sí no es suficiente para explicar el proceso de la adicción, ya que las drogas de abuso incrementan la dopamina en sujetos *naive* (sin experiencia), así como en sujetos adictos. De hecho, en el caso de la adicción a cocaína, la magnitud del incremento de dopamina inducido por la droga, y la intensidad, reportada por los propios sujetos, de las propiedades reforzantes de la droga (el “*high*”), parece ser más pequeño en los sujetos adictos que en los *naive*. Esto implica que la función de la dopamina en la drogadicción probablemente este mediado por los cambios estructurales y funcionales en los circuitos que son modulados por la dopamina, incluyendo la corteza frontal. En apoyo a esta hipótesis, diversos resultados de estudios con resonancia magnética volumétrica/estructural, han demostrado cambios morfológicos en el lóbulo frontal en varias formas de la drogadicción. Por ejemplo, ha sido identificada la pérdida de volumen en individuos dependientes de cocaína, alcohólicos y dependientes de heroína. Otro estudio nota una relación negativa entre volúmenes prefrontales normales y años de uso de cocaína o heroína, implicando un efecto acumulativo del abuso de sustancias sobre los volúmenes frontales. Evidencia adicional proveniente de estudios hechos en ratas, que muestran que la autoadministración de cocaína, y no de comida, da como resultado cambios morfológicos en

dendritas y espinas dendríticas en la CPF y el NAcc. La activación de la dopamina, vista durante la administración de anfetamina, también suprime la inhibición de la amígdala por medio de la corteza prefrontal, llevando posiblemente a la desinhibición de las respuestas afectivas. Un proceso similar puede ocurrir en la drogadicción en humanos, en la cual los procesos *top-down* de la CPF son reducidos, liberando conductas que normalmente se mantienen bajo estrecha vigilancia y simulando reacciones similares al estrés en las cuales el control inhibitor es suspendido y la conducta motivada por estímulos es acentuada (Goldstein, y Volkow, 2002).

Si la corteza frontal y sus funciones supervisoras son reducidas en la drogadicción, la relevancia de los procesos motivacionales, cognitivos y de automonitoreo para este trastorno no pueden ser reguladas. Específicamente, se ha propuesto que los comportamientos y los estados asociados de motivación que están en el centro de la drogadicción son claramente los procesos de pérdida de voluntad y auto-dirección de conductas, remplazado por patrones automáticos impulsados sensorialmente y la atribución de relevancia primordial hacia la droga de abuso a expensas de otros estímulos recompensantes disponibles (Goldstein y col., 2002). Lo anterior debido a que en condiciones normales a la corteza prefrontal se le ha asignado la función de mantener una memoria de trabajo de la calidad, cantidad y probabilidad de presentación de una recompensa, así como de retener las reglas requeridas para obtener de manera fiable la recompensa. La corteza prefrontal envía proyecciones excitadoras al AVT que hacen sinapsis principalmente en interneuronas GABAérgicas (cola de AVT o núcleo rostro medial tegmental RMTg), pero también a neuronas dopaminérgicas mesocorticales (ver figura 3) (Cooper, 2002).

Hipocampo

La formación hipocampal traza la localización espacial y el contexto donde la recompensa ocurre, sin embargo, carece de sensibilidad para las recompensas en particular. El subículo ventral de la formación hipocampal recibe la mayor aferencia de la región CA1 del hipocampo y se encuentra idealmente situado para transmitir la información contextual hipocampal a muchas regiones dentro del circuito cerebral de recompensa (ver figura 3). En preparaciones *in vivo* e *in vitro*, la mayoría de las neuronas del subículo dispara en ráfagas de potenciales de acción y pueden alternar entre disparos en ráfagas y disparos aislados. Se cree que los cambios en el modo de disparo pueden estar relacionados con el procesamiento contextual nuevo y familiar, así como con la información de la navegación espacial. El subículo envía proyecciones hacia el NAcc, CPF, amígdala e hipotálamo. Aunque el subículo no proyecta directamente hacia las neuronas

dopaminérgicas del mesencéfalo, es capaz de activar indirectamente la actividad de impulso neuronal e incrementar la dopamina en las regiones terminales a través de sus conexiones en el NAcc (ver figura 3)(Cooper, 2002).

Amígdala

La amígdala es especialmente crítica en el establecimiento de asociaciones aprendidas entre eventos motivacionalmente relevantes y, por otro lado, estímulos neutros que se convirtieron en predictores del evento. Las interacciones entre el núcleo central de la amígdala y el basolateral involucran asociaciones autónomas y endócrinas por medio de las proyecciones del núcleo central al tallo cerebral, al hipotálamo y a las neuronas dopaminérgicas del AVT. En contraste, las proyecciones glutamatérgicas de la amígdala basolateral a la corteza prefrontal y al NAcc son requeridas para las asociaciones aprendidas y así influir en las respuestas conductuales más complejas (ver figura 3) (Kalivas y Volkow, 2005).

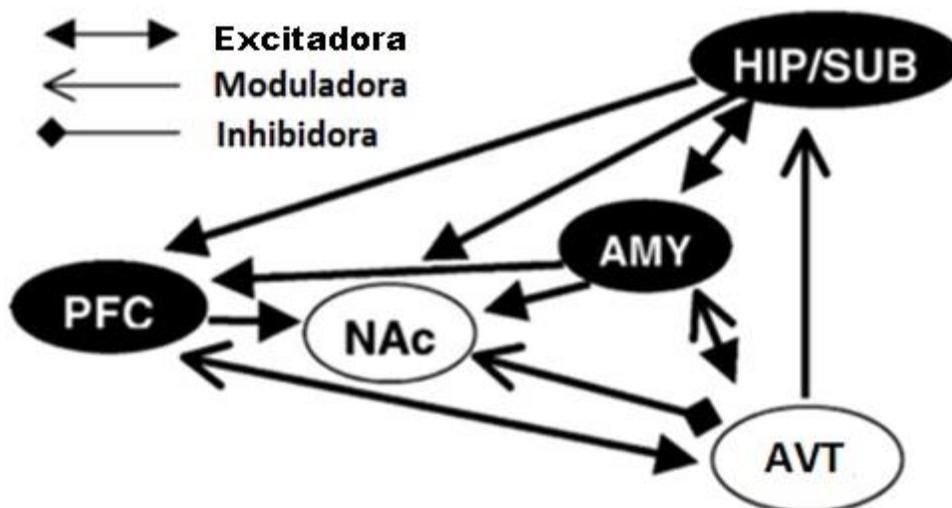


Figura 3. Circuito cerebral de la motivación y recompensa

Circuito cerebral de la motivación y recompensa. La dopamina proveniente de las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (AVT) proveen una influencia moduladora (excitadora o inhibidora) sobre cada componente dentro del circuito. El NAcc integra las entradas excitadoras del subículo (SUB), corteza prefrontal (PFC) y de la amígdala (AMY). El AVT recibe entradas de la AMY y de la PFC y entradas inhibitoras del NAcc. (Figura modificada de Cooper, 2002).

La amígdala también es una estructura importante por su relación con el sistema del estrés. Como ya se mencionó antes, un elemento clave en la drogadicción es la emergencia de un estado emocional negativo (por ejemplo, disforia, ansiedad, irritabilidad) cuando la administración crónica de la droga es detenida. Por lo anterior, se dice que en el proceso de adicción a una droga, la motivación cambia de obtener un reforzamiento positivo a un reforzamiento negativo para aliviar los síntomas del síndrome de abstinencia. Este estado negativo es regulado por el sistema del estrés, que se cree que está localizado en la circuitería del núcleo central de la amígdala. El estrés puede ser definido como las respuestas a las demandas del cuerpo que usualmente han sido definidas por distintos cambios fisiológicos que incluyen la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) (Kudielka y Kirschbaum, 2007). La activación de este eje es caracterizada por la liberación de esteroides adrenales disparados por la liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) de la pituitaria. La liberación de ACTH es controlada a su vez por la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF) hipotalámico al sistema portal pituitario. Una definición de estrés más compatible con sus diversas manifestaciones en el organismo es cualquier alteración en los procesos fisiológicos homeostáticos. El constructo del estrés por lo tanto ha sido ligado al constructo de activación y como tal puede representar la sobreactivación de los sistemas emocional y de activación del cuerpo (Kudielka y Kirschbaum, 2007; Koob, 2009).

Volviendo de nuevo al eje HPA este está compuesto entonces principalmente de 3 grandes estructuras: el núcleo paraventricular del hipotálamo, el lóbulo anterior de la glándula pituitaria y las glándulas adrenales. Las neuronas secretoras en la subdivisión parvocelular medial del núcleo paraventricular sintetizan y liberan CRF en los vasos sanguíneos que entran a la glándula pituitaria anterior. La unión del CRF al receptor CRF1 en la pituitaria induce la liberación de ACTH al sistema circulatorio. La ACTH a su vez estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides que actúan sobre los receptores glucocorticoides en dos áreas principales: el núcleo paraventricular y el hipocampo. Las neuronas hipofisiotrópicas del núcleo paraventricular del hipotálamo son inervadas por numerosas proyecciones aferentes, del tallo cerebral, de otro núcleo hipotalámico y de las estructuras límbicas del prosencéfalo. El CRF es un polipéptido de 41 aminoácidos que controla las respuestas hormonales, simpáticas y conductuales cuando se presenta un estresor. El sistema del CRF interactúa con el sistema de la norepinefrina retroalimentándose el uno al otro a múltiples niveles como en el prosencéfalo basal y en el

puente. El CRF activa a la norepinefrina y la norepinefrina a su vez activa al CRF. Distinta evidencia farmacológica, fisiológica y anatómica apoya la importante función de la interacción del CRF con la norepinefrina en la región del locus coeruleus en respuesta a los estresores. Sin embargo, la norepinefrina también estimula la liberación del CFR en el núcleo paraventricular del hipotálamo, núcleo cama de la estría terminalis y en el núcleo central de la amígdala. Se cree que estos sistemas de retroalimentación tienen una función importante para la movilización de un organismo debida a un reto ambiental (Goeders, 2007; Koob, 2009).

Datos neuroanatómicos recientes y nuevas observaciones funcionales dan apoyo a la hipótesis de que sustratos neuroanatómicos para muchos de los efectos motivacionales de la drogadicción pueden involucrar un circuito neuronal en común que forma una entidad separada dentro del prosencéfalo basal, llamado “amígdala extendida”. La amígdala extendida representa una macroestructura compuesta de diversas estructuras prosencefálicas basales: el núcleo cama de la estría terminalis, la amígdala central medial y una zona de transición en la parte posterior del núcleo accumbens medial. Estas estructuras son similares en morfología, inmunohistoquímica y conectividad, además reciben conexiones de la corteza límbica, hipocampo, amígdala basolateral, mesencéfalo e hipotálamo lateral. Las conexiones eferentes de este complejo incluyen al área posterior medial del pálido ventral (sublenticular), AVT, diversas proyecciones del tallo cerebral y al hipotálamo lateral. Los elementos importantes de la amígdala extendida incluyen no solo a los neurotransmisores asociados con los efectos reforzantes positivos de las drogas de abuso, también a los componentes principales de los sistemas de estrés asociados con el reforzamiento negativo de la dependencia (Waraczynski, 2006; Koob, 2003).

Una respuesta en común a la abstinencia aguda y prolongada de la mayoría de las drogas de abuso es la manifestación de respuestas como la aversión y la ansiedad. Los modelos animales han revelado respuestas como la ansiedad para la mayoría de las drogas de abuso durante la abstinencia aguda. Tales respuestas han sido revertidas por la administración de antagonistas al CRF. Por ejemplo, la variable dependiente frecuentemente vista en estos modelos es una respuesta pasiva hacia un estímulo nuevo y/o aversivo como en el campo abierto o el laberinto elevado. O una respuesta activa hacia un estímulo aversivo, como enterrar algún objeto. La abstinencia de la administración repetida de cocaína produce una respuesta de ansiedad en el laberinto elevado (por ejemplo la no exploración) y en la prueba del enterramiento de un objeto como método de defensa. Estas dos respuestas son revertidas con la administración de

antagonistas del CRF. La abstinencia precipitada en la dependencia a opioides también produce aversión de lugar. En este método, en contraste con el condicionamiento de preferencia de lugar, las ratas son expuestas a un ambiente particular mientras experimentan abstinencia precipitada de los opioides. Como resultado, la rata pasa menos tiempo en el ambiente asociado a la abstinencia cuando se le da a elegir entre ese ambiente y uno no pareado o novedoso. Esta respuesta de aversión al lugar condicionado con la abstinencia se ve bloqueada por la administración sistémica de antagonistas al receptor CRF1, con la administración intracerebral de antagonistas al CRF1 y 2 y también con la administración de antagonistas funcionales noradrenérgicos (Stinus y col., 2005). Estos efectos producidos por antagonistas al CRF han sido localizados en el núcleo central de la amígdala. Estudios celulares usando técnicas de electrofisiología han mostrado que la actividad del ácido gamma aminobutírico (GABA) dentro de las neuronas de la amígdala extendida puede reflejar el estado emocional negativo de la motivación por la búsqueda de la droga en la abstinencia. El CRF por sí mismo facilita los potenciales postsinápticos inhibitorios del GABA_A en registros unitarios celulares en preparación de rebanadas celulares del núcleo central de la amígdala y núcleo cama de la estría terminalis. Este efecto es bloqueado por antagonistas del receptor CRF1. Para la norepinefrina, la evidencia sugiere un mecanismo similar en el núcleo cama de la estría terminalis en el cual registros celulares unitarios en preparación de rebanadas demostraron que la norepinefrina facilita la neurotransmisión GABAérgica. Este efecto noradrenérgico parece estar dado por el receptor α_1 (Dumont y col., 2004). Si los datos del núcleo central de la amígdala y el núcleo cama de la estría terminalis son combinados, se puede decir que tanto el CRF como la norepinefrina incrementan la actividad GABAérgica, acciones a nivel celular que son paralelas a los efectos conductuales descritos arriba con estudios farmacológicos (Koob, 2009).

Dependencia a la marihuana

La marihuana o *cannabis*, es una mezcla gris-verdosa de las hojas trituradas secas, tallos y flores de la planta *Cannabis sativa*. Se ha visto que el THC, componente principal de la marihuana, induce un incremento en los niveles de dopamina extracelulares en el Núcleo Accumbens, que como ya se había mencionado, es una característica que comparten la mayoría de las drogas de abuso (ver fig. 4). Por esto resulta importante estudiar los mecanismos fisiológicos por los cuales actúa la marihuana, además de conocer los resultados estadísticos sobre el consumo de esta misma.

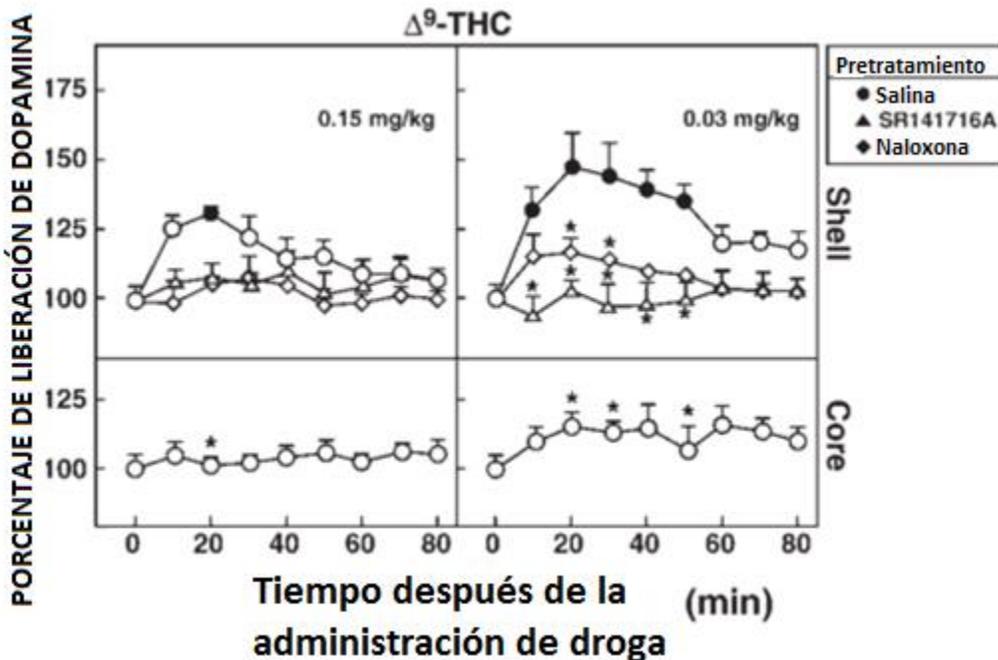


Figura 4. Efecto de la administración intravenosa de THC sobre la liberación de dopamina

Se muestra el efecto de la administración intravenosa de Delta 9-THC sobre el dializado de dopamina en el núcleo accumbens shell (panel superior) y core (panel inferior). Las dosis de THC fueron de 0.15 y 0.30 mg/kg iv. Las ratas pretratadas con salina (círculos), SR141716-A (triángulos) (0.1 mg/kg i.p.) o naloxona (diamantes) (0.1 mg/kg i.p.). Los resultados son las medias de la cantidad de dopamina en las muestras dializadas por 10 minutos, expresadas como porcentaje de los valores basales. Para los símbolos sólidos, $P < 0.05$ comparados con los valores basales. Para los asteriscos, $P < 0.05$ comparados en el valor correspondiente obtenido el Shell de los controles pretratados con salina (Figura modificada de Tanda, 1997).

Consumo de Cannabis a nivel mundial y Nacional

La prevalencia anual estimada de consumo de cannabis se situó en 2010 entre el 2,6% y el 5% de la población adulta (entre 119 millones y 224 millones de usuarios de 15 a 64 años de edad). El cannabis sigue siendo la sustancia ilícita de mayor consumo mundial. Pueden existir variaciones entre las dos principales formas de consumo de cannabis, a saber, la resina y la hierba, e incluso hay indicios de que en algunas regiones está aumentando la popularidad de la marihuana sintética entre los jóvenes, pero en general la prevalencia anual de consumo de cannabis se mantuvo estable en 2010 (UNODC, 2012).

La prevalencia nacional, para la población total de 12 a 65 años, respecto al consumo de cualquier droga en el último año pasó de 1.6% a 1.8%, incremento que no es estadísticamente significativo. Asimismo, el consumo de drogas ilegales es de 1.5%, muy similar al encontrado en

2008. Con relación a las drogas específicas, la marihuana se mantiene como la de mayor consumo con una prevalencia del 1.2%, y con relación al 2008, no hubo un incremento estadísticamente significativo en la población general, pero sí en los hombres en quienes el consumo pasó de 1.7% a 2.2%. La siguiente droga de mayor prevalencia es la cocaína con un 0.5%, similar al 2008. El consumo en el último año de las demás drogas sigue siendo mínimo, abajo del 0.2% (ver figura 5) (CONADIC, 2011).

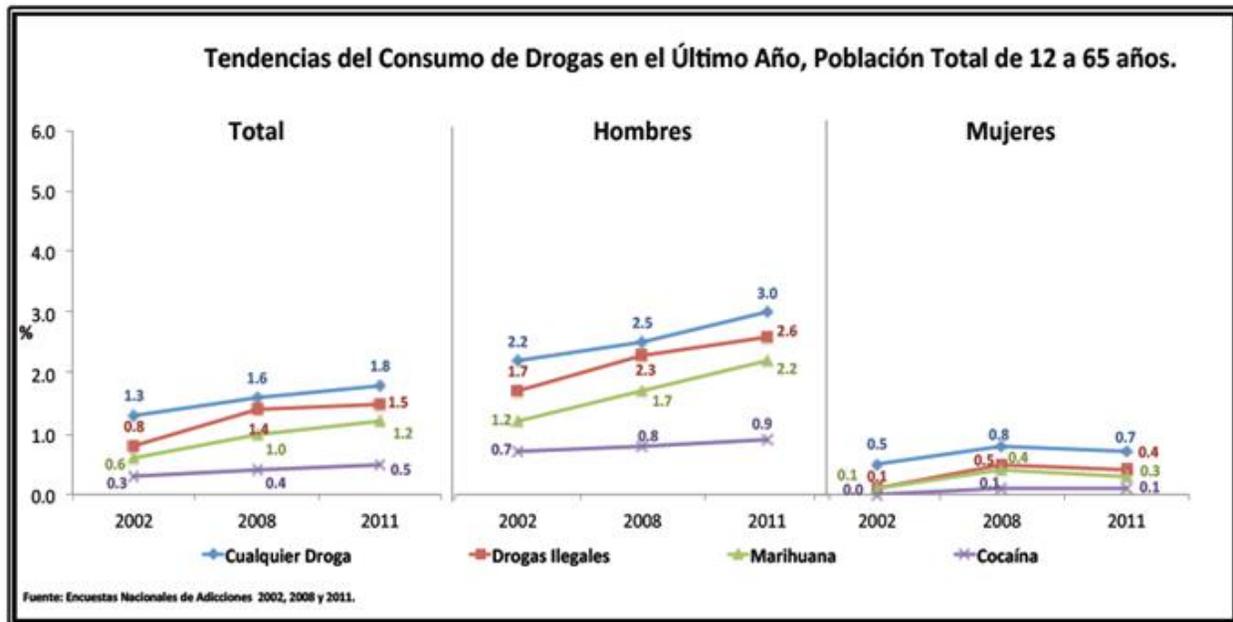


Figura 5. Tendencias del consumo de drogas en población de 12 a 65 años

La marihuana es la droga ilícita más consumida en México. Existe un incremento de su consumo, en 2008 de 1% a 1.2% de la población total entre 12 y 65 años en 2011. Los hombres presentan un consumo más alto en general para todas las drogas comparados con las mujeres. Así mismo muestran un incremento significativo de consumo de marihuana del 2008 (1.7% a 2.2%) al 2011. (Figura tomada de la Encuesta Nacional de Adicciones, 2011).

A continuación se hablará sobre la planta de marihuana y se describirá el sistema endocanabinoide para después poder adentrarnos en el tema de la dependencia a *cannabis*.

La planta

La *cannabis* (marihuana) probablemente se originó en Asia Central, pudo haber sido cultivada hace ya 10,000 años. Podemos afirmar con seguridad que se cultivaba en China en el 4000 a de C. y en Turkestán en el 3000 a. de C. Ha sido utilizada durante mucho tiempo como medicina en India, China, Medio Oriente, Sudeste de Asia, Sudáfrica, y Sudamérica. La primera prueba del

uso medicinal del cannabis es un herbario publicado durante el reinado del emperador chino Chen Nung hace 5,000 años. El cannabis era recomendado para la malaria, el estreñimiento, los dolores reumáticos, “las distracciones” y los dolores asociados a la menstruación. Otro herbario chino recomienda una mezcla de cáñamo, resina y vino como analgésicos para la cirugía. En la India el cannabis ha sido recomendado para estimular la mente, bajar a fiebre, inducir el sueño, curar la disentería, estimular el apetito, facilitar la digestión, quitar los dolores de cabeza y curar las enfermedades venéreas. En África fue usado para la disentería, la malaria y otras fiebres. Pero el cannabis no hizo valer sus méritos en Occidente como medicina hasta mediados del siglo XIX. Durante su apogeo, de 1840 a 1900, encontramos en la bibliografía médica de Occidente más de un centenar de documentos que lo recomiendan para diversas enfermedades y “desarreglos”(Grinspoon y Bakalar, 1997). A través de las actividades del hombre ha sido distribuida ampliamente alrededor del mundo. La mariguana ha sido cultivada como una planta con varios propósitos económicos por miles de años y a través del proceso de selección de varias características deseables, existen muchas variedades distintas de esta planta, algunas plantas cultivadas por su contenido en fibra, otras por su contenido de químicos psicoactivos. Sin embargo, todas estas variedades son clasificadas generalmente como una sola especie llamada en un principio en 1735 por el famoso botánico sueco, Linaeus, como *Cannabis sativa*. La planta Cannabis es exuberante y de rápido crecimiento anual, la cual puede alcanzar la madurez en 60 días cuando es cultivada en el interior bajo condiciones óptimas de calor y luz, y en cultivo al aire libre después de 3 a 5 meses (Iversen, 2000).

Botánicamente, está clasificada como integrante de la familia Cannabaceae y el género *Cannabis*. La mayor parte de los botánicos está de acuerdo en diferenciar tres especies: La *Cannabis sativa*, la más difundida de las tres, es alta, larguirucha y con ramificaciones bastante separadas, llegando a adquirir una altura de hasta unos veinte pies; la *Cannabis indica* es más baja, mide aproximadamente unos tres o cuatro pies de altura, tiene forma piramidal y está densamente ramificada; la *Cannabis ruderalis* tiene aproximadamente dos pies de altura con pocas ramificaciones o sin ellas. Estas especies presentan también ciertas diferencias en las hojas, el tallo y la resina. Según una clasificación alternativa, el género tendría sólo una especie muy variable, *Cannabis sativa*, con dos subespecies, *sativa e indica*. La primera, más septentrional, produce más fibra y aceite; la segunda, más meridional, produce mayor cantidad de resina tóxica (Grinspoon y Bakalar, 1997).

El cannabis se ha convertido en una de las plantas más difundidas y diversificadas. Crece, ya sea de forma silvestre o como planta cultivada, por todo el mundo en una gran variedad de climas y suelos. La fibra ha sido utilizada para fabricación de tela y papel durante siglos y ha sido la más importante fuente de materia prima para la fabricación de cuerdas hasta el desarrollo de las fibras sintéticas. Las semillas (o, estrictamente hablando, los aqueninos, frutos pequeños y duros) han sido utilizados como comida de pájaros y a veces como comida humana. El aceite contenido en las semillas fue utilizado antiguamente para iluminación y fabricación de jabón y es ahora utilizado en ocasiones en la manufactura de barnices, linóleo y pinturas (Grinspoon y Bakalar, 1997).

Los componentes químicos responsables de los efectos tóxicos y medicinales se encuentran principalmente en una resina dorada y pegajosa exudada por las flores de las plantas femeninas. La función de la resina es servir de protección contra el calor y preservar de la humedad durante la reproducción. Las plantas con mayor cantidad de resina son, en consecuencia, las que crecen en regiones cálidas como México, Oriente Medio y la India. Cuando el proceso reproductivo ha terminado y los frutos están completamente maduros, no se secreta más resina (Grinspoon y Bakalar, 1997).

Los preparados de cannabis utilizados en la India se emplean con frecuencia como patrón popular de potencia. Estos preparados son de tres clases: conocidos como *bhanga*, *ganja* y *charas*. El preparado menos potente y más barato, *bhanga*, se obtiene por trituración de hojas, semillas y tallos secos. La *ganja* se obtiene de las extremidades florales de las plantas femeninas cultivadas y es dos o tres veces más fuerte que el *bhanga*. *Charas* es una resina pura, conocida también como *hachís* en Oriente Medio. Cualquiera de estos preparados puede ser fumado, comido o mezclado en las bebidas. La marihuana utilizada en Estados Unidos es equivalente al *bhanga* o, cada vez más en los últimos años, a la *ganja* (Grinspoon y Bakalar, 1997).

La planta de marihuana contiene más de 460 componentes conocidos, de los cuales más de 60 tienen la estructura de carbono-21 típica de los cannabinoides. Algunos de ellos son el Delta-9 THC (también conocido simplemente como THC), cannabinol, canabidiol, canabigerol, canabitriol, canabicromeno, canabiciolol y canabielsoin. El cannabinol (CBN) fue el primer cannabinoide aislado de la planta en los 40s. El CBN es el producto primario de la degradación del THC, y se encuentra presente fresco en la planta, este es medianamente psicoactivo, y es percibido como sedativo y estupefaciente. El canabidiol (CBD) fue el segundo fitocannabinoide

aislado, este no es psicoactivo, y al parecer modera los efectos eufóricos del THC, sin embargo puede decrementar su tasa de eliminación del cuerpo, tal vez porque interfiere con el metabolismo del TCH en el hígado. Se ha observado que el CBD tiene una afinidad más alta para el receptor CB2 que para el CB1. El THC fue extraído por primera vez del *cannabis sativa* en 1942. En 1964 Gaoni y Mechoulam elucidaron la estructura del THC y más de dos décadas después, el grupo de Howlett identificó los sitios específicos de unión en el cerebro. El THC es el principal canabinoide, agonista parcial de los receptores CB1, es altamente psicoactivo y a la vez se encuentra presente en gran cantidad en la planta, habitualmente entre 1 y 5 % de peso, es (-)(3,4-trans-delta-1-tetrahidrocannabinol), también conocido como delta-1-THC, delta-9-THC, o simplemente THC. Algunos otros tetrahidrocanabinoides son aproximadamente tan potentes como el delta-9-THC, pero sólo están presentes en unas pocas variedades de cannabis y en cantidades mucho menores (Grinspoon y Bakalar, 1997; Méndez-Díaz, Herrera-Solís, Soria-Gómez, Rueda-Orozco, y Prospéro-García, 2008).

En cuanto a su metabolismo, el THC es absorbido rápidamente y convertido en los pulmones y en el hígado en un metabolito activo, el 11-hidroxi-delta 9-THC. Este metabolito es más potente que el delta 9-THC y atraviesa más fácilmente la barrera hematoencefálica. Sin embargo, al que se le atribuyen las propiedades psicoactivas en al THC. Finalmente, el 11-hidroxi-delta 9-THC es transformado en el hígado a diversos metabolitos inactivos, incluyendo el 11-no-carboxi-delta 9-THC, el cual es el metabolito más abundante en el plasma y la orina y puede ser detectado 2-3 días después de fumar un cigarro de marihuana (Ameri, 1999).

El sistema endocanabinoide

Los receptores a canabinoides

El sistema endocanabinoide consiste de los receptores canabinoides, sus ligandos endógenos (los endocanabinoides) y las proteínas enzimas que catalizan la formación y la degradación de los endocanabinoides.

Hasta ahora se ha descrito que los tejidos de mamíferos expresan al menos dos tipos de receptores canabinoides 1 (CB1) y 2 (CB2). El primero, clonado en 1990 y el segundo en 1993, ambos miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. El receptor CB1 es el principal mediador de los efectos psicoactivos del cannabis y sus derivados. El CB1 media la inhibición de la liberación de neurotransmisores, como el glutamato, GABA, norepinefrina,

dopamina y serotonina, en el sistema nervioso central por medio de la inducción de hiperpolarización de las terminales presinápticas. Su activación inhibe los canales de calcio (Ca^{++}) y activa los canales de potasio (K^+) (Pertwee, 2005) (ver figura 6). Los receptores CB1 son encontrados principalmente en terminales de neuronas centrales y periféricas donde, como ya antes se mencionó, median la inhibición de la liberación del neurotransmisor. El RNA mensajero puede ser encontrado, aunque en bajas concentraciones, en tejidos periféricos, incluyendo glándulas suprarrenales, médula espinal, corazón, pulmón, próstata, testículos, amígdalas y bazo. Este mensajero también está presente a bajos niveles en algunos tipos de líneas celulares inmunes, como lo es la THP-1, células B Raji, células NK y células T. Los receptores CB2 se encuentran predominantemente localizados en células del sistema inmunológico, particularmente en células B maduras y en menor grado en macrófagos. Se encuentran también en células mononucleares sanguíneas periféricas, células NK, entre otras. Las funciones de estos receptores CB2 incluyen la modulación de liberación de citocinas y la migración de células inmunológicas (Howlett, 2005, 2002; Pertwee, 2005).

Expresión del receptor CB1 en regiones específicas del Sistema Nervioso Central

El patrón de distribución central del receptor CB1 es heterogéneo e incluye los núcleos basales y el sistema límbico, el NAcc y el hipocampo, así como la corteza cerebral y también en la capa molecular del cerebelo (Matsuda, Bonner, y Lolait, 1993) (ver figura 7). Existe una distribución marcadamente heterogénea en la amígdala. En el complejo basolateral se encuentran altos niveles de este receptor, así como en el núcleo del tracto olfatorio lateral, la corteza periamigdaloides y las áreas amígdalohipocámpales. Se sugiere entonces que los receptores CB1 amigdaloides tienen participación en la generación de los estados de pánico ocasionalmente vistos después del consumo de cannabis en grandes cantidades (Mackie, 2005).

Debido a las propiedades analgésicas de los agonistas del receptor CB1, sabemos que estos receptores se encuentran también en vías del dolor en el cerebro y médula espinal y en las terminales periféricas de neuronas sensoriales primarias. Aunque la concentración del receptor CB1 es considerablemente menor en los tejidos periféricos que en el sistema nervioso central, esto no significa que los receptores CB1 periféricos no sean importantes (Pertwee, 2005, 2010). Tejidos periféricos en los cuales el receptor CB1 es expresado en neuronas incluyen el corazón, conductos deferentes, vejiga urinaria e intestino delgado. Como ya se mencionó, ambos

receptores CB1 y CB2 están acoplados a proteínas G, que inhiben a la adenilatociclasa y activan a la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Pertwee, 2010).

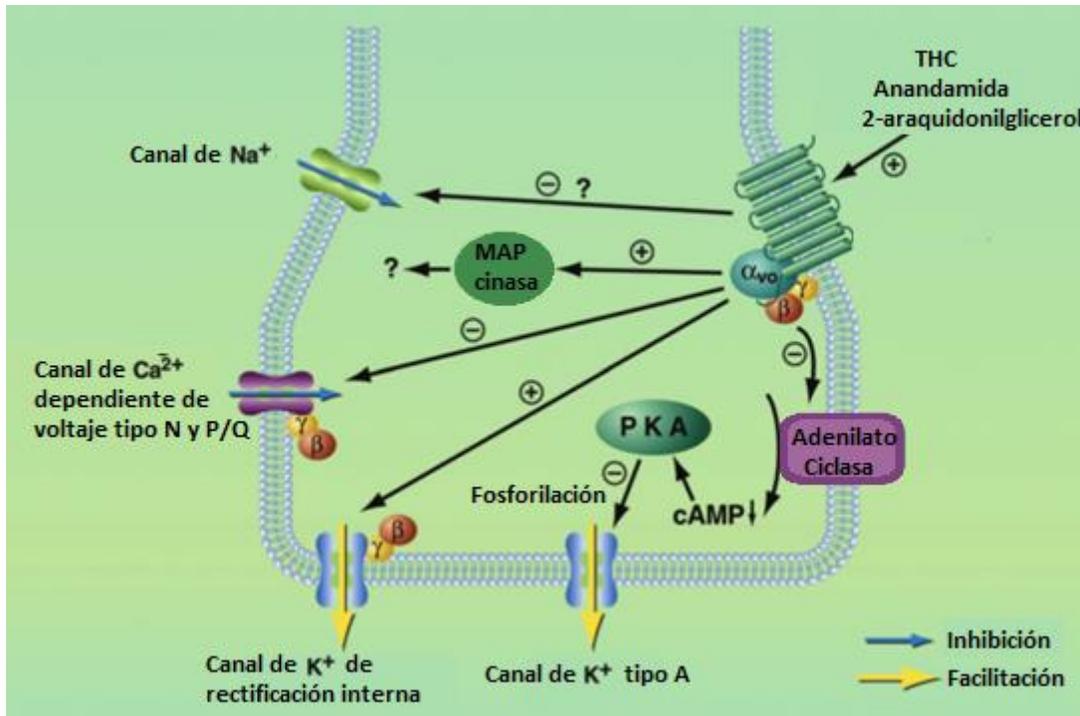


Figura 6. Mecanismos de transducción de señales estimulados por el receptor CB1 de una terminal presináptica

Mecanismos de transducción de señales estimulados por el receptor CB1 de una terminal presináptica. La proteína G promueve la estimulación de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPk) y la inhibición del adenilato ciclasa, por lo tanto se atenúa la producción de adenosinmonofosfato cíclico (AMPC). También existe una inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo N y Q/P, una estimulación de los canales de potasio de rectificación interna. La activación de las corrientes de potasio tipo A también dependiente de la proteína G, pero es modulada por medio de la inhibición de adenilatociclasa inducida por canabinoides. Debido al decremento en la acumulación de AMPC, la proteína cinasa (PKA) dependiente de AMPC es inhibida por medio de la activación del receptor CB1. En ausencia de canabinoides, la PKA dependiente de AMPC fosforila a la proteína del canal de potasio tipo A, ejerciendo así un cambio negativo en su voltaje-dependencia. Sin embargo, en presencia de canabinoides, la fosforilación del canal por la PKA dependiente de AMPC se encuentra reducida. Esto lleva a un posible cambio positivo en el voltaje-dependencia y a una facilitación en la corriente saliente de potasio. El acoplamiento receptor-efector el cual se encuentra facilitado por canabinoides está marcado por líneas amarillas, y los que son inhibidos están marcados por líneas azules (Ameri, 1999). Este esquema fue modificado de Koob y Le Moal (2006), basado en el original de Ameri (1999).

LOC. INMUNOHISTOQUIMICA CB1 (SAGITAL)

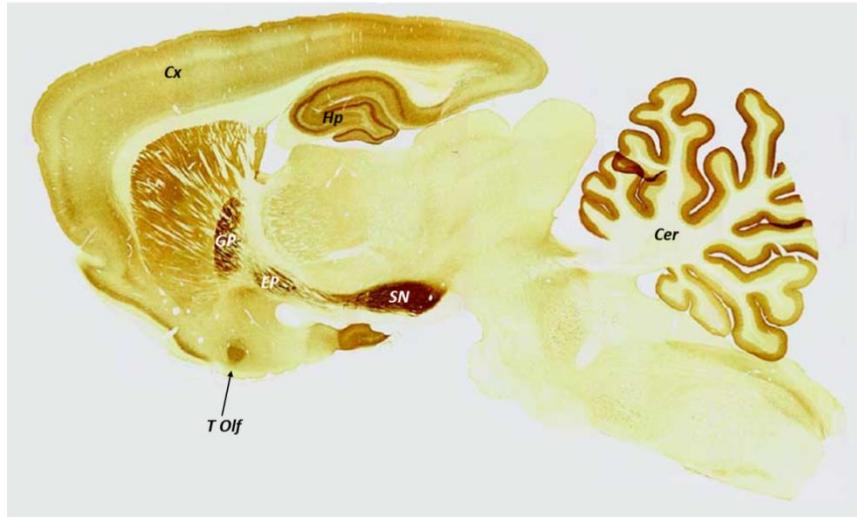


Figura 7. Immunohistoquímica del receptor CB1

Inmunohistoquímica del receptor CB1 realizada en un corte de cerebro de rata cepa WISTAR. Corteza (Cx), Hipocampo (Hp), Cerebelo (Cer), Sustancia *Nigra* (SN), Globo Pálido (GP), Núcleo Entopeduncular (EP) y Tracto olfatorio (TOlf). Esta inmunohistoquímica fue realizada en el Laboratorio de Canabinoides del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

A continuación se describirán brevemente la distribución del receptor CB1 en las áreas cerebrales más importantes para este trabajo:

Neocorteza

Como ya se mencionó anteriormente, los receptores CB1 se encuentran densamente expresados en todas las regiones de la corteza. La variación en la expresión del CB1a través de las regiones corticales ha sido examinada más extensamente en cerebros humanos usando autoradiografía del receptor. Por medio de esta, se ha encontrado variación entre las distintas regiones, encontrando los niveles más altos en el giro cingulado, corteza frontal, corteza somatosensorial secundaria y motora. Los niveles más bajos se han localizado en la corteza somatosensorial primaria. La naturaleza laminar de la expresión del CB1 en la neocorteza cerebral es llamativa, los niveles de expresión varían entre regiones. Sin embargo, como un ejemplo, en la corteza somatosensorial en ratas, los niveles de CB1 son relativamente más altos en las capas II, III, IV y VI. En contraste, la expresión del CB1 es relativamente menor en las capas III y V. En la capa I el receptor se

encuentra casi ausente (Mackie, 2005). En la neocorteza, casi todas las neuronas que expresan CB1 en niveles altos o moderados son probablemente inhibitorias debido a la estrecha correlación entre GAD65 y la expresión del RNAm del CB1. Sin embargo, parece ser que el CB1 se encuentra mediando las transmisiones glutamatérgicas en la corteza (Mackie, 2005).

Hipocampo

El hipocampo expresa niveles altos de receptores a canabinoides. Debido a los efectos cognitivos de los canabinoides, esta región cerebral ha recibido mucha atención como un sitio de acción de canabinoides endógenos y exógenos. Los primeros estudios autoradiográficos encontraron niveles muy altos de receptores CB1 en todas las subareas del hipocampo también como en el giro dentado. Estudios de hibridación *in situ* revelaron que mucho de esta expresión del CB1 surge de un conjunto restringido de interneuronas. Estudios de inmunocitoquímica identificaron un plexo denso de axones terminales que contienen CB1 rodeando la capa de células piramidales. También se ha observado que altos niveles de expresión del CB1 se encuentran restringidos a la expresión de interneuronas expresando CCK. Dado que la expresión de interneuronas de CCK puede estar involucrada en los aspectos más subjetivos (emocionales y motivacionales) del procesamiento de información, es probable que los endocannabinoides estén involucrados en el funcionamiento normal de estos circuitos, y los canabinoides exógenos pueden alterarlos de alguna manera. Este patrón de expresión interneuronal selectiva y axonal del CB1 se encuentra preservado en todas las etapas del desarrollo posnatal en la rata (Mackie, 2005).

La expresión de los receptores CB1 en las principales células del hipocampo es un tema de mucha controversia. Por un lado, estudios de inmunocitoquímica con microscopio electrónico con anticuerpos específicos al CB1, consistentemente han fallado en encontrar expresión del receptor CB1 en células piramidales. Por otro lado, estudios de hibridación *in situ* consistentemente mostraron bajos niveles de RNAm de CB1 en el estrato piramidal. Observaciones que complican la interpretación de esos estudios, son las que demuestran que distintos fármacos que actúan sobre los receptores CB1 (por ejemplo, el WIN55,212-2 y el SR141716) también inhiben la liberación de glutamato de las neuronas piramidales de forma independiente del receptor CB1, esto fue mostrado en ratones *knockout* de CB1 (Mackie, 2005).

Amígdala

La distribución del receptor CB1 en la amígdala es marcadamente heterogéneo. Niveles altos pueden ser encontrados en el complejo basolateral (comprendido por el núcleo lateral, basal y basal accesorio), el núcleo del tracto olfatorio lateral, la corteza periamigdaloides, y las áreas amigdalohipocámpicas. En contraste, los receptores CB1 se encuentran expresados escasamente en los núcleos medial, central e intercalado. Como en otras regiones del prosencéfalo, los receptores CB1 se expresan principalmente en los axones de terminales GABAérgicas que contienen CCK. La activación de estos receptores CB1 por cannabinoides decrecientan la liberación de GABA desde estas terminales, lo cual puede desinhibir las células piramidales glutamatérgicas basolaterales. Como en otras regiones del prosencéfalo, existe también una concordancia relativamente alta entre la expresión en la amígdala del CB1 y del receptor de serotonina 5-HT₃. Otras evidencias sugieren que los endocannabinoides tienen una función en la modulación del condicionamiento de miedo al nivel de la amígdala, y los receptores amigdaloides CB1 pueden facilitar los estados de pánico vistos ocasionalmente después del consumo de cantidades grandes de cannabis (Mackie, 2005).

Núcleo Accumbens

Los receptores CB1 se encuentran también expresados de baja a moderadamente en el núcleo accumbens. El CB1 se encuentra expresado en las terminales glutamatérgicas de la vía corteza prefrontal-accumbens. También se encuentra presente en las neuronas espinosas medianas. Estos parecen estar ausentes en las terminales dopaminérgicas que proyectan del área tegmental ventral al accumbens. Consecuentemente, la liberación de dopamina por estimulación cannabinoide, en el núcleo accumbens, parece ser un efecto indirecto, tal vez mediado por la inhibición de la liberación de GABA (Mackie, 2005).

Los endocannabinoides

El descubrimiento del receptor cannabinoides y la disponibilidad de canabiméticos potentes altamente selectivos llevaron a la rápida identificación de una familia de lípidos transmisores que sirven como ligandos naturales para los receptores cannabinoides. Los endocannabinoides son derivados del ácido araquidónico conjugado con etanolamina o glicerol. Entre los más estudiados están el N-araquidoniletanolamina (anandamida), 2-araquidonilglicerol (2-AG) y oleamida, los cuales son sintetizados a demanda en respuesta a las elevaciones de calcio intracelular (Serrano y

Parsons, 2011). La figura 8 muestra la estructura química de tres endocannabinoides, anandamida, 2-AG y oleamida. El primer endocanabinoide identificado fue la anandamida (ANA) en 1992 (aislado del cerebro de cerdo) (Devane, Hanus, Breuer, Pertwee, Stevenson, Griffin, Gibson, Mandelbaum, Etinger y Mechoulam, 1992) y el 2-AG (aislado de los intestinos de perro) en 1995 (Mechoulam y col., 1995). Ambos sintetizados a demanda en respuesta a elevaciones intracelulares de calcio. La anandamida es farmacológicamente similar al THC en su función como agonista parcial a ambos receptores CB1 y CB2 (aunque este es menos eficaz al CB2 comparado con el CB1), en adición al receptor de potencial transitorio (TRPV1), a los receptores activadores del proliferador de peroxisomas (PPAR α y PAAR γ) y es encontrado en casi todos los tejidos en un amplio rango de animales. Parece ser entonces tan potente como el THC, aunque con una vida media más corta. El 2-AG se une a ambos receptores CB1 y CB2, este endocanabinoide es muy abundante y tiene una completa actividad agonista hacia el CB1; por lo tanto es más potente y eficaz que anandamida (Méndez-Días y col., 2008; Serrano y Parsons, 2011). La anandamida y 2-AG también funcionan como agonistas a los receptores huérfanos acoplados a proteína G que pueden ser miembros de la familia de receptores cannabinoides tales como el GPR55 y el GPR119 (Serrano y Parsons, 2011). En 1994 la oleamida (OLE) fue aislada del líquido cerebroespinal de gatos privados de sueño (Cravatt, Prospéro-García, Siuzdak, Gilula, Henriksen, Boger y Lerner, 1995) y sus propiedades inductoras de sueño fueron caracterizadas. Se ha demostrado que OLE es inactivado por la hidrolasa de ácidos grasos amidados (FAAH) y se une al receptor CB1 a dosis relativamente altas. En el 2001 un cuarto endocanabinoide fue aislado, 2-araquinodil gliceril éter (noladin éter). Este se une al receptor CB1 y causa sedación, hipotermia, inmovilidad intestinal y una leve antinocicepción en el ratón (ver Méndez-Díaz y col., 2008).

En el cerebro la concentración de anandamida es 200 veces menor que la del 2-AG. El monoglicérido 2-AG es un intermediario metabólico en el metabolismo de lípidos, mientras que la anandamida es el producto de la escisión de un fosfolípido de membrana. Sin embargo, después de la despolarización o de la estimulación del receptor (por ejemplo, del receptor D2 mediado por dopamina), la concentración de la anandamida puede elevarse hasta 5 a 12 veces por corto tiempo (Rodríguez de Fonseca y col., 2005).

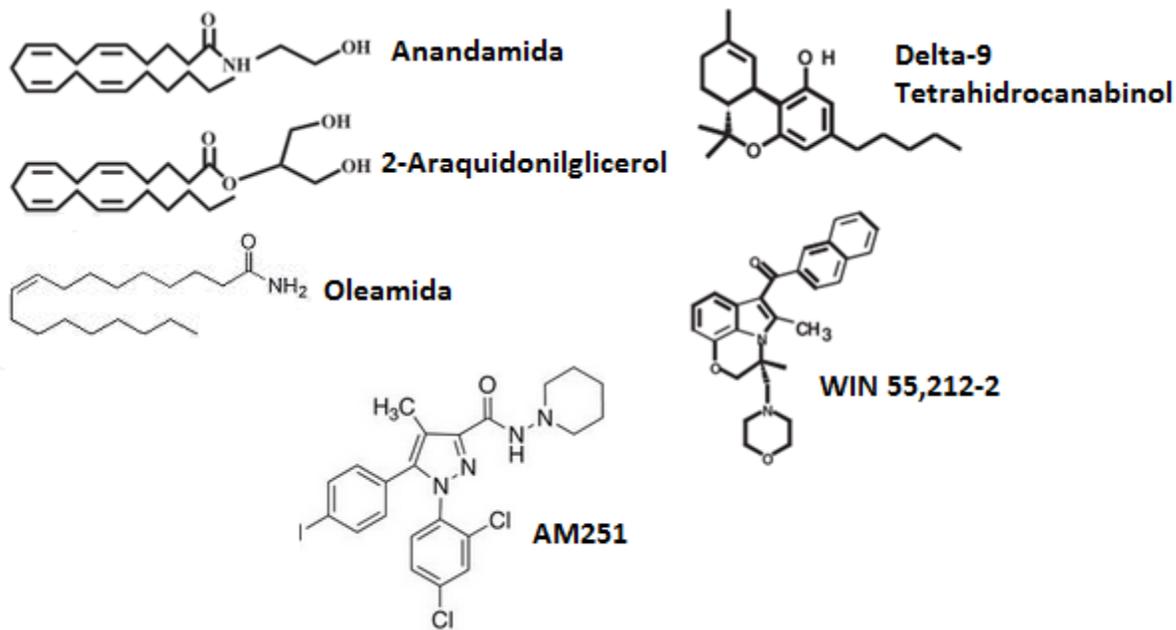


Figura 8. Principales agonistas y antagonista de receptores cannabinoides

Agonistas y antagonista de receptores cannabinoides. A la izquierda se encuentra la estructura de dos derivados de ácido araquidónico que han sido identificados como ligandos endógenos para ambos tipos de receptores cannabinoides (CB1 y CB2). Abajo se encuentra la Oleamida. A la derecha, la estructura del Delta⁹-tetrahydrocannabinol (THC), y la del aminoalquilindol WIN-55,2122 un agonista canabinoide sintético de los receptores CB1 y CB2. En medio abajo se encuentra la estructura del agonista AM 251 (Figura modificada de Rodríguez de Fonseca y col., 2005).

Aunque tienen una estructura y función similar, estos endocannabinoides muestran grandes diferencias en términos de pasos bioquímicos, afinidad del receptor y vías de degradación. La síntesis de anandamida se inicia con la activación de la N-acil-transferasa (NAT) que es activada por Ca⁺⁺. Esta reacción genera N-Araquidonil-Fosfatidil Etanolamina (NAPE) el cual es sustrato de la fosfolipasa D hidrolizante de N-Araquidonil-Fosfatidil Etanolamina (NAPE-PLD), lo que genera araquidoniletanolamida (anandamida) (Wang y Ueda, 2009). Aunque esta ha sido considerada como la principal ruta de producción de anandamida, se ha sugerido la presencia de al menos dos vías distintas de formación de este endocanabinoide. Una vía involucra la deacilación-O-doble de NAPEs por la alfa, beta-hidrolasa (ABHD4) para formar glicerofosfo-N-aciletanolaminas (GP-NAEs), seguida por la conversión de estos intermediarios a NAEs por medio de glicerofosfodiesterasa-1 (GDE1). Otra vía utiliza una fosfolipasa C (PLC) para producir fosfo-N-araquidonoiletanolamina (pAEA) de la NAPE, seguida por la conversión de pAEA en AEA por fosfatasa tales como PTPN22 y SHIP1 (Serrano y Parsons, 2011). El 2-

AG se deriva primariamente del metabolismo hidrolítico de diacilglicerol-1,2 (DAG) mediado por dos sn-1- lipasas selectivas DAG, DAGL-alfa y DAGL-beta (sn= numeración estereoespecífica) (Serrano y Parsons, 2011).

Por otro lado, se ha demostrado que los niveles basales de la anandamida y del 2-AG están regulados por la recaptura celular en neuronas y en células gliales y subsecuentemente por hidrólisis intracelular. Son dos principales familias de enzimas que hidrolizan, la hidrolasa de ácidos grasos amidados (FAAH) y monoacil glicerol lipasa (MAG-L), responsables de la anandamida y el 2-AG respectivamente. La FAAH escinde a la anandamida en ácido araquidónico (AA) y etanolamina (Ver figura 9). Por su parte la MAG-L escinde al 2-AG en AA y glicerol. La FAAH puede también hidrolizar al 2-AG. La FAAH se encuentra expresada abundantemente en el Sistema Nervioso Central (SNC) y las neuronas positivas para FAAH se encuentran próximas a las terminales que contienen al receptor CB1, apoyando el papel de esta enzima en la inactivación endocanabinoide (Serrano y Parsons, 2011).

Además de la FAAH, la anandamida puede ser hidrolizada por la amidasa N-aciletanolamida que hidroliza ácidos (NAAA) y oxigenada por ciclooxigenasa-2 (COX-2), isoenzima lipooxigenasa (LOX) y por el citocromo P-450. Por otro lado, además de la MAG-L, el 2-AG puede ser hidrolizado por una serie de serina hidrolasa alfa-beta-hidrolasa de dominio 6 o 12 (ABHD6, ABHD12) (Luchicchi y Pistis, 2012; Serrano y Parsons, 2011).

Efectos de los cannabinoides

Los efectos conductuales pueden variar en función de la dosis, la ruta de administración, lo esperado por los sujetos y la vulnerabilidad individual a ciertos efectos. A pesar de la influencia de estos factores, se ha visto que los cannabinoides producen un síndrome único de efectos sobre la conducta en humanos y animales. La característica más importante es un periodo inicial de euforia y relajación, el cual es seguido por un periodo depresor. A bajas dosis, los cannabinoides producen una mezcla de efectos estimuladores y depresores, y a altas dosis ejercen predominantemente depresión. Los efectos subjetivos placenteros de fumar marihuana, los cuales presuntamente contribuyen a su abuso incluyen sentimientos de tranquilidad y distorsiones visuales y auditivas (Ameri, 1999).

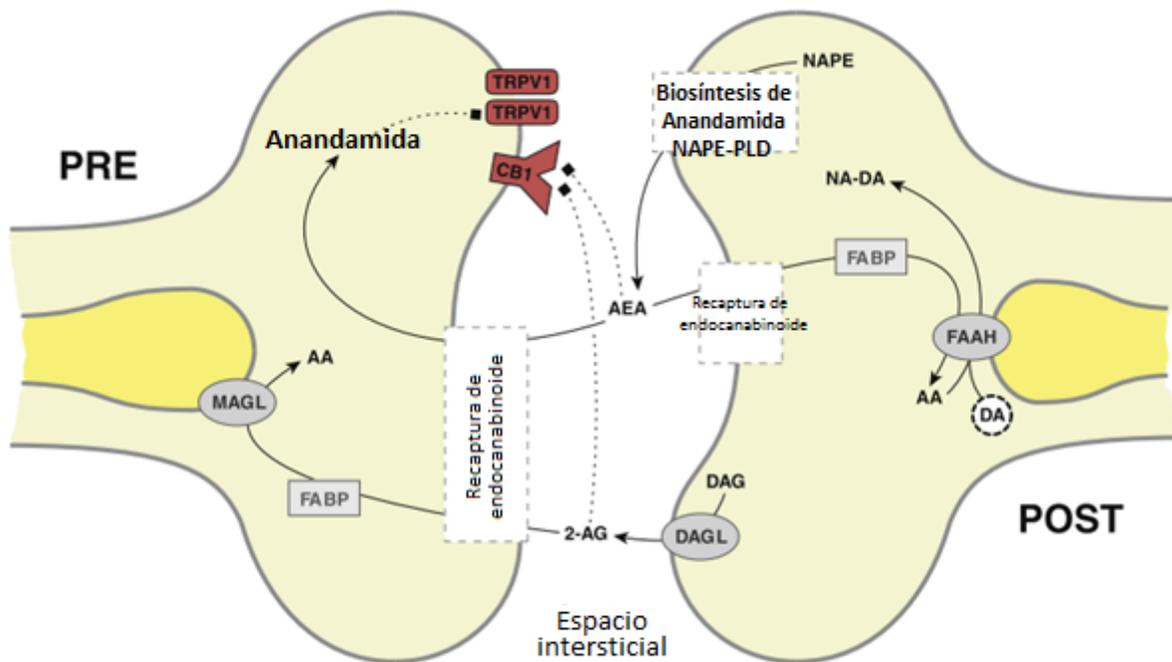


Figura 9. Organización sináptica del sistema endocanabinoide

Organización sináptica del sistema endocanabinoide. La anandamida y el 2-AG son sintetizados de fosfolípidos en la célula postsináptica. La ruta más comúnmente aceptada para la síntesis de anandamida involucra su formación directa del N-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE) por medio de una fosfolipasa D específica (NAPE-PLD). El 2-AG se deriva primariamente del metabolismo hidrolítico de 1,2-diacilglicerol (DAG) por medio de la DAGL α y DAGL β . Una vez liberados al espacio sináptico la anandamida y el 2-AG ejercen sus efectos de señalización por medio del receptor CB1, el cual se encuentra expresado en las terminales presinápticas. La anandamida también funciona como un potente agonista al receptor vaniloide de potencial transitorio (TRPV1). La finalización de la señalización extracelular endocanabinoide es iniciada por la recaptura celular, y una vez adentro de la célula los endocannabinoides son transportados por medio de mecanismos acompañantes (incluyendo proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs)) a enzimas específicas para la escisión hidrolítica. La degradación del 2-AG es atribuido principalmente a la MAGL presináptica que escinde al 2-AG en ácido araquidónico (AA) y glicerol. La degradación de anandamida ocurre en las terminales postsinápticas por medio de la FAAH que escinde a la anandamida en AA y etanolamina. (Figura modificada de Serrano y Pearsons, 2012).

Además sujetos que fumaban cigarrillos de marihuana con 1.26 o 2.53% de delta-9-THC reportaron episodios múltiples de euforia durante los primeros 15 minutos. Estos episodios de euforia fueron acompañados por un rápido incremento de delta-9-THC en plasma (Ameri, 1999).

El consumo agudo de marihuana es asociado con problemas de funcionamiento en diversas tareas de ejecución y cognitivas, incluyendo deterioro en la memoria, un sentido alterado del tiempo, y deterioros en el tiempo de reacción, coordinación motora y atención. Los efectos subjetivos, fisiológicos y en la ejecución provocados por la marihuana pueden persistir hasta 2 días. De la misma manera, el *cannabis* es una de las drogas más involucradas en accidentes automovilísticos por problemas motores. A dosis equivalente a uno o dos cigarrillos de marihuana, la coordinación motora involucrada en el manejo de un automóvil se encuentra alterada durante 24 horas, esto significa que el usuario experimenta durante mucho tiempo los efectos de la droga. Las áreas alteradas incluyen la coordinación, el rastreo, percepción, vigilancia y la ejecución, ya sea en un simulador de manejo o realmente manejando en la calle. Otro de los efectos conductuales reportados por el uso de marihuana en humanos y animales es la alteración del recuerdo libre de elementos previamente aprendidos, además de otros procesos de memoria. Se sabe que en estas alteraciones se encuentran implicados los receptores cannabinoides localizados en el hipocampo, mediando los déficits en la memoria de corto plazo (Ameri, 1999).

En varios modelos animales se ha mostrado que los cannabinoides producen una tetrada de efectos conductuales, esto es; un decremento en la actividad locomotora espontánea (hipoactividad) así como hipotermia, analgesia y catalepsia (Pertwee y Rose, 1991). Se ha probado que estos efectos farmacológicos son excelentes predictores de actividad canabimética en roedores. Diversas regiones cerebrales se encuentran asociadas con la modulación de la actividad locomotora por los cannabinoides tales como los núcleos basales y el cerebelo. Los efectos conductuales de los cannabinoides dentro de los núcleos basales parecen ocurrir en conjunto con otros neuromoduladores como la dopamina, acetilcolina y ácido gamma aminobutírico (GABA). Se sabe que bajas concentraciones de Delta-9-THC inducen estimulación seguida de sedación y altas dosis inducen solamente sedación.

Se han observado también el incremento en la ingesta de alimento en ratas cuando se les administra anandamida, así como un inhibidor de la FAAH (hidrolasa de amidas de ácidos grasos) en el NAcc Shell (Soria-Gómez y col. 2007). Se ha mostrado también un efecto en el ciclo sueño-vigilia, ya que la administración aguda y subcrónica de anandamida u oleamida dio como resultado incremento del sueño MOR (movimientos oculares rápidos) (Herrera-Solís y col. 2010).

También se ha investigado si la facilitación del sistema endocanabinoide produce efectos reforzantes. Se ha visto por ejemplo, que el sistema endocanabinoide media la valencia positiva de la emoción asociada a la ingestión de comida. Esto fue probado usando el paradigma de condicionamiento de preferencia de lugar (CPP). El CPP es un paradigma conductual en el que en una caja con 3 compartimentos se condiciona al sujeto a recibir un estímulo (“a”) en uno de estos compartimentos y otro estímulo (“b”) en un segundo compartimento; después de la etapa de condicionamiento, en la etapa de evaluación, se coloca al sujeto en el compartimento que divide a los otros dos y se mide el tiempo que pasa en los compartimentos asociados al estímulo “a” y “b”. El compartimento en el que pasa más tiempo se considera como el preferido debido al estímulo asociado a este. Utilizando este paradigma se midió la valencia positiva de la emoción asociada a la ingestión de comida. Primero se indujo CPP con la comida regular (labchow) en ratas, el cual se vio fortalecido cuando se les administró a las ratas endocanabinoides como oleamida (OLE) y anandamida (AEA). Este efecto fue bloqueado cuando se bloqueó el receptor CB1 con AM251. Estos resultados sugieren que los endocanabinoides como OLE y AEA tienen un papel crucial en el sistema de la recompensa, por lo tanto son moduladores de la valencia en la emoción disparada por la comida. También se ha observado que la oleamida por sí misma induce CPP, sugiriendo que OLE tiene propiedades reforzantes justo como el THC (Méndez-Díaz, Rueda-Orozco, Ruiz-Contreras y Próspero-García, 2010). Por lo anterior, resulta de substancial interés el posible involucramiento del sistema endocanabinoide en la etiología de las drogas de abuso y la adicción, en gran parte debido a la densa expresión del receptor CB1 en las regiones cerebrales involucradas en las propiedades motivacionales y adictivas de las drogas de abuso, y la farmacología similar producida por los endocanabinoides y los cannabinoides exógenos.

Canabinoide sintético WIN-55,212-2

Cabe mencionar que compañías farmacéuticas y laboratorios de investigación han desarrollado cannabinoides análogos con una alta estabilidad metabólica y alta potencia como el CP 55,940, HU 210, WIN-55,212-2, entre otros. Este último pertenece a la familia de Aminoalquilindoles. Estos fueron las primeras moléculas no cannabinoides que mostraron actividad canabimética (Rodríguez de Fonseca y col., 2005). Se ha encontrado que los aminoalquilindoles (AAIs²) desplazan a ligandos cannabinoides potentes tal como el CP-55940 en el *binding* (pegado) hacia el

receptor CB1. La habilidad de los análogos AAI² para inhibir la actividad cerebelar del adenilatociclasa, la presión ocular entre otras, sugiere un mecanismo de acción mediado por receptor. Un prototipo de AAIs² ampliamente usado es el R(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl)meth- anone mesylate (WIN55212-2). Este aminoalquilindol, es un potente agonista de alta afinidad a receptores canabinoides. Así como los endocannabinoides y el THC, el WIN también tiene propiedades analgésicas (Herzberg, Eliav, Bennett, y Kopin, 1997), (incluso es 3 veces más potente que el THC en producir antinocicepción) decremента la actividad locomotora (11 veces más de lo que lo hace el THC), así como la temperatura rectal (sin embargo 3 veces menos potente que el THC), e induce un estado cataléptico en ratones (equipotente al THC) (Compton, Gold, Robert, Balster, y Martin, 1992). Este aminoalquilindol se comporta como un completo agonista de ambos receptores CB1 y CB2. El WIN55212-2 también provoca la liberación de dopamina en el NAcc (Tanda, 1997), lo que sugiere que igual que el THC, tiene propiedades reforzantes (ver figura 10).

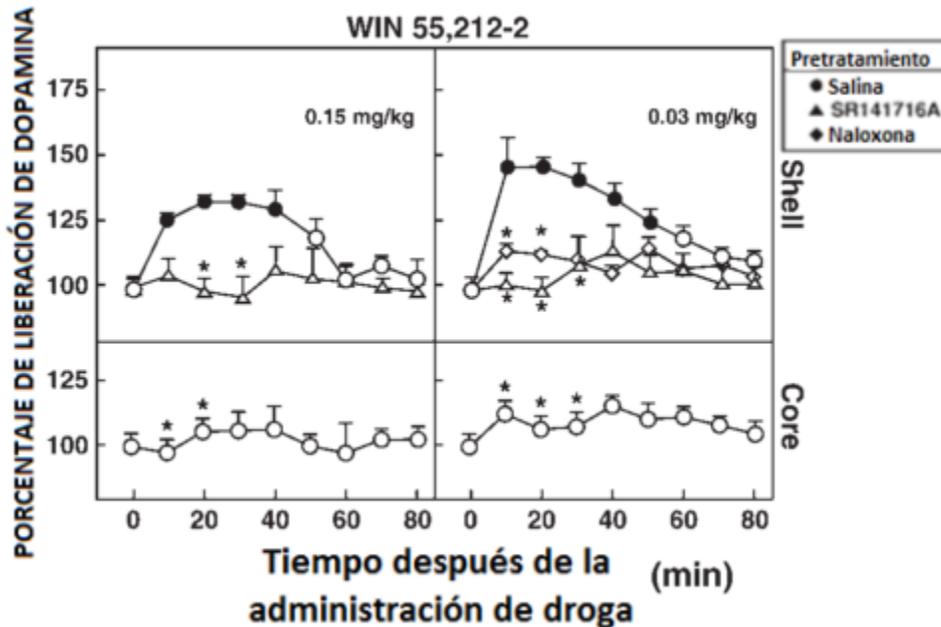


Figura 10. Efecto de la administración intravenosa de WIN 55,212-2 sobre la liberación de dopamina

Se muestra el efecto de la administración intravenosa de WIN 55,212-2 sobre la liberación de dopamina en el núcleo accumbens shell (panel superior) y core (panel inferior). Las dosis de WIN 55,212-2 fueron de 0.15 y 0.30 mg/kg iv. Las ratas pretratadas con salina (círculos), SR141716-A (triángulos) (0.1 mg/kg i.p.) o naloxona (diamantes) (0.1 mg/kg i.p.). Los resultados son las medias de la cantidad de dopamina en las muestras dializadas por 10 minutos, expresadas como porcentaje de los valores basales. Para los símbolos en negro, $P < 0.05$ comparados con los valores basales. Para los asteriscos, $P < 0.05$ comparados en el valor correspondiente obtenido el shell de los controles pretratados con salina (Figura modificada de Tanda, 1997).

Trastorno asociado al Cannabis

Para finalizar esta parte introductoria, y debido a que la marihuana es la principal droga ilícita consumida a nivel mundial y nacional, se mencionaran las características del trastorno asociado al cannabis según *DSM V* (American Psychiatric Association, 2013).

Un patrón problemático de uso de cannabis lleva a un sufrimiento y disfunción significativamente clínica, manifestado por al menos dos de las siguientes características ocurridas dentro de un periodo de 12 meses (American Psychiatric Association, 2013):

1. El cannabis es frecuentemente tomado en grandes cantidades en un periodo más prolongado que lo que fue planeado.

2. Existe un deseo persistente o esfuerzos fallidos por reducir o controlar el uso del cannabis.
3. Una gran cantidad de tiempo es gastada en actividades necesarias para obtener cannabis, usar cannabis o recuperarse de sus efectos.
4. *Craving*, o deseo intenso o urgencia por usar cannabis.
5. Uso recurrente de cannabis tiene como resultado una falla en cumplir las principales obligaciones o funciones en el trabajo, escuela o casa.
6. Uso continuo del cannabis a pesar de tener persistentemente problemas sociales o interpersonales causados o exacerbados por los efectos del cannabis.
7. Importantes actividades sociales, ocupacionales o recreacionales son abandonadas o reducidas debido al uso del cannabis.
8. Uso recurrente de cannabis en situaciones físicamente peligrosas.
9. Uso continuo de cannabis a pesar de saber que se tienen persistentemente problemas físicos y psicológicos que probablemente han sido causados o exacerbados por el cannabis.
10. Tolerancia definida por cualquiera de las siguientes características:
 - Necesidad por incrementar las cantidades de cannabis para lograr la intoxicación o el efecto deseado.
 - Marcada disminución del efecto con el uso continuo de la misma cantidad de cannabis.
11. Abstinencia manifestada por cualquiera de las siguientes características:
 - A. Cesación del uso de cannabis que ha sido intenso y prolongado (uso diario o casi diario sobre un periodo de al menos unos cuantos meses)
 - B. Tres (o más) de los siguientes signos y síntomas desarrollados aproximadamente en una semana después del criterio A.
 1. Irritabilidad, enojo o agresión
 2. Nerviosismo o ansiedad
 3. Dificultades para dormir (por ejemplo, insomnio, disturbios de los sueños)
 4. Decremento en el apetito o pérdida de peso
 5. Inquietud

6. Estado de ánimo deprimido
 7. Al menos uno de los siguientes síntomas físicos causando malestar significativo: dolor abdominal, sacudidas/temblores, sudoración, fiebre, escalofríos o dolor de cabeza
- C. Los signos o síntomas del criterio B causan angustia o deterioro clínicamente significativos en áreas de funcionamiento ocupacional, social u otras áreas importantes.
 - D. Los signos o síntomas no son atribuibles a otras condiciones médicas y no se explican mejor por otro trastorno mental, incluyendo intoxicación o abstinencia de otra sustancia.
 - E. El cannabis es consumido para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia

Síndrome de abstinencia a cannabinoides

Como ya se mencionó antes, la marihuana produce dependencia y por lo tanto, igual que las demás drogas que producen dependencia (actualmente llamado trastorno relacionado a cannabis, según el DSM-V), se puede decir que esta afecta al sistema de los procesos oponentes, haciendo que después de varias administraciones el reforzamiento positivo característico de las primeras etapas de la adicción se anule o prácticamente desaparezca dejando al descubierto el sistema oponente y manifestándose la etapa del síndrome de abstinencia. Diversos estudios han sugerido que tratando los síntomas del síndrome de abstinencia al cannabis, aumenta la probabilidad de que los individuos permanezcan en abstinencia. En humanos se ha reportado que síntomas asociados con el cese del uso de cannabis, más que del *craving*, contribuye fuertemente a la recaída (Clapper, Mangieri, y Piomelli, 2009). Sin embargo, a lo largo de los estudios sobre la adicción y en específico, sobre la adicción a la marihuana, no se tienen claro los mecanismos involucrados en la expresión del síndrome de abstinencia producido por esta droga. Además, como se mencionará más adelante, se han estudiado los cambios producidos en el cerebro, como la *down-regulation* de los receptores CB1 debido a tratamientos crónicos con cannabinoides, por ejemplo, el delta-9-THC o WIN55212,2 en diferentes estructuras cerebrales.

Uno de los primeros autores en mostrar la existencia de un síndrome de abstinencia al THC fue Hutchenson y col. (1998). Estos autores administraron a ratones THC (10 mg o 20 mg)

o vehículo dos veces al día (9:00 hr. y 19:00 hr.) intraperitonealmente (i.p.) durante 5 días y en el día 6 los ratones recibieron solo la inyección matutina. Cuatro horas después de la última administración de THC o vehículo, los ratones fueron puestos en una arena circular en la que fueron observados. Se consideró como periodo de habituación los primeros 15 minutos. Inmediatamente después del periodo de habituación los animales fueron observados por un periodo más de 15 minutos, considerado como el de línea base, y al término de este se les administró un antagonista del receptor CB1, el SR 141716A (10 mg/kg i.p.). Los ratones fueron observados durante un periodo de 45 minutos. Las conductas a observar fueron, dolores abdominales, sacudidas de perro mojado, temblor de las patas delanteras, ataxia, postura encorvada, temblor general, piloerección, masticación e incremento en la actividad locomotora, estas fueron evaluadas cada 5 minutos. Se encontraron diferencias significativas en los grupos administrados con THC comparados con sus respectivos controles. Con la dosis de 20 mg/kg de THC, todas las conductas mostraron un incremento significativo (ver figura 11).

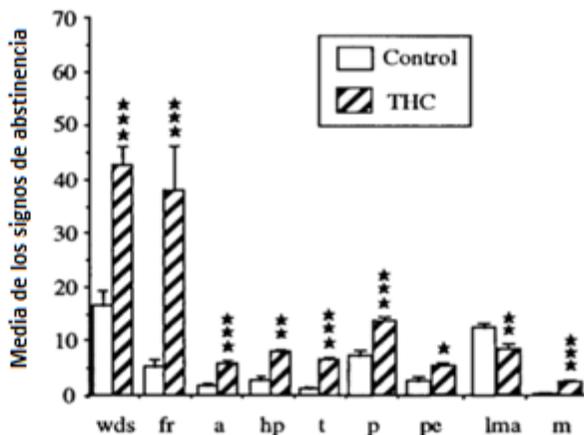


Figura 11. Conductas de síndrome de abstinencia en ratones tratados con THC

Conductas de síndrome de abstinencia presentadas en los ratones después de la administración de SR 141716A (10 mg/kg) tratados previamente con 11 administraciones de THC (20 mg/kg). Sacudidas de perro mojado (wds), frotamiento de cara (fr), ataxia (a), postura encorvada (hp), temblor (t), ptosis (p), piloerección (pe), actividad locomotora (lma) y masticación (m). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 comparado con el grupo control (Figura modificada de Hutchenson y col., 1998).

Como anteriormente ya se mencionó, agonistas naturales y ligandos endógenos de los receptores canabinoides han sido identificados; asimismo, se han sintetizado otros más. Estos compuestos exhiben diferencias en su afinidad y actividad intrínseca por los receptores CB1 y CB2. En este sentido el WIN 55,121-2, el más típico agonista canabinoide aminoalquilindol, ha

revelado tener una actividad intrínseca más alta por el receptor CB1 que el agonista natural THC y muestra selectividad moderada in favor del CB2. En preparaciones *in vivo*, este canabinoide sintético produce el espectro total de los efectos farmacológicos del THC. Respuestas conductuales relacionadas a las propiedades adictivas de los canabinoides incluyen efectos reforzantes y el desarrollo de dependencia física (Castañé, Maldonado, y Valverde, 2004).

Castañé y col. (2004) evaluaron las diversas respuestas que el agonista canabinoide WIN 55,212-2 precipitó en ratones, en relación a sus propiedades adictivas, incluyendo efectos reforzantes y desarrollo de dependencia física. También estudiaron la expresión de los receptores CB1 en estructuras como la amígdala, el hipocampo, el cerebelo y el estriado en relación con la expresión conductual de abstinencia de WIN 55,212-2 precipitado por el antagonista SR 141716A.

Para observar el síndrome de abstinencia el agonista WIN 55,212-2 (1 o 2 mg/kg) fue administrado intraperitonealmente, diariamente durante 5 días, 2 veces al día, con el fin de producir dependencia física en los ratones. En el sexto día los ratones solo recibieron la inyección matutina y dos horas después los ratones fueron colocados en una cámara circular transparente para su observación por un periodo de 15 minutos. Al final de este periodo el SR 141716A (10mg/kg) fue administrado para precipitar el síndrome de abstinencia. Los ratones fueron observados 15 minutos antes y 30 minutos después de la administración del antagonista. Los signos a evaluar fueron: sacudidas de perro mojado, temblor de las patas delanteras, olfateo, retortijones, ptosis palpebral, temblor corporal, ataxia, piloerección, postura encorvada, masticación y lamida de los genitales, estas conductas fueron evaluadas cada 5 minutos (Castañé y col., 2004).

En la figura 12 se puede observar que en comparación con los ratones que recibieron el vehículo, los que recibieron WIN 55,212-2, 1 o 2 mg/kg mostraron mayor cantidad de sacudidas de perro mojado, temblor de las patas, ataxia, masticación, postura encorvada, temblor general y piloerección (esta última solo con la dosis de 2 mg/kg).

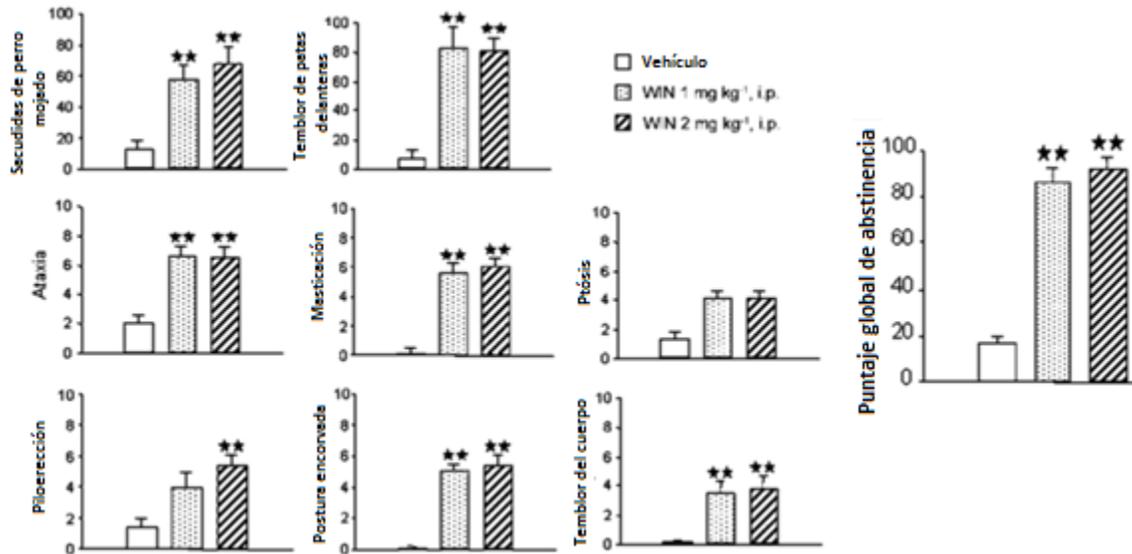


Figura 12. Conductas de síndrome de abstinencia en ratones tratados con WIN 55,212-2

Se muestran las diferentes conductas evaluadas después de la administración del antagonista (SR141716A, dosis de 10 mg/ kg) en ratones tratados con WIN 55,212-2. Se observan cambios significativos (** $P \leq 0.01$) en los ratones tratados con el agonista en comparación de los ratones a los que se les administró vehículo. (Figura modificada de Castañé y col., 2004).

Los autores mostraron que la administración del antagonista indujo síndrome de abstinencia después del tratamiento con WIN 55,212-2 y que la dosis de 2 mg/kg causa mayores efectos conductuales posterior a la administración del antagonista.

Para examinar la participación de estructuras cerebrales, como el cerebelo, hipocampo, amígdala y estriado, en la manifestación somática del síndrome de abstinencia por el WIN 55212-2, el antagonista del receptor CB1, SR 141716A (0.75, 1.5 y 3 microgramos por ratón) fue directamente administrado en el cerebro de ratones dependientes de WIN 55,212-2 (1 mg/kg i.p., dos veces al día durante 5 días). Los ratones fueron previamente implantados con cánulas dirigidas hacia las diferentes estructuras ya mencionadas. Una vez transcurrido el periodo de recuperación los ratones fueron inyectados 2 horas después de cada inyección matutina de WIN 55,212-2 con el SR 141716A, con el fin de precipitar el síndrome de abstinencia. Cada animal recibió las diferentes dosis del antagonista en días consecutivos. Los resultados de esto fueron que la microinyección del antagonista (1.5 y 3 microgramos) en el cerebelo indujo diversas manifestaciones de abstinencia en ratones dependientes de WIN 55,212-2, de los 10 signos

evaluados, 7 fueron estadísticamente significativos; sacudidas de perro mojado, temblor general, temblor de las patas, piloerección, masticación, lamida de los genitales, y olfateo. Cuando el antagonista canabinoide fue administrado en el hipocampo y en la amígdala, un moderado pero significativo síndrome de abstinencia fue observado. En cuanto al estriado, ningún signo de abstinencia fue observado cuando el antagonista fue administrado en esta estructura (Castañé y col., 2004).

Dichos resultados muestran un modelo conductual confiable que revela los efectos reforzantes y la dependencia física inducida por la administración crónica de WIN 55,212-2 en ratones. Se muestra también que el cerebelo, el hipocampo y la amígdala son estructuras importantes que participan en la expresión del síndrome de abstinencia canabinoide.

Cambios en la expresión del receptor CB1 provocados por la administración de canabinoides

Sim-selley y Martin (2002) administraron a ratones THC, WIN 55,212-2 (WIN) o vehículo, dos veces al día (7:00 am y 3:00 pm) vía subcutánea (s.c.) durante 15 días. Las dosis iniciales de las drogas fueron 10 mg/kg de THC y 3 mg/kg de WIN 55,212-2, las cuales se determinaron que eran igualmente activas en las pruebas conductuales (hipomotilidad, antinocicepción y temperatura) después de la administración aguda. Las dosis de las drogas fueron duplicadas cada 3 días, hasta llegar a dosis finales de 160 mg/kg de THC y 48 mg/kg de WIN55212,2. Transcurridas 24 horas después de la última inyección, los ratones fueron sacrificados para ensayos autoradiográficos por medio del pegado de [3H]SR141716A. Se encontraron cambios estadísticamente significativos para los dos grupos de tratamiento comparados con el grupo control (ver figura 13). Estos cambios hacia la baja del receptor CB1 fueron encontrados en los dos grupos de ratones, los tratados con THC y WIN en la corteza frontal, núcleo accumbens, corteza cingulada, caudado-putamen, globo pálido, hipocampo, amígdala, hipotálamo, tálamo, núcleo entopeduncular, corteza entorinal, sustancia negra (sólo para el grupo tratado con WIN55,212-2), sustancia gris periacueductal y cerebelo. No hubo diferencias significativas entre los grupos tratados con THC y WIN excepto en la sustancia negra donde, como ya se mencionó, solo hubo reducción en el *binding* en el grupo tratado con WIN.

Estos resultados muestran que la administración crónica de WIN55212,2 modifica la expresión del receptor CB1 hacia la baja, es decir, causa una *down regulation* en áreas cerebrales

que expresan al receptor CB1, específicamente en áreas implicadas con el sistema de motivación-recompensa como la corteza prefrontal, el núcleo accumbens, el hipotálamo y la amígdala.

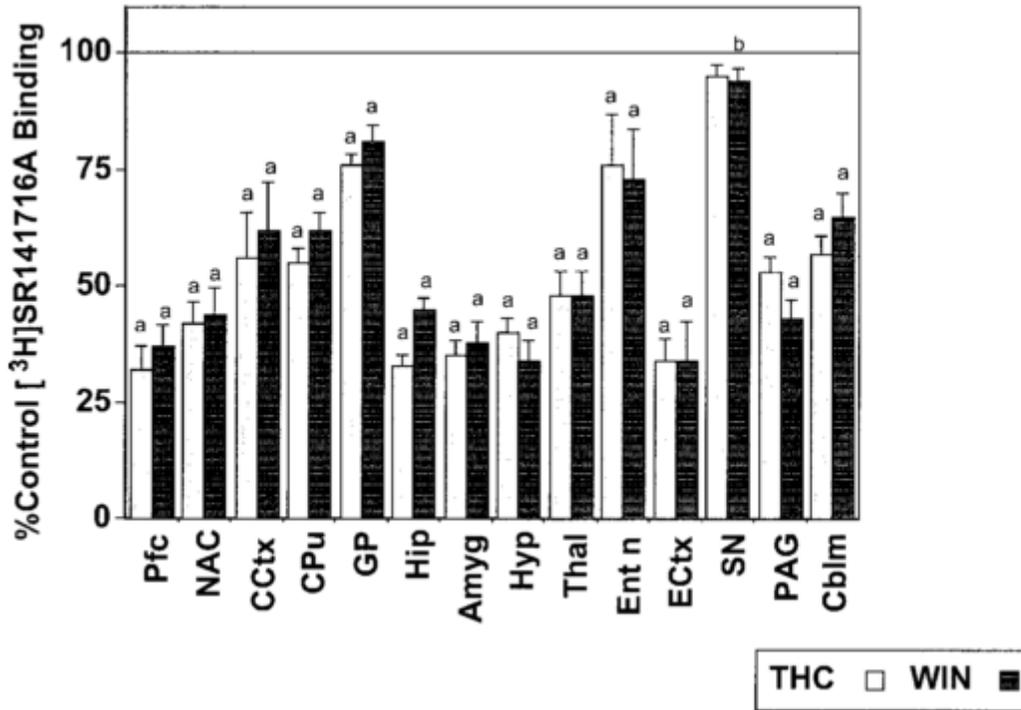


Figura 13. Pegado de [3 H]SR141716A en distintas áreas cerebrales en ratones tratados con THC y WIN 55,212-2

Pegado de [3 H]SR141716A en los ratones tratados con THC y WIN 55,212-2, expresado como porcentaje de cambio con respecto al pegado de [3 H]SR141716A del grupo control (tratado con vehículo). a, $p < 0.01$ diferente del vehículo; b, $p < 0.05$ diferente del vehículo; Pc, corteza prefrontal; NAC, núcleo accumbens; CCtx, corteza cingulada; Cpu, caudado-putamen; GP, globo pálido; Hip, hipocampo; Amyg, amígdala; Hyp, hipotálamo; Thal, tálamo; Ent n, núcleo entopeduncular; Ectx, corteza entorinal; SN, sustancia negra; PAG, sustancia gris periacueductal; y Cblm, cerebelo. (Figura tomada de Sim-selley y Martin, 2002).

Justificación

Sabemos que, cuando alguien fuma marihuana, el THC estimula los receptores CB1 artificialmente, perturbando la función de los cannabinoides endógenos. La sobreestimulación de estos receptores en áreas clave del cerebro produce el “*high*” (efecto máximo), así como otros efectos sobre los procesos mentales. Con el tiempo esta sobreestimulación puede alterar la función de los receptores cannabinoides, los cuales, junto con otros cambios en el cerebro pueden provocar tolerancia, llevando al sujeto a la adicción y al síndrome de abstinencia cuando el uso de la droga cesa (NIDA, 2011).

Tomando en cuenta que la marihuana es la droga ilícita más consumida y que existe un sistema canabinoide capaz de interactuar con el principal componente de la marihuana, THC, y con cualquier otro canabinoide natural o sintético, se vuelve importante y necesario saber que pasa en el cerebro cuando este canabinoide es consumido crónicamente, y de esta manera poder tener una mejor descripción de la forma en la que se modifica este sistema.

Ya que se sabe que en las estructuras cerebrales NAcc, amígdala, corteza prefrontal e hipocampo se expresa de manera importante el receptor CB1, estas estructuras resultan importantes para el análisis de lo que sucede con los niveles de expresión de este receptor y con los de las enzimas que participan con la síntesis y degradación de sus ligando endógenos.

Por otro lado, la etapa de síndrome de abstinencia asociada al consumo de marihuana [un factor muy importante de considerar cuando hay una recaída (Clapper y col., 2009)] esta está dada por el sistema oponente activado de sobremanera. Este sistema, como se mencionó arriba, tiene como sustrato la amígdala, además de la corteza frontal, por su función reguladora en la toma de decisiones. Por lo tanto, resulta importante estudiar en dichas estructuras, los cambios en el receptor CB1 y en las enzimas que sintetizan y degradan uno de los principales endocannabinoides.

Además, como ya se mencionó antes, si se activa el sistema oponente, el circuito de la recompensa también se activa a la par. Así que también es importante estudiar en las áreas que regulan la función recompensante, núcleo accumbens e hipocampo.

Objetivos

El primer objetivo de este estudio es observar el síndrome de abstinencia, inducido por un la administración aguda de un antagonista sintético de receptor CB1 después de la administración subcrónica de un agonista sintético canabinoide, como primer paso para apoyar la existencia de un proceso oponente.

El segundo objetivo es estudiar los cambios que siguen a la administración subcrónica de este agonista en las estructuras del Estriado Ventral (Núcleo Accumbens), Amígdala, Corteza Frontal e Hipocampo, en la expresión del receptor CB1 y de las enzimas que sintetizan y degradan a uno de sus principales ligandos, sugiriendo así que la previa administración subcrónica de WIN 55,212-2 (WIN) produce cambios que estarían activando al sistema de recompensa pero también al sistema oponente que son observados como un síndrome de abstinencia con la administración aguda de un antagonista del receptor CB1.

Preguntas de Investigación

1. ¿La estimulación subcrónica del receptor CB1 seguido de su bloqueo agudo provocará un síndrome de abstinencia en ratas Wistar?
2. ¿El potencial síndrome de abstinencia se acompaña de cambios en la expresión del receptor CB1 y las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de la anandamida en el estriado ventral, corteza frontal, amígdala e hipocampo?

Hipótesis

1. La administración del AM251 a las ratas con tratamiento subcrónico de WIN55212,2 exacerba las conductas relacionadas con el síndrome de abstinencia en comparación con las ratas que no recibieron dicho tratamiento.
2. La administración subcrónica de WIN 55,212-2 reduce la expresión del receptor CB1 en el estriado ventral, hipocampo, corteza frontal y amígdala.
3. La administración subcrónica de WIN 55,212-2 reduce la síntesis de NAPE PLD y aumenta la síntesis de la hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) en el estriado ventral, hipocampo, corteza frontal y amígdala.

Materiales y método

Animales

Se utilizaron Ratas Macho Wistar obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las cuales tuvieron un peso inicial de 250-a 270 gramos al inicio del estudio. Fueron colocadas en cajas individuales bajo un ciclo de luz-oscuridad controlado (12/12 horas, encendiéndose la luz a las 9 am), a una temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad (52%) constantes. La comida (Labchow, Purina) y el agua estuvieron disponibles *ad libitum*.

Fármacos

Todos los fármacos fueron administrados por medio de una inyección intraperitoneal (i.p.). El Agonista del receptor CB1, que se utilizó fue (R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-methyl-3[(4-morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl) methanonemesylatesalt (WIN55212,2) el cual fue comprado a Sigma-Aldrich® y el antagonista de este mismo receptor fue AM251 (adquirido con Cayman Chemycal Company®). Ambos fármacos fueron disueltos una concentración final de 30% de Dimetil Sulfóxido (DMSO), 69.8% de Buffer de Fosfatos con Solución Salina (PBS) y 0.2% de TWIN-80. La dosis administrada de WIN 55,212-2 fue de 2mg/kg y la de AM251 fue de 3mg/kg.

Evaluación del síndrome de Abstinencia

La evaluación del síndrome de abstinencia es una escala que incluye sacudidas de perro mojado, frotamiento de cara, ataxia, postura encorvada, temblor general, temblor de patas delanteras, ptosis palpebral, piloerección, masticación, y lamida de pene (Castañé y col., 2004; Hutcheson y col., 1998). Se contaron todas las veces que ocurrieron cada una de las conductas, durante los primeros 45 segundos de cada minuto durante 45 minutos.

Dos grupos de ratas (n=7), fueron inyectadas dos veces al día i.p. diariamente a las 9:00 hrs. y a las 19:00 hrs. durante 10 días, con vehículo (grupo control) o WIN 55,212-2 (grupo experimental). El día 11, las ratas recibieron solamente la inyección matutina. Dos horas después de la última administración de WIN 55212,2 o vehículo se colocaron a las ratas en un redondel de plástico transparente y permanecieron ahí 15 minutos, dicho periodo se contó como tiempo de habituación al redondel. Transcurrido ese periodo, se comenzó a registrar las conductas de la rata durante 15 minutos (este fue el periodo de línea base). Al término de dicho periodo se le administró a la rata el AM251 (3m/kg, i. p.) y se observaron por 45 minutos las conductas expresadas (ver figura 14).

Medición del receptor CB1, FAAH y NAPE-PLD

Inmediatamente después de haber transcurrido el periodo de evaluación de abstinencia precipitada, se sacrificaron a las ratas, por medio de dislocación del cuello, para tomar muestras de tejido cerebral para medir las enzimas NAPE-PLD, FAAH y el receptor CB1, por medio de Western Blot (n=10).

Describiendo brevemente, se tomaron las muestras de tejido (de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2004) de la Amígdala (núcleo central, basolateral y basomedial), Estriado Ventral (núcleo accumbens Shell y core), Hipocampo (estructura completa) y Corteza frontal (corteza prelámbica, medial, orbital, frontal de asociación y parte de la corteza motora secundaria). Se les agregó un buffer de extracción con inhibidores de proteasas y fosfatasas (1g de tejido/1ml), se homogenizaron por sonicación, después fueron centrifugadas y así se aislaron las proteínas. Se procedió a cuantificar las proteínas por medio del método de Lowry y se utilizó una electroforesis en gel para separar las proteínas atendiendo al criterio de peso molecular. Luego fueron transferidas a una membrana adsorbente de PVDF; con lo que se pudo buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Finalmente se detectó la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática. Se estimó su cantidad relativa por medio de fotodensitometría (Para más información sobre la técnica de Western Blot ver Anexo 1).



Figura 14. Procedimiento metodológico seguido después de las administraciones de WIN 55-212,2

Tipo de Diseño y Análisis Estadístico

Para analizar a nivel conductual la presencia del síndrome de abstinencia, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) mixto de 2 (tratamiento, WIN55212,2 o Vehículo) x 2 (antes y después de AM251). La prueba *post-hoc* utilizada fue *Tukey's HSD (honestly significant difference)*.

En cuanto al análisis de los cambios en la densidad óptica en el receptor CB1 y las enzimas de síntesis y degradación de endocannabinoides, se realizó una comparación entre grupos utilizando t de Student o U de Mann-Whitney. Para cada una de las gráficas, así como para los análisis estadísticos, solo se incluyeron los datos que se encontraban dentro de ± 2 desviaciones estándar.

Resultados

Síndrome de Abstinencia

En la evaluación del síndrome de abstinencia 10 conductas se evaluaron: sacudidas de perro mojado, frotamiento de cara, ataxia, postura encorvada, temblor general, temblor de patas delanteras, ptosis palpebral, piloerección, masticación, y lamida de pene. Las conductas de ataxia y postura encorvada no se presentaron en ninguna rata, por lo que se excluyeron de los análisis estadísticos. El promedio de frecuencia por minuto en la gráfica de síndrome de abstinencia global se calculó sumando todas las conductas que se presentaron en el periodo, ya sea de línea base (LB) o después de la administración del AM251 para cada rata, y dividido entre los minutos de observación; 15 y 45 min. respectivamente. Se obtuvo un promedio de todos los sujetos. El ANOVA Mixto reveló diferencias estadísticamente significativas entre la interacción tratamiento (vehículo o WIN 55,212-2) y tiempo (LB o después de la administración de AM251) ($P=0.009$). La prueba *posthoc* mostró que el promedio de frecuencia por minuto es significativamente más alto después de la administración de AM251 ($P<0.001$) comparado con el de la LB para el grupo de WIN55212,2. También se observó un promedio de frecuencia por minuto más alto después de la administración de AM251 en el grupo de WIN55212,2 comparado con el vehículo ($P= 0.030$) (ver figura 15). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el periodo LB contra el observado después de la administración de AM251 para el grupo vehículo ($P=0.627$). Tampoco se encontraron diferencias significativas cuando se comparó el grupo vehículo con el de WIN55212,2 en el periodo de LB ($P=0.613$) (ver figura 15).

Para el análisis de cada una de las conductas el promedio de frecuencia por minuto se calculó sumando el número de conductas en todo el periodo (LB o después de la administración de AM251) y dividido entre los minutos de observación (15 o 45). Finalmente, se obtuvo un promedio de todos los sujetos.

El ANOVA mixto mostró que solamente 2 conductas, frotamiento facial y ptosis palpebral, mostraron mayor frecuencia de aparición en las ratas tratadas con WIN55212,2. Para el frotamiento facial se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la interacción tratamiento (vehículo o WIN 55,212-2) y tiempo (LB o después de la administración de AM251) ($F_{1,12}= 8.087$, $P=0.015$). La prueba *posthoc* reveló que el promedio de frecuencia por minuto es significativamente más alto después de la administración de AM251 ($P<0.001$)

comparado con el periodo LB para las ratas tratadas con WIN55212,2 (ver figura 16). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el periodo LB contra el observado después de la administración de AM251 para el grupo vehículo ($P=0.695$). De la misma manera tampoco hubo diferencias significativas cuando se comparó el grupo de vehículo contra WIN55212,2 en el periodo de LB ($P=0.835$) o después de la administración de AM251 ($P=0.075$) (ver figura 16).

Para la conducta de ptósis palpebral el ANOVA mixto reveló que existe una interacción estadísticamente significativa entre el tratamiento y el tiempo (LB o después de la administración de AM251) ($F_{1,12}=76.004$, $P<0.001$). La prueba *posthoc* mostró que el promedio de la frecuencia por minuto es significativamente más elevado después de la administración de AM251 comparado con el de LB en el grupo administrado con WIN 55,212-2 ($P<0.001$). Así mismo, el promedio de frecuencias por minuto fue más elevado después de la administración de AM251 en el grupo de WIN55212,2 cuando se le compara con el grupo vehículo ($P<0.001$) (ver figura 17). No se observaron diferencias significativas entre el periodo de LB y después de la administración de AM251 en el grupo de vehículo ($P=0.125$). Para el periodo de LB tampoco se observan diferencias comparando el grupo vehículo contra el de WIN55212,2 ($P=0.798$) (ver figura 17). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las conductas de sacudidas de perro mojado, temblor de patas delanteras, temblor general, piloerección, masticación y lamida de pene (ver figuras 18 a 23).

Síndrome de Abstinencia Global

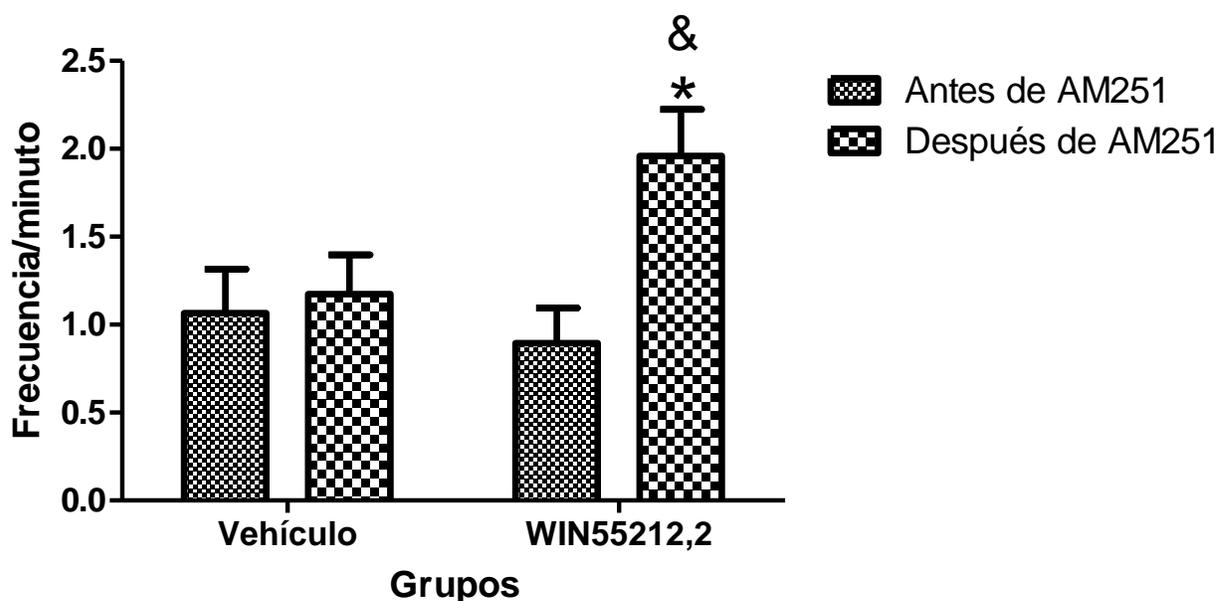


Figura 15. Promedio de frecuencia por minuto del total de 8 conductas del síndrome de abstinencia

Promedio de frecuencia por minuto del total de 8 conductas del síndrome de abstinencia evaluadas el día 11 después de 2 hrs. de la última administración (vehículo o WIN55212,2 (WIN)). De lado izquierdo se observa el grupo al que se le administró vía i.p. vehículo y de lado derecho las administradas con WIN. De acuerdo a un ANOVA mixto existe una interacción estadísticamente significativa entre el tiempo y el tratamiento ($P=0.009$). La prueba *posthoc* muestra diferencias intra-grupo para el WIN ($*P<0.001$) y entre-grupos después de la administración del AM251 ($\&P=0.030$). Las barras de error representan el error estándar de la media.

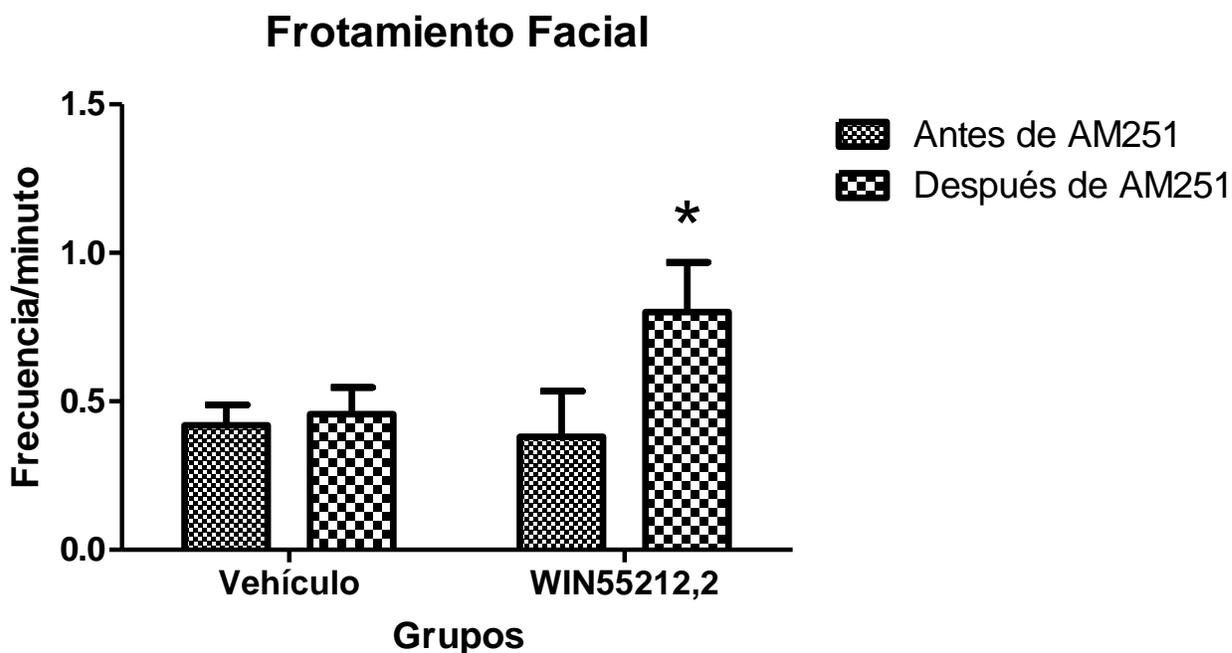


Figura 16. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta frotamiento facial

Promedio de frecuencia por minuto para la conducta frotamiento facial del síndrome de abstinencia evaluada el día 11 después de 2 hrs. de la última administración (vehículo o WIN55212,2 (WIN)). De lado izquierdo se observa el grupo al que se le administró vía i.p. vehículo y de lado derecho las administradas con WIN. Hubo una interacción estadísticamente significativa entre el tiempo y el tratamiento ($P=0.015$). La prueba *posthoc* mostró diferencias intra-grupo para el WIN ($*P<0.001$). Las barras de error representan el error estándar de la media.

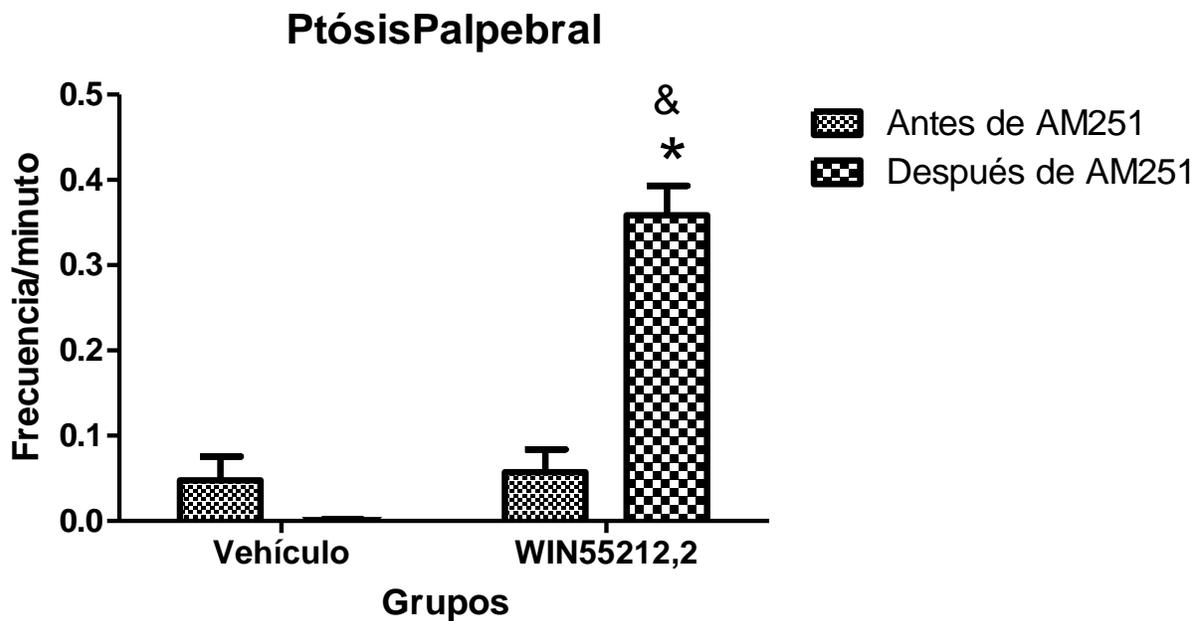


Figura 17. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta ptosis palpebral

Promedio de frecuencia por minuto para la conducta ptosis palpebral del síndrome de abstinencia evaluada el día 11 después de 2 hrs. de la última administración (vehículo o WIN55212,2 (WIN)). De lado izquierdo se observa el grupo al que se le administró vía i.p. vehículo y de lado derecho las administradas con WIN. De acuerdo a un ANOVA mixto existe una interacción estadísticamente significativa entre el tiempo y el tratamiento $P < 0.001$). La prueba *posthoc* muestra diferencias intra-grupo para el WIN ($*P < 0.001$) y entre-grupos después de la administración del AM251 ($\&P < 0.001$). Las barras de error representan el error estándar de la media.

Sacudidas de perro mojado

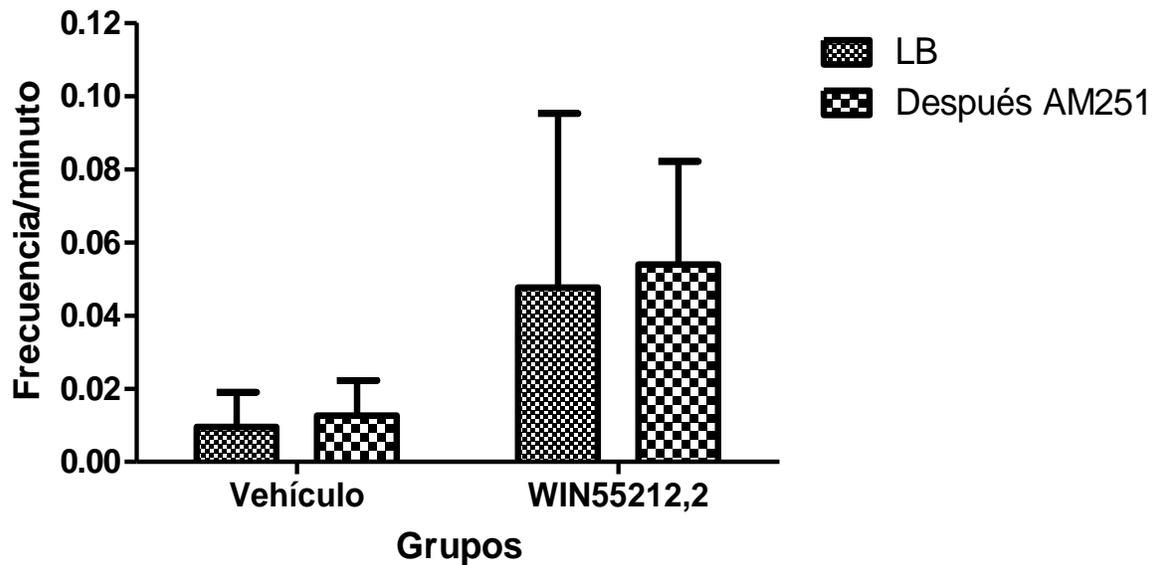


Figura 18. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta sacudidas de perro mojado

Promedio de frecuencia por minuto para la conducta sacudidas de perro mojado del síndrome de abstinencia evaluada el día 11 después de 2 hrs. de la última administración (vehículo o WIN55212,2 (WIN)). De lado izquierdo se observa el grupo al que se le administró vía i.p. vehículo y de lado derecho las administradas con WIN. De acuerdo a un ANOVA mixto existen diferencias significativas intra-grupos y/o entre-grupos. Las barras de error representan el error estándar de la media.

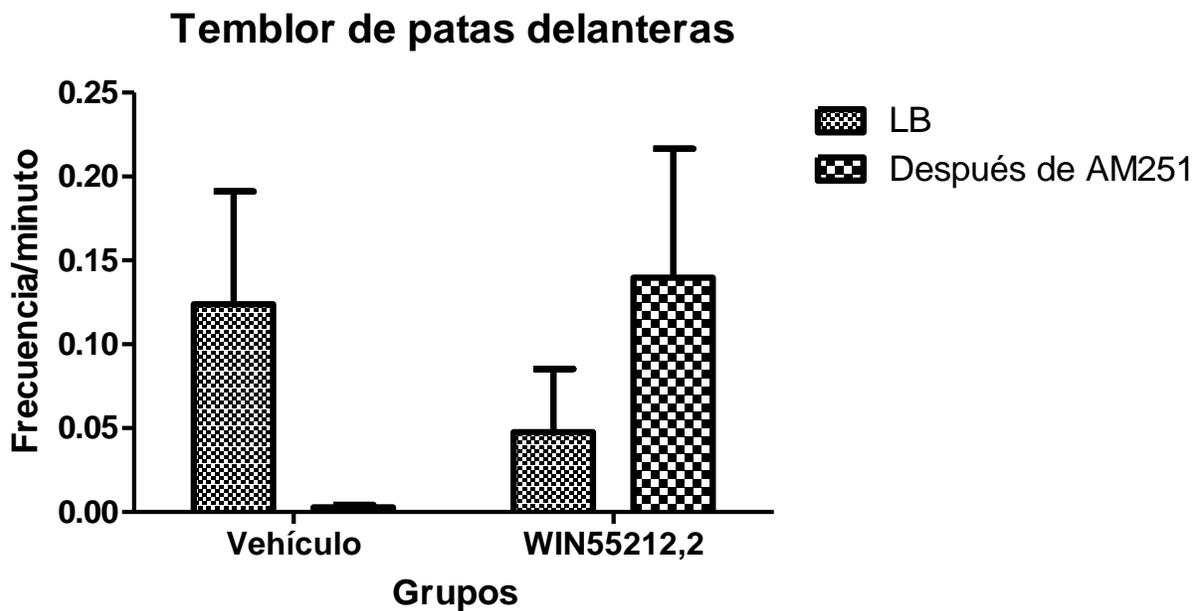


Figura 19. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta temblor de patas delanteras

Promedio de frecuencia por minuto para la conducta temblor de patas delanteras del síndrome de abstinencia evaluada el día 11 después de 2 hrs. de la última administración (vehículo o WIN55212,2 (WIN)). De lado izquierdo se observa el grupo al que se le administró vía i.p. vehículo y de lado derecho las administradas con WIN. De acuerdo a un ANOVA mixto existen diferencias significativas intra-grupos y/o entre-grupos. Las barras de error representan el error estándar de la media.

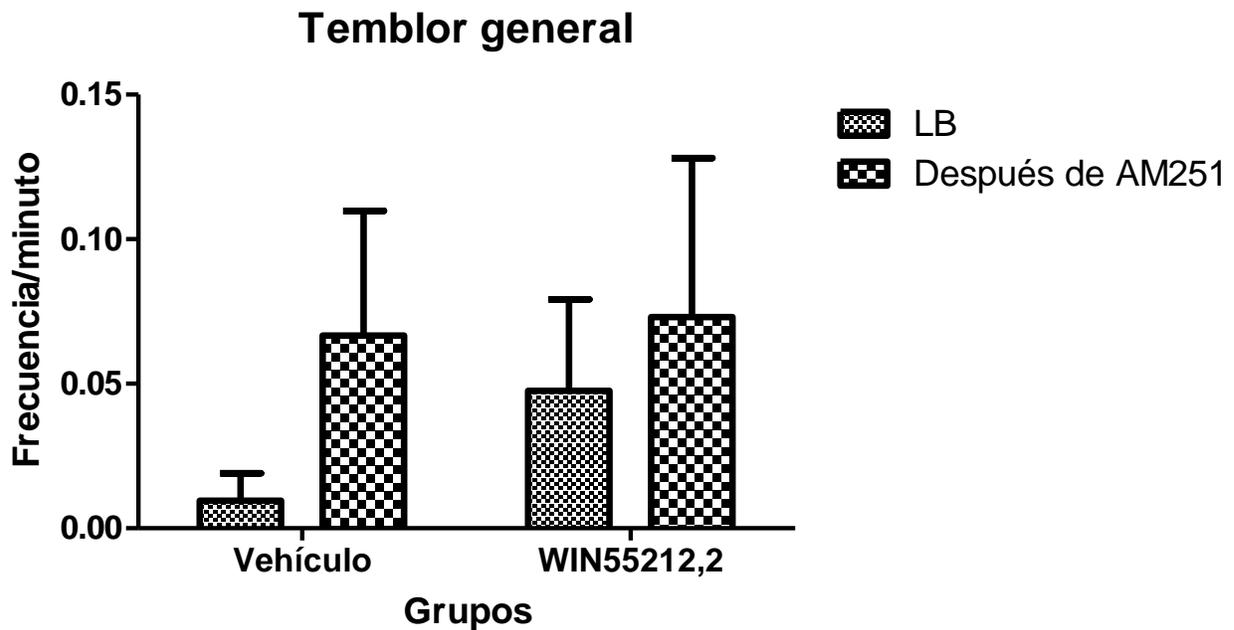


Figura 20. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta temblor general

Promedio de frecuencia por minuto para la conducta temblor general del síndrome de abstinencia evaluada el día 11 después de 2 hrs. de la última administración (vehículo o WIN55212,2 (WIN)). De lado izquierdo se observa el grupo al que se le administró vía i.p. vehículo y de lado derecho las administradas con WIN. De acuerdo a un ANOVA mixto existen diferencias significativas intra-grupos y/o entre-grupos. Las barras de error representan el error estándar de la media.

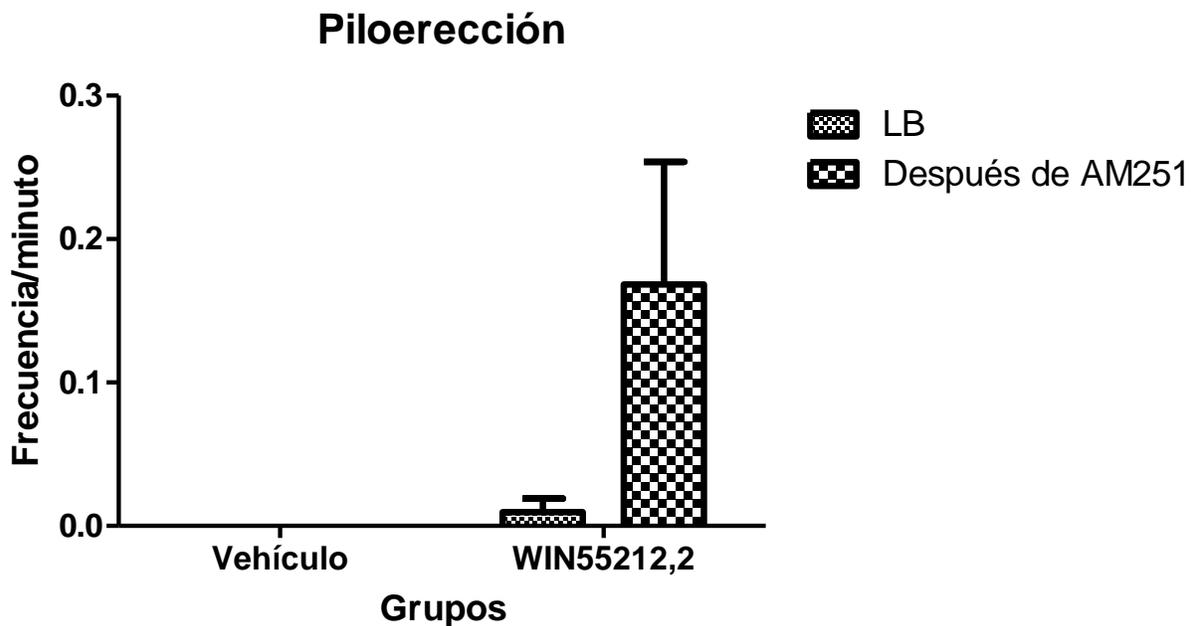


Figura 21. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta piloerección

Promedio de frecuencia por minuto para la conducta piloerección del síndrome de abstinencia evaluada el día 11 después de 2 hrs. de la última administración (vehículo o WIN55212,2 (WIN)). De lado izquierdo se observa el grupo al que se le administró vía i.p. vehículo y de lado derecho las administradas con WIN. De acuerdo a un ANOVA mixto existen diferencias significativas intra-grupos y/o entre-grupos. Las barras de error representan el error estándar de la media.

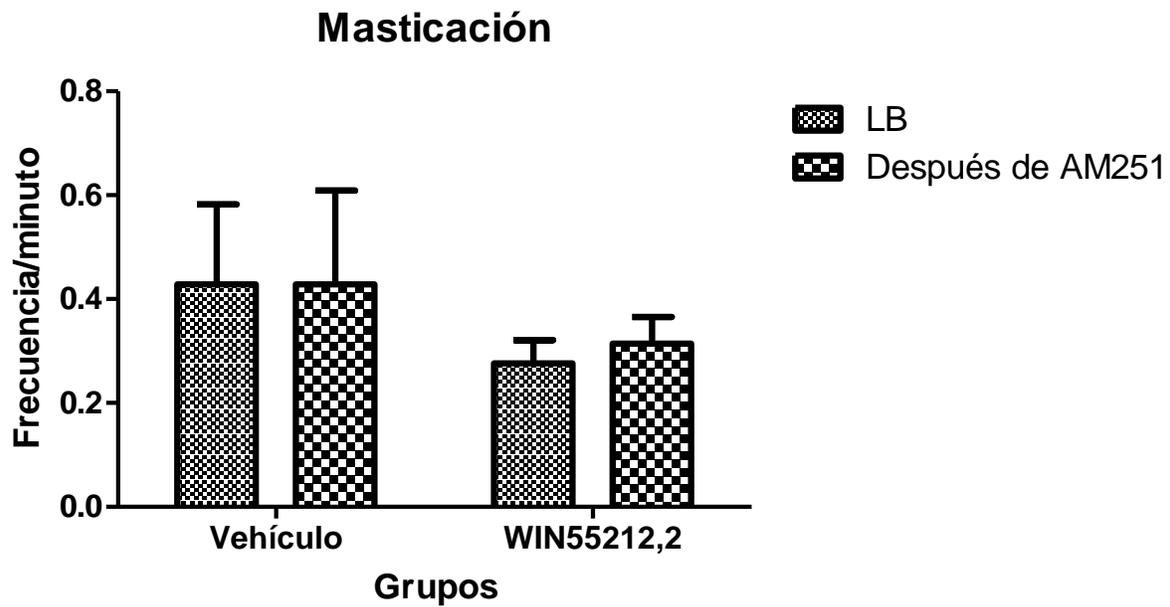


Figura 22. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta masticación

Promedio de frecuencia por minuto para la conducta masticación del síndrome de abstinencia evaluada el día 11 después de 2 hrs. de la última administración (vehículo o WIN55212,2 (WIN)). De lado izquierdo se observa el grupo al que se le administró vía i.p. vehículo y de lado derecho las administradas con WIN. De acuerdo a un ANOVA mixto existen diferencias significativas intra-grupos y/o entre-grupos. Las barras de error representan el error estándar de la media.

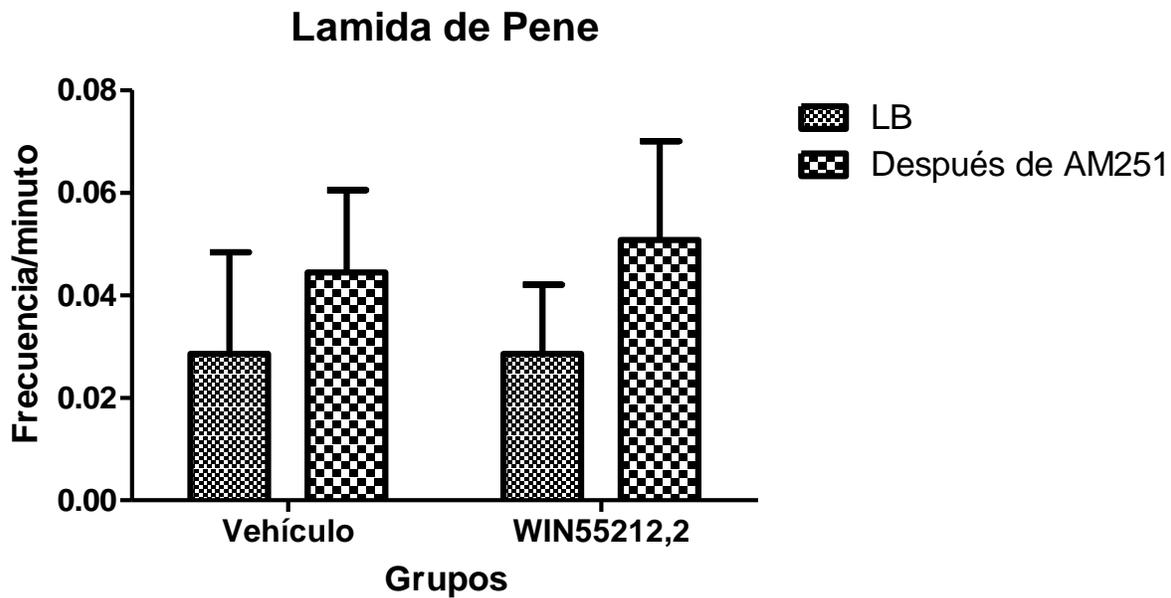


Figura 23. Promedio de frecuencia por minuto para la conducta lamida de pene

Promedio de frecuencia por minuto para la conducta lamida de pene del síndrome de abstinencia evaluada el día 11 después de 2 hrs. de la última administración (vehículo o WIN55212,2 (WIN)). De lado izquierdo se observa el grupo al que se le administró vía i.p. vehículo y de lado derecho las administradas con WIN. De acuerdo a un ANOVA mixto existen diferencias significativas intra-grupos y/o entre-grupos. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Expresión del receptor CB1 y enzimas FAAH y NAPE PLD

En los que respecta a la expresión del receptor CB1, la prueba t-Student reveló diferencias estadísticamente significativas en el estriado ventral donde se encontró una disminución ($t_{17}=2.158$, $P=0.046$) en la densidad óptica de este receptor para el grupo tratado con WIN ($n=9$) comparado con el grupo control ($n=10$) (ver figura 24). También se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el hipocampo ($t_{18}=2.290$, $P=0.034$) donde en el grupo tratado con WIN ($n=10$) mostró una disminución en la densidad óptica del CB1 en comparación con el grupo control ($n=10$) (ver figura 25). En la corteza frontal, no se encontraron cambios significativos ($P=0.212$) entre el grupo administrado con vehículo WIN ($n=10$) y el administrado con WIN ($n=10$) (ver figura 26). Tampoco se encontró algún cambio significativo en la amígdala ($P=0.791$) entre el grupo control ($n=10$) y el experimental ($n=10$) (ver figura 27).

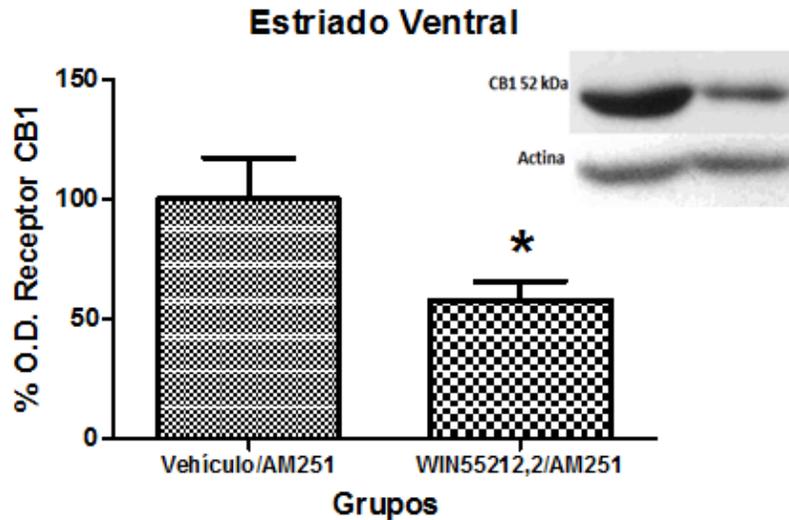


Figura 24. Densidad óptica del receptor CB1 en el estriado ventral

Densidad óptica del receptor CB1 medida por medio de Western Blot (datos expresados como porcentaje de CB1 en relación a la β -actina) en el estriado ventral. De lado izquierdo se observa el grupo administrado con vehículo y del lado derecho al administrado con WIN. Los datos están expresados como medias \pm error estándar. * P=0.046

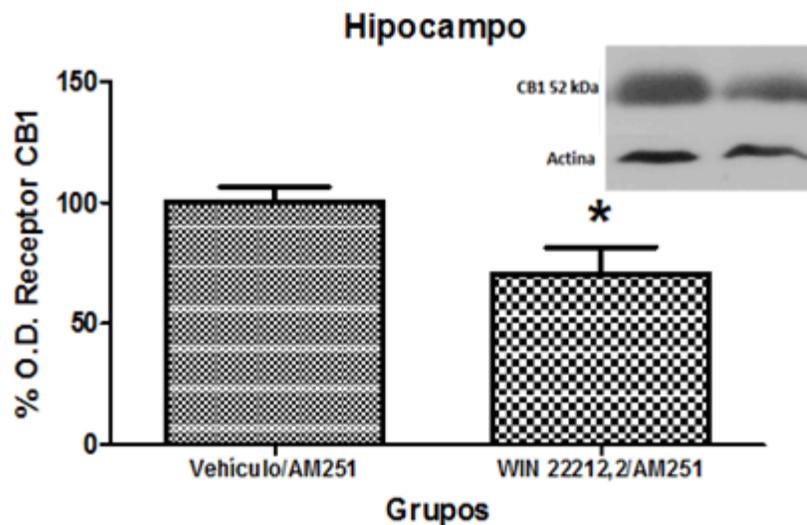


Figura 25. Densidad óptica del receptor CB1 en el hipocampo

Densidad óptica del receptor CB1 medida por medio de Western Blot (datos expresados como porcentaje de CB1 en relación a la β -actina) en el hipocampo. De lado izquierdo se observa el grupo administrado con vehículo y del lado derecho al administrado con WIN. Los datos están expresados como medias \pm error estándar. * P=0.034

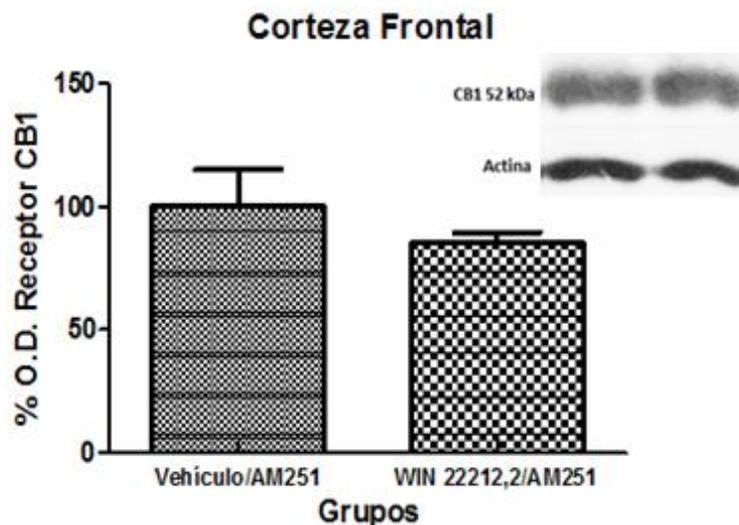


Figura 26. Densidad óptica del receptor CB1 en la corteza frontal

Densidad óptica del receptor CB1 medida por medio de Western Blot (datos expresados como porcentaje de CB1 en relación a la β -actina) en la corteza frontal. De lado izquierdo se observa el grupo administrado con vehículo y del lado derecho al administrado con WIN. Los datos están expresados como medias \pm error estándar. No se observan diferencias significativas.

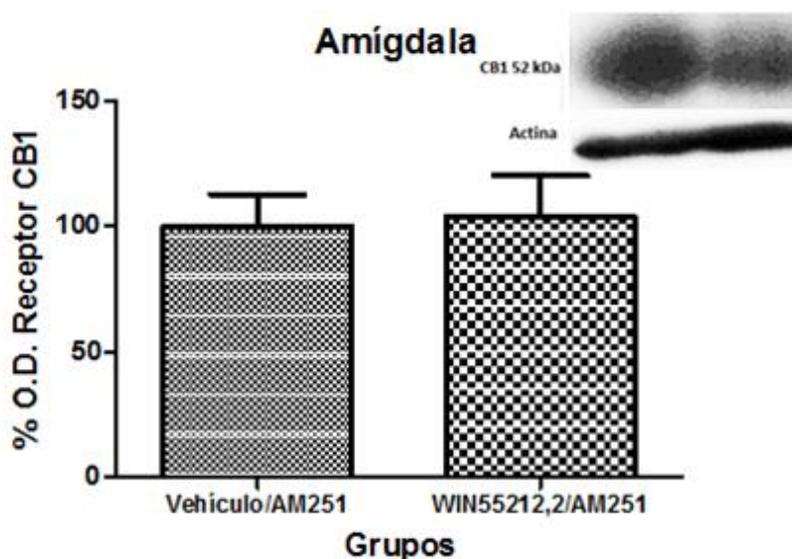


Figura 27. Densidad óptica del receptor CB1 en la amígdala

Densidad óptica del receptor CB1 medida por medio de Western Blot (datos expresados como porcentaje de CB1 en relación a la β -actina) en la amígdala. De lado izquierdo se observa el grupo administrado con vehículo y del lado derecho al administrado con WIN. Los datos están expresados como medias \pm error estándar. No se observan diferencias significativas.

En lo que respecta a la expresión de la enzima que sintetiza a la anandamida (NAPE-PLD) en el estriado no se observan diferencias significativas ($P=0.249$) entre el grupo que fue tratado con vehículo ($n=11$) comparado con el tratado con WIN ($n=10$). Tampoco se observaron diferencias significativas en el hipocampo ($P=0.621$) (vehículo $n=12$, WIN $n=9$), en la corteza frontal ($P=0.825$) (vehículo $n=9$, WIN $n=10$) y amígdala ($P=0.784$) (vehículo $n=10$, WIN $n=11$) entre el grupo tratado con vehículo y el tratado con WIN (ver figuras 28 a 31).

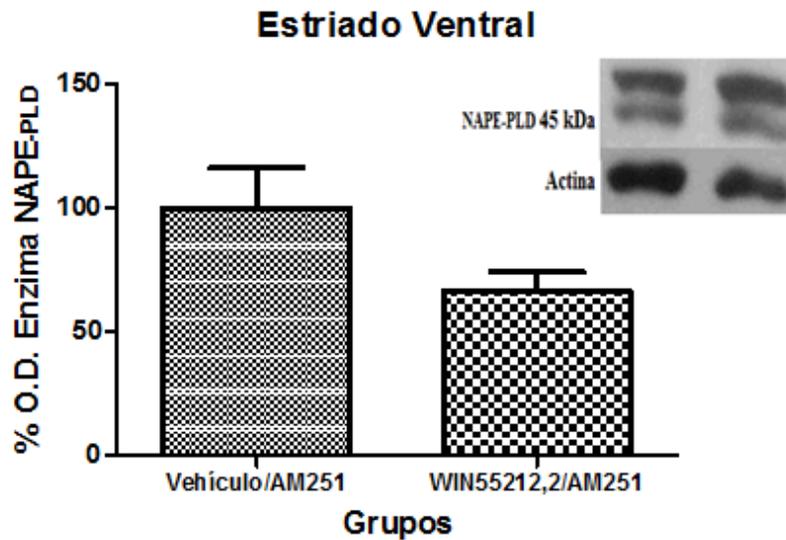


Figura 28. Densidad óptica de la NAPE-PLD en el estriado ventral

Densidad óptica de la enzima que sintetiza a la anandamida (NAPE-PLD) medida por medio de Western Blot (datos expresados como porcentaje de enzima NAPE-PLD) en relación a la β -actina) en el estriado ventral. De lado izquierdo se observa el grupo administrado con vehículo y del lado derecho al administrado con WIN. Los datos están expresados como medias \pm error estándar. No se observan diferencias significativas.

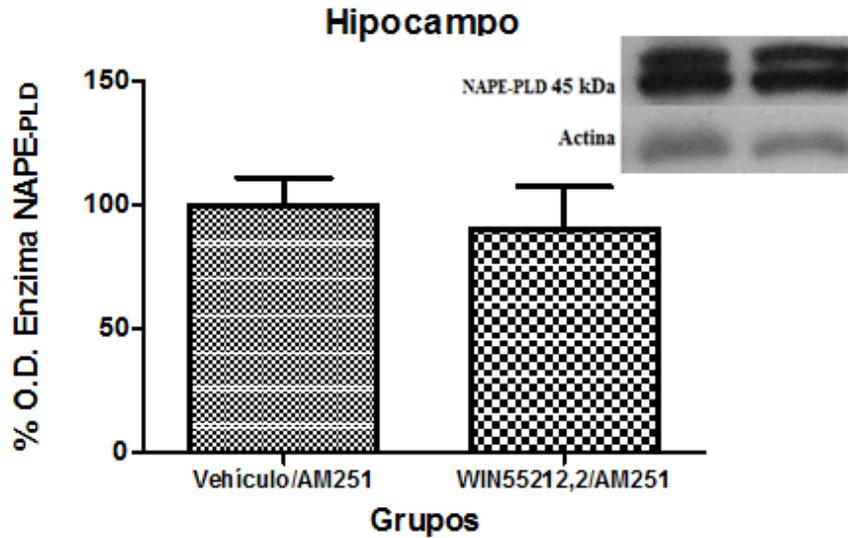


Figura 29. Densidad óptica de la NAPE-PLD en el hipocampo

Densidad óptica de la enzima que sintetiza a la anandamida (NAPE-PLD) medida por medio de Western Blot (datos expresados como porcentaje de enzima NAPE-PLD) en relación a la β -actina) en el hipocampo. De lado izquierdo se observa el grupo administrado con vehículo y del lado derecho al administrado con WIN. Los datos están expresados como medias \pm error estándar. No se observan diferencias significativas.

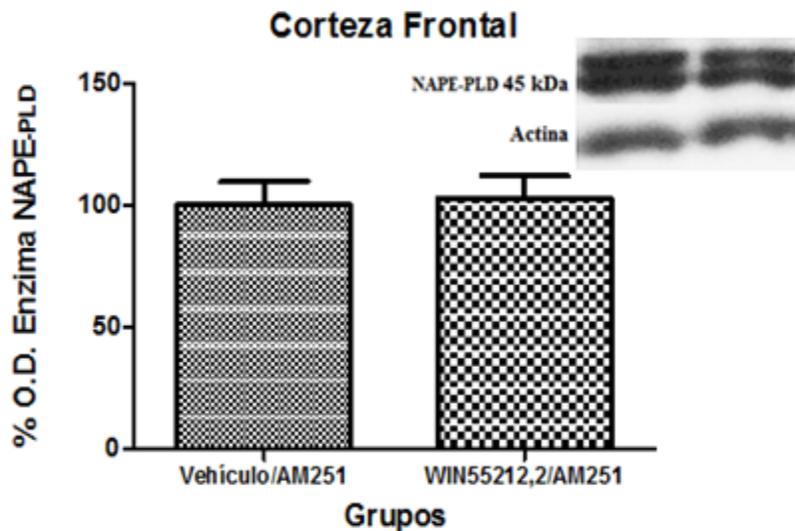


Figura 30. Densidad óptica de la NAPE-PLD en la corteza frontal

Densidad óptica de la enzima que sintetiza a la anandamida (NAPE-PLD) medida por medio de Western Blot (datos expresados como porcentaje de enzima NAPE-PLD) en relación a la β -actina) en la corteza frontal. De lado izquierdo se observa el grupo administrado con vehículo y del lado derecho al administrado con WIN. Los datos están expresados como medias \pm error estándar. No se observan diferencias significativas.

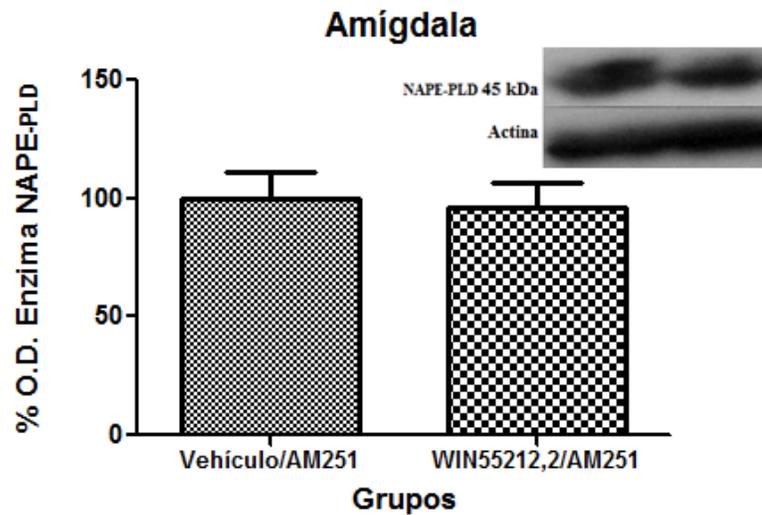


Figura 31. Densidad óptica de la NAPE-PLD en la amígdala

Densidad óptica de la enzima que sintetiza a la anandamida (NAPE-PLD) medida por medio de Western Blot (datos expresados como porcentaje de enzima NAPE-PLD) en relación a la β -actina) en la amígdala. De lado izquierdo se observa el grupo administrado con vehículo y del lado derecho al administrado con WIN. Los datos están expresados como medias \pm error estándar. No se observan diferencias significativas.

Finalmente, en cuanto a la expresión de la enzima que degrada a la anandamida (FAAH) no se observaron diferencias significativas para ninguna de las estructuras. Estriado ventral $P=0.640$ (vehículo $n=11$, WIN $n=10$). Hipocampo $P=0.288$ (vehículo $n=10$, WIN $n=10$). Corteza frontal $P=0.734$ (vehículo $n=10$, WIN $n=10$). Amígdala $P=0.195$ (vehículo $n=10$, WIN $n=10$).

No se observa diferencia en el estriado ventral ($P=0.640$) entre el grupo control ($n=11$) y el tratado con WIN 55,212-2 ($n=10$). Tampoco se observan diferencias en el hipocampo ($P=0.288$) entre el grupo control ($n=10$) y el experimental ($n=10$). Ninguna diferencia fue encontrada en la corteza frontal ($P=0.734$) entre el grupo control ($n=11$) y el experimental ($n=10$). Para la amígdala tampoco se observa ninguna diferencia ($P=0.195$) entre en grupo control ($n=10$) y el grupo experimental ($n=10$) (ver figuras 32 a 35).

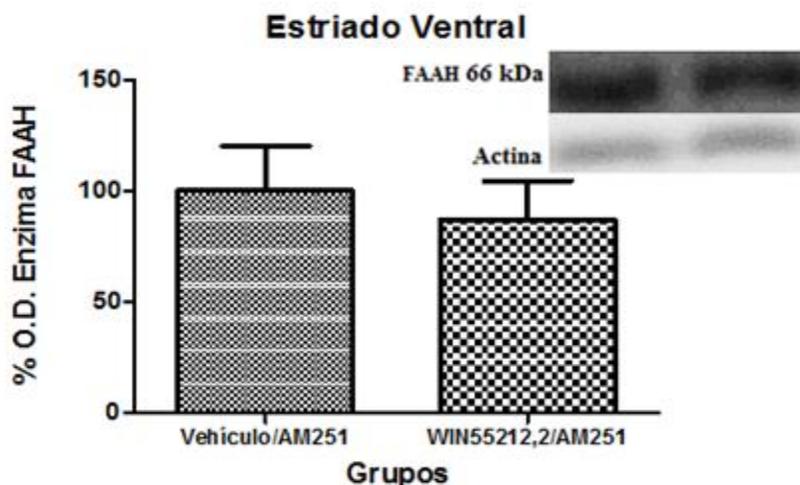


Figura 32. Densidad óptica de la FAAH en el estriado ventral

Densidad óptica de la enzima que degrada a la anandamida (FAAH) medida por medio de Western Blot (datos expresados como porcentaje de enzima FAAH) en relación a la β -actina) en el estriado ventral. De lado izquierdo se observa el grupo administrado con vehículo y del lado derecho al administrado con WIN. Los datos están expresados como medias \pm error estándar. No se observan diferencias significativas.

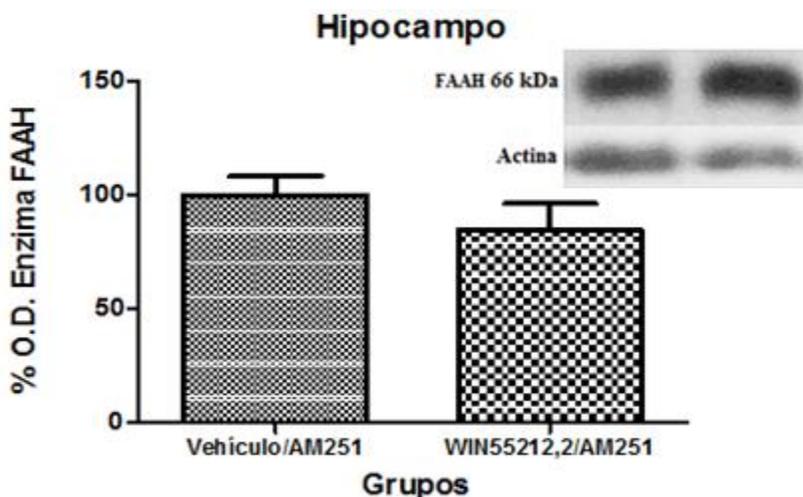


Figura 33. Densidad óptica de la FAAH en el hipocampo

Densidad óptica de la enzima que degrada a la anandamida (FAAH) medida por medio de Western Blot (datos expresados como porcentaje de enzima FAAH) en relación a la β -actina) en el hipocampo. De lado izquierdo se observa el grupo administrado con vehículo y del lado derecho al administrado con WIN. Los datos están expresados como medias \pm error estándar. No se observan diferencias significativas.

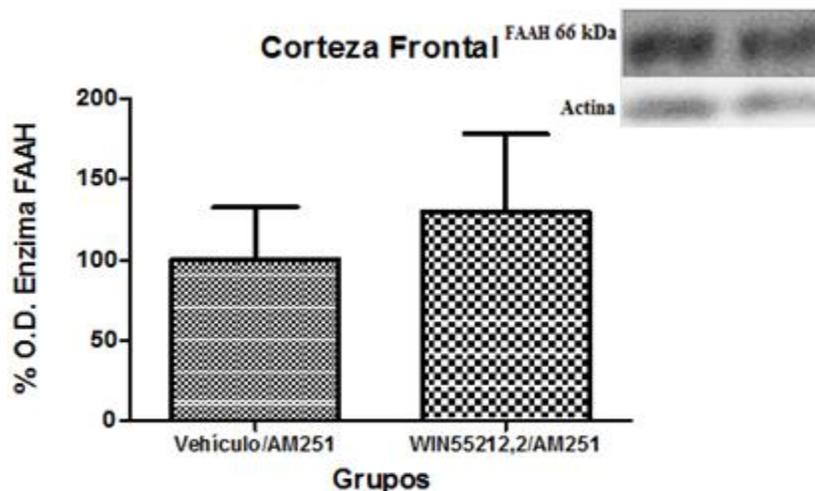


Figura 34. Densidad óptica de la FAAH en la corteza frontal

Densidad óptica de la enzima que degrada a la anandamida (FAAH) medida por medio de Western Blot (datos expresados como porcentaje de enzima FAAH) en relación a la β -actina) en la corteza frontal. De lado izquierdo se observa el grupo administrado con vehículo y del lado derecho al administrado con WIN. Los datos están expresados como medias \pm error estándar. No se observan diferencias significativas.

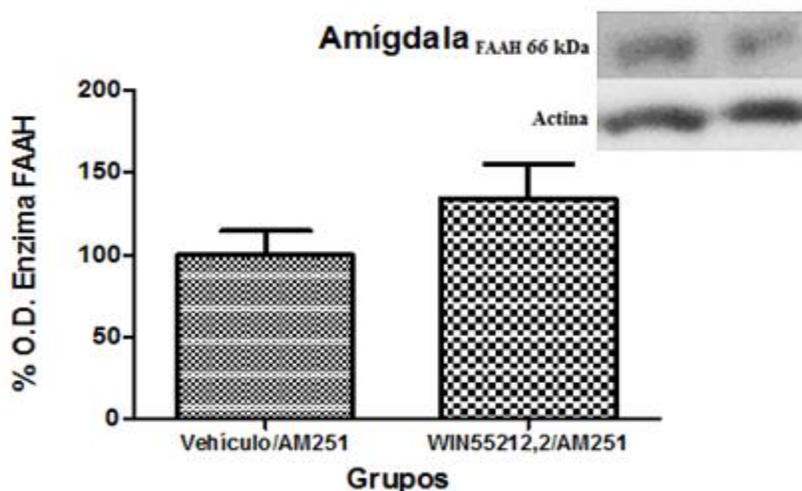


Figura 35. Densidad óptica de la FAAH en la amígdala

Densidad óptica de la enzima que degrada a la anandamida (FAAH) medida por medio de Western Blot (datos expresados como porcentaje de enzima FAAH) en relación a la β -actina) en la amígdala. De lado izquierdo se observa el grupo administrado con vehículo y del lado derecho al administrado con WIN. Los datos están expresados como medias \pm error estándar. No se observan diferencias significativas.

Discusión

En este trabajo se evaluó si la administración subcrónica de WIN55212,2 podía inducir el incremento en la frecuencia de conductas relacionadas al síndrome de abstinencia después de la administración aguda de AM251 (antagonista sintético del receptor CB1). Así como cambios en el sistema endocanabinoide después de esta administración subcrónica en ratas wistar.

En este estudio se mostró que la estimulación subcrónica del receptor CB1 con 21 administraciones de 2 mg/kg de WIN 55,212-2 seguido de su bloqueo agudo con 3 mg/kg de AM251 (dosis única) provocó un síndrome de abstinencia medido por la frecuencia de aparición de las conductas observadas.

Se observó un incremento en la frecuencia de aparición en el síndrome de abstinencia global (cuando se sumaron todas las conductas) comparado con el periodo de línea base, sugiriendo un efecto debido al antagonismo del receptor CB1 por el AM251. De la misma manera la frecuencia difirió del grupo vehículo después de la administración de AM251 sugiriendo un efecto de la administración subcrónica de WIN 55,212-2.

De manera particular se observó un incremento en la frecuencia de dos conductas, frotamiento facial y ptósis palpebral. Para la conducta de ptósis palpebral se observaron las mismas diferencias que en el síndrome de abstinencia global. Un incremento significativo en la frecuencia de la conducta en el grupo tratado con WIN 55,212-2 y AM251 comparado con su respectivo periodo de línea base, así como cuando se le compara con el grupo administrado con vehículo y después AM251, sugiriendo un efecto debido al tratamiento subcrónico de WIN 55,212-2 y al antagonismo del receptor CB1.

En lo que respecta a la conducta de frotamiento facial se observó solamente un efecto de aumento de la frecuencia de aparición de esta conducta en el grupo administrado con WIN 55,212-2 después de la administración de AM251 cuando se compara con su propio periodo de línea base; lo que estaría sugiriendo que este incremento es debido a la administración del antagonista, pero no debido al tratamiento, ya sea con vehículo o WIN55212,2. Sin embargo, tampoco se podría descartar por completo el efecto del tratamiento con WIN 55,212-2 ya que no se observó alguna diferencia entre la línea base y después del AM251 en el grupo tratado con vehículo. Esto podría indicar que para que se presente un incremento en la frecuencia de la

conducta incluso después de la administración del antagonista es necesario que el receptor CB1 haya sido activado previamente.

Estos resultados apoyan la existencia de un síndrome de abstinencia provocado por la administración subcrónica de un canabinoide seguido de su bloqueo agudo. Es decir que la activación del receptor CB1, y probablemente la alteración de los demás componentes del sistema canabinoide, por un periodo relativamente prolongado es necesaria para que posteriormente se exprese este síndrome de abstinencia. Cabe mencionar que en un estudio anterior Castañé y col. (2004) mostraron la existencia de un síndrome de abstinencia, en ratones tratados con 11 inyecciones de WIN 55,212-2 con dosis de 1 o 2 mg/kg y después una única administración de SR 141716A (10mg/kg), dando como resultado una mayor cantidad de sacudidas de perro mojado, temblor de las patas, ataxia, masticación, postura encorvada, temblor general y piloerección. No sucede lo mismo en el presente estudio, en el que solamente dos conductas mostraron un incremento. Esto probablemente pueda deberse a que en el presente estudio se utilizaron ratas y en el anterior ratones. Aunque en este estudio se administró prácticamente lo doble de la dosis que en el anterior, probablemente esta administración no causó una alteración drástica en los receptores ni en el sistema endocanabinoide como para observar un incremento en todas las conductas observadas. En un estudio no mencionado en los antecedentes, se evaluó el síndrome de abstinencia en ratas Sprague–Dawley después de un tratamiento de infusión continua de WIN 55,212-2 de incremento progresivo durante 4 días. Se administraron distintos tratamientos a grupos independientes de ratas; dosis alta (de 4 hasta 16 mg/kg), media (de 2 hasta 16 mg/kg) y baja (de 1 hasta 8 mg/kg) (para más detalles ver Aceto, Scates, y Martin, 2001) y posteriormente el antagonista SR 141716A (10mg/kg) provocó un incremento en las conductas de sacudidas de perro mojado y frotamiento facial. Sin embargo, para la conducta de sacudidas de perro mojado el incremento se observó solamente en las ratas tratadas con la dosis alta de WIN 55,212-2, 24 horas después de la administración del antagonista. Y para la conducta de frotamiento facial, se observó el incremento de esta en las ratas tratadas con cualquiera de las dosis (alta, media y baja) 1 hora después de la administración del antagonista y no así 24 horas después de la administración de este.

Los resultados de este estudio previo podrían apoyar la idea de que las ratas responden de manera diferente de los ratones a la administración del canabinoide WIN 55,212-2 y por lo tanto muestran diferente intensidad en la expresión del síndrome de abstinencia; en el estudio de

Castañé y col. (2004) en total 22 mg/kg de WIN 55,212-2, en una dosis constante, indujeron un síndrome de abstinencia en ratones después de la administración del antagonista y en el estudio de Aceto y col. (2001) mínimamente se requirieron 15 mg/kg de WIN 55,212-2 para que se incrementara significativamente el frotamiento facial y 44 mg/kg de este canabinoide para el incremento de sacudidas de perro mojado. Sin embargo, es importante mencionar que las dosis de WIN 55,212-2 en este último estudio fueron incrementando progresivamente.

Probablemente, si en el actual trabajo las ratas hubieran sido administradas con dosis de incremento progresivo, se hubiera observado un incremento significativo en las demás conductas estudiadas (sacudidas de perro mojado, temblor de patas delanteras, temblor general, piloerección, masticación y lamida de pene) y no sólo en el frotamiento facial y la ptosis palpebral.

Por otro lado, retomando la teoría de los procesos oponentes de la que su principal principio es que el ejercicio prolongado de un sistema que promueve una emoción de valencia positiva, promueve colateralmente la activación y fortalecimiento de un proceso oponente aversivo; la activación del sistema de recompensa dada por la administración subcrónica de WIN55212,2 , activa simultáneamente al sistema oponente, evidenciado por la expresión del síndrome de abstinencia cuando se bloquea el sistema de recompensa con la administración del antagonista AM251. Para comprobar esto, en el presente trabajo se investigó si la previa administración subcrónica de WIN 55,212-2 (WIN) produce cambios en estructuras relacionadas con el sistema de motivación-recompensa. Para este fin se midió la expresión del receptor CB1, y enzimas NAPE-PLD y FAAH relacionadas con la síntesis y degradación de la anandamida respectivamente, por medio de Western Blot en el estriado ventral, hipocampo, corteza frontal y amígdala.

Se encontró que el tratamiento con 21 administraciones de 2mg/kg del canabinoide sintético WIN 55,212-2 durante 11 días modifica hacia la baja la densidad óptica del receptor CB1 en el estriado ventral y el hipocampo. No así en la corteza frontal ni en la amígdala. En cuanto a las enzimas NAPE-PLD y FAAH no mostraron algún cambio significativo debido al tratamiento con WIN 55,212-2 en ninguna de las cuatro estructuras estudiadas.

La administración continua del WIN 55,212-2 pudo haber causado en el animal tolerancia farmacológica (disminución de los efectos de la sustancia a consecuencia de su uso continuo a las mismas dosis), la cual ya ha sido reportada para el THC anteriormente por

Hutcheson y col. (1998) en un estudio en el que se administró a ratones la misma dosis 11 veces de 10mg/kg i.p. de THC, observó tolerancia a los efectos de hipotermia y antinocicepción. También se ha mostrado tolerancia para estos mismos efectos después de la administración escalada subcutánea de WIN 55,212-2 (de 3mg/kg hasta 48mg/kg durante 15 días) (Sim-Selley Martin, 2002). Estos datos podrían sugerir que en el presente trabajo, la administración subcrónica de 2 mg/kg durante 11 días probablemente estén causando tolerancia y probablemente está relacionada con una disminución en la expresión del receptor CB1; lo que posiblemente nos habla de una *down regulation* (pérdida de sitios de unión) del receptor CB1 en el estriado ventral y en el hipocampo en las ratas sometidas a este tratamiento

Debido a la administración subcrónica de WIN 55,212-2 se esperaba un decremento en la expresión del receptor CB1 en las cuatro estructuras estudiadas. Sin embargo, estas diferencias en la expresión del receptor pueden deberse a las diferencias regionales en la adaptación del receptor CB1 (Sim-Selley, 2003). Por ejemplo, Di Marzo y col. (2000) realizaron un estudio en el que administraron a ratas macho wistar 10 mg/kg i.p. de THC durante 8 días y midieron, por medio de *binding* con [3H]CP-55,940, los cambios en receptor CB1 en diferentes estructuras como cerebelo, estriado, hipocampo, corteza cerebral, sistema límbico (conteniendo; tubérculos olfatorios, núcleo límbico rostral, núcleo accumbens, septum y partes del núcleo amigdaloido anterior) y tallo cerebral. Encontraron una reducción significativa en el *binding* del receptor CB1 en el cerebelo, estriado, hipocampo, corteza cerebral y tallo cerebral, mientras que para las estructuras límbicas no ocurrió así. También analizaron la actividad de la proteína G, por medio del *binding* con [35S]GTP γ S *binding* estimulado con WIN55212,2, en las mismas estructuras, en ratas con el tratamiento con THC ya mencionado y lo que encontraron fue una disminución en la actividad de la proteína G (*desensibilización*) solamente en el cerebelo y en el estriado. Esto nos habla de las diferencias regionales en la adaptación del receptor CB1. Finalmente, estos autores también analizaron los niveles de los dos principales endocannabinoides, anandamida y 2-AG, así como del precursor de la anandamida, NArPE (N-Araquidonilfosfatidietanolamina). Encontraron una reducción en los niveles de anandamida en el estriado y su aumento en las estructuras límbicas, para las demás estructuras no hubo ningún cambio. Los niveles de NArPE no mostraron cambios en ninguna de las estructuras. En lo que respecta al 2-AG, solo el estriado mostró una reducción significativa y las demás estructuras no mostraron algún cambio en los niveles de este endocanabinoide. Lo que estaría indicando que los cambios en los

endocannabinoides son también dependientes de región y no necesariamente reflejan el cambio correspondiente en el estado del receptor CB1. Esto concuerda con los resultados del presente estudio, en el que no se encontraron cambios en las enzimas NAPE-PLD y FAAH en las estructuras en las que sí se encontró una reducción en el receptor CB1.

Sin embargo, el supuesto de las diferencias regionales, específicamente en las 4 estructuras que respectan a este trabajo (núcleo accumbens, hipocampo, corteza frontal y amígdala), no se observa en el estudio de Sim-Selley y Martin (2002) citado en los antecedentes. El estudio de Sim-Selley y Martin (2002) es el que más se acerca al trabajo aquí realizado en cuanto al hecho de que usaron WIN55212,2. Sin embargo, otras variables como la especie, la dosis y la duración del tratamiento podrían estar afectando los resultados. Basta mencionar que en el estudio citado la administración del WIN 55,212-2 fue crónica, de incremento progresivo, durante 15 días iniciando con una dosis de 3mg/kg hasta llegar a una dosis final de 48mg/kg en ratones.

Cabe mencionar que hasta donde tenemos conocimiento, éste es el segundo estudio realizado donde se miden cambios en el receptor CB1 y el primero en medir las principales enzimas relacionadas con la síntesis y degradación de la anandamida (NAPE-PLD y FAAH respectivamente) seguidos de un tratamiento con el agonista sintético WIN55212,2. Anteriormente ya se han reportado diferencias en la disminución del receptor CB1 después de la administración de THC, donde se han encontrado diferencias en la disminución del receptor CB1 dependiendo del área cerebral donde se midió. Por ejemplo, Romero y col.(1998) analizaron la *down-regulation* del receptor CB1 en distintos puntos de tiempo por medio de *binding* usando autoradiografía, en distintas estructuras cerebrales de ratas macho wistar expuestas diariamente a THC por 1, 3, 7 o 14 días (5mg/kg i.p. diariamente). En los que respecta a las 4 estructuras de interés para este trabajo, Romero y col. (1998) encontraron una reducción significativa en el *binding* en el hipocampo desde el día 1 y esta reducción fue más marcada en el día 14. En el núcleo accumbens solamente se encontró una tendencia de disminución y en la amígdala (sólo se analizó la parte basolateral) no se encontró ninguna reducción. Finalmente, el *binding* se redujo en la corteza cerebral (se analizaron la capa I y VI). En otro estudio más reciente, Lazenka, Selley, y Sim-Selley (2014) encontraron una *down-regulation* medida por inmunohistoquímica del receptor CB1 a ratones administrados s.c. con 10 mg/kg de THC (esta dosis es equivalente a 3 mg/kg de WIN en cuanto a efectos conductuales (Sim-Selley y Martin, 2002) por 14 días dos

veces al día y el día 15 solamente 1 vez. Las áreas que mostraron reducción del receptor fueron la corteza prefrontal, la amígdala lateral y el hipocampo, mientras que no se encontró reducción del receptor en el núcleo accumbens y la amígdala basomedial. Con estos estudios y los citados anteriormente se puede notar que existen diferencias regionales en la expresión del receptor CB1 en sujetos expuestos a cannabinoides y muy probablemente estas diferencias estén dadas por el agonista usado, la dosis, la duración del tratamiento y la especie animal.

Este trabajo contribuye a ampliar el conocimiento científico sobre los procesos fisiológicos que subyacen a la administración subcrónica de un agonista canabinoide en ratas que posteriormente expresaron una mayor cantidad de conductas relacionadas con el síndrome de abstinencia después de que se les administró una dosis única de un antagonista del receptor CB1. Por lo que se podría decir que los cambios en el sistema endocanabinoide inducidos por la administración subcrónica de WIN55212, 2, son responsables de la expresión del síndrome de abstinencia.

Los resultados de este trabajo concuerdan con los reportados en la literatura, en los que se evalúa el síndrome de abstinencia de manera conductual y la *down-regulation* del receptor CB1. Tomando en cuenta que el uso de distinta metodología (i.e. especie, dosis, duración de tratamiento y agonista/y antagonista canabinoide) podría explicar las variaciones en los resultados.

Limitaciones y sugerencias

Una de las limitaciones en este estudio es la técnica de Western Blot para determinar la cantidad de proteína, ya que podría ser vista como poco sensible debido a que es semicuantitativa. Por lo que se sugiere que en futuras investigaciones se usen técnicas más sensibles para la medición de la cantidad de receptores como la técnica de Binding Radioactivo.

En cuanto a los resultados de síndrome de abstinencia se sugiere hacer un protocolo de administración con dosis escaladas para ver si produce un efecto mayor en la expresión del receptor CB1 y en las enzimas que se analizaron en este trabajo. Por supuesto también resultaría importante ver los cambios en las enzimas DAGL y MAGL que sintetizan y degradan al 2-AG.

Se sugiere que también que se hagan mediciones del receptor CB1 y de las enzimas ya mencionadas después de haber transcurrido por lo menos 24 horas después de la administración

del antagonista sintético AM251 y así ver si existen diferencias en la expresión de estos componentes del sistema endocanabinoide, comparándolos con los resultados encontrados en el presente estudio.

Finalmente, podría resultar conveniente para una mejor evaluación conductual del síndrome de abstinencia, hacer una curva dosis-respuesta para el agonista sintético WIN 55,212-2 y para el antagonista AM251.

Anexo 1

El western blot es una técnica que nos permite determinar cómo se encuentra la expresión de una proteína, en este caso, del CB1 en los tejidos analizados. El western blot utiliza un principio químico llamado electroferésis. La electroforesis es un método analítico-semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleada por primera vez por Tiselius en el año de 1937. En la electroforesis la migración hacia el cátodo o ánodo de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico depende de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

Extracción de tejido. Después de haber finalizado el periodo de observación de las conductas de síndrome de abstinencia inducido por la administración de AM251 (3 mg/kg), las ratas fueron sacrificadas por dislocación del cuello y el cerebro fue rápidamente extraído. Se homogenizó el tejido por cada sección cerebral (0.1 g tejido/1 ml) en un buffer con 250 mM de sucrosa, 1mM EDTA, buffer 10 mMTris•HCl, pH 7.6, 10mM PMSF y un cocktail inhibidor completo de proteasa mini 1 tableta/ 50 ml (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). Se eliminaron desechos de tejido grandes y fragmentos nucleares mediante dos ciclos de baja velocidad (1,000 g, 10 min, 4°C). El sobrenadante (las membranas totales) se colectó y se centrifugó (17,000 g, 20 min, 4°C). El pellet enriquecido en membrana plasmática se resuspendió en una solución buffer (85 µL). Se midió la concentración de proteína a través del ensayo a proteína Bio-Rad D C (Bio-Rad, Hercules, CA).

Western blot. Se separaron las muestras de membrana plasmática (20 µg) por electroforesis separada en 8% SDS-PAGE y electrotransferidas en una membrana PVDF (Millipore). Se usó Nonfat dry milk (5%, Bio-Rad) en TBS-T (20 mMTris•HCl, 136 mMNaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6) por 1 h. La membrana PVDF se incubó durante la noche con anticuerpos policlonales de conejo para anti CB1 (1:500, Cayman) diluidos en TBS-T a 4°C. Se enjuagó la membrana tres veces (10 min cada vez) con TBS-T y se incubó con un anticuerpo secundario de burro anticonejo IgG acoplado a peroxidasa de rábano (1:10,000; Cell Signaling) en TBS-T por 1 h a temperatura ambiente (TA). Se detectaron las bandas usando ECL y agentes de detección (Amersham Biosciences) y se expuso a películas autoradiográficas por 1 min (Kodak).

Referencias

- Aceto, M. D., Scates, S. M., & Martin, B. B. (2001). Spontaneous and precipitated withdrawal with a synthetic cannabinoid, WIN 55212-2. *European Journal of Pharmacology*, 416(1-2), 75–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282115>
- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*, 58(4), 315–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10368032>
- American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5th ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- Castañé, A., Maldonado, R., & Valverde, O. (2004). Role of different brain structures in the behavioural expression of WIN 55,212-2 withdrawal in mice. *British Journal of Pharmacology*, 142(8), 1309–17. doi:10.1038/sj.bjp.0705882
- Chen, J. (1993). Dopaminergic mechanisms and brain reward. *Seminars in The Neurosciences*, 5, 315-320.
- Clapper, J. R., Mangieri, R. a, & Piomelli, D. (2009). The endocannabinoid system as a target for the treatment of cannabis dependence. *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1, 235–43. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.018
- Compton, A., Gold, H., RobertJ., Balster, L., & Martin, A. (1992). Aminoalkylindole Analogs: Cannabimimetic Activity of a Class of Compounds Structurally Distinct from Delta 9-Tetrahydrocannabinol. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 263(3), 1118–1126.
- CONADIC. (2011). *Encuesta Nacional de Adicciones 2011. Adicciones*. Retrieved from www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/ena08/ENA08_NACIONAL.pdf
- Cooper, D. C. (2002). The significance of action potential bursting in the brain reward circuit. *Neurochemistry International*, 41(5), 333–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176075>
- Cravatt, B. F., Prospéro-García, O., Siuzdak, G., Gilula, N. B., Henriksen, S. J., Boger, D. L. & Lerner, R. A. (1995). Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science*, 9(286), 1506-1509.
- 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*, 18(258), 1946-1949.
- Di Marzo, V., Berrendero, F., Bisogno, T., González, S., Cavaliere, P., Romero, J., Cebeira, M., Ramos, J & Fernández-Ruiz, J. (2000). Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of delta9-

- tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *Journal of Neurochemistry*, 74(4), 1627–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737621>
- Dumont, E. C. & Williams, J. T. (2004). Noradrenaline triggers GABA_A inhibition of bed nucleus of stria terminalis neurons projecting to the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, 24, 8198-8204.
- Edwards, Scott. and Koob, G. F. (2010). Neurobiology of dysregulated motivational systems in drug addiction. *Neurobiology* 5(3), 393–401. doi:10.2217/fnl.10.14.
- Feltenstein, M. W., & See, R. E. (2008). The neurocircuitry of addiction: an overview. *British Journal of Pharmacology*, 154(2), 261–74. doi:10.1038/bjp.2008.51
- Goeders, N. E. (2007). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Addiction. In *Stress and Addiction Biological and Psychological Mechanisms*.(pp. 3-9). Academic Press
- Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2002). Drug Addiction and Its Underlying Neurobiological Basis : Neuroimaging Evidence for the Involvement of the Frontal Cortex. *The American Journal of Psychiatry*, 159(10) 1642–1652.
- Grinspoon, L., & Bakalar, J. B. (1997). *Marihuana. La medicina prohibida* (1a ed., p. 205). Barcelona: Paidós.
- Herzberg, U., Eliav, E., Bennett, G. J., & Kopin, I. J. (1997). The analgesic effects of R(+)-WIN 55,212-2 mesylate, a high affinity cannabinoid agonist, in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience letters*, 221(2-3), 157–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9121688>
- Hernandez, G., Hamdani, S., Rajabi, H., Conover, K., Stewart, J., Arvanitogiannis, A. & Shizgal, P. (2006). Prolonged Rewarding Stimulation of the Rat Medial Forebrain Bundle: Neurochemical and Behavioral Consequences. *Behavioral Neuroscience*, 120(4), 888-904.
- Howlett, C. (2005). Cannabinoid receptor signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (168), 53–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16596771>
- Hutcheson, D. M., Tzavara, E. T., Smadja, C., Valjent, E., Roques, B. P., Hanoune, J. & Maldonado, R. (1998). Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *British Journal of Pharmacology*, 125(7), 1567–77. doi:10.1038/sj.bjp.0702228
- Iversen, L. L. (2000). *The Science of Marijuana* (p. 283). Oxford University Press.
- Kalivas, P. W., & Volkow, N. D. (2005). The Neural Basis of Addiction : A Pathology of Motivation and Choice. *The American Journal of Psychiatry*, 162(8), 1403–1413.

- Kandel, Eric, R., Schwartz, James, H., Jessell, T. M., Siegelbaum, Steven, A., & Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of Neural Science* (Fifth Edit., p. 1709). McGraw-Hill.
- Koob, G. F. (1997). Drug Abuse: Hedonic Homeostatic Dysregulation. *Science*, 278(5335), 52–58. doi:10.1126/science.278.5335.52
- Koob, G. F. (2003). Neuroadaptive mechanisms of addiction: studies on the extended amygdala. *European Neuropsychopharmacology*, 13(2003), 442–452.
- Koob, George F. (2009). Brain stress systems in the amygdala and addiction. *Brain Research*, 1293, 61–75. doi:10.1016/j.brainres.2009.03.038
- Koob, George F. (2013). Addiction is a Reward Deficit and Stress Surfeit Disorder. *Frontiers in Psychiatry*, 4(August), 72. doi:10.3389/fpsy.2013.00072
- Koob, George F, & Le Moal, M. (2001). Drug Addiction , Dysregulation of Reward , and Allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24(2), 97–129.
- Koob, George F, & Le Moal, M. (2008a). Addiction and the brain antireward system. *Annual Review of Psychology*, 59, 29–53. doi:10.1146/annurev.psych.59.103006.093548
- Koob, George F, & Le Moal, M. (2008b). Addiction and the brain antireward system. *Annual Review of Psychology*, 59, 29–53. doi:10.1146/annurev.psych.59.103006.093548
- Koob, George F, & Le Moal, M. (2008c). Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. Review. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363(1507), 3113–23. doi:10.1098/rstb.2008.0094
- Koob, George F, & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217–38. doi:10.1038/npp.2009.110
- Koob, George F. (2003). Neuroadaptive mechanisms of addiction: studies on the extended amygdala. *European Neuropsychopharmacology*, 13(6), 442–452. doi:10.1016/j.euroneuro.2003.08.005
- Koob, George F., & Le Moal, M. (2006). *Neurobiology of Addiction* (p. 490). Academic Press.
- Kudielka, B. M. y Kirschbaum, C. (2007). Biological Bases of the Stress Response. In *Stress and Addiction Biological and Psychological Mechanisms*.(pp. 3-9). Academic Press
- Lazenka, M. F., Selley, D. E., & Sim-Selley, L. J. (2014). Δ FosB induction correlates inversely with CB1 receptor desensitization in a brain region-dependent manner following repeated Δ (9)-THC administration. *Neuropharmacology*, 77, 224–233. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.09.019

- Luchicchi, A., & Pistis, M. (2012). Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: pharmacological properties, functional features, and emerging specificities of the two major endocannabinoids. *Molecular Neurobiology*, *46*(2), 374–92. doi:10.1007/s12035-012-8299-0
- Mackie, K. (2005). Distribution of Cannabinoid Receptors in the Central and Peripheral Nervous System, 299–325.
- Marinelli, M. (2007). Dopaminergic Reward Pathways and Effects of stress. In *Stress and Addiction Biological and Psychological Mechanisms*.(pp. 3-9). Academic Press
- Matsuda, L. a., Bonner, T. I., & Lolait, S. J. (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *327*(4), 535–550. doi:10.1002/cne.903270406
- Méndez-Díaz, M, Herrera-Solís, A., Soria-Gómez, E., Rueda-Orozco, P., & Prospéro-García, O. (2008). Mighty cannabinoids: A potential pharmacological tool in medicine. In *Neural Mechanisms of Action of Drugs of Abuse and Natural Reinforcers*.(pp. 137–157). Research Singpost.
- Méndez-Díaz, Mónica, Rueda-Orozco, P. E., Ruiz-Contreras, A. E., & Prospéro-García, O. (2010). The endocannabinoid system modulates the valence of the emotion associated to food ingestion. *Addiction Biology*, 1–11. doi:10.1111/j.1369-1600.2010.00271.x
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N., Schatz, A., Gopher, A., Almog, S., Martin, B., Compton, D., Pertwee, R., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J. & Vogel, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, *50*(1), 83-90.
- Menon, V. & Levitin, DJ. (2005). The rewards of music listening: Response and physiological connectivity of the mesolimbic system. *Neuroimage*. *28*(1), 175-184.
- Mobbs, D., Greicius, MD., Abdel-Azim, E., Menon, V., Reiss, AL. (2003). Humor modulates the mesolimbic reward centers. *Neuron*. *40*(5), 1041-1048.
- NIDA. (2010). Marijuana Abuse. *Research Report Series*, *10*, 1–10. Retrieved from <http://www.nida.nih.gov/PDF/RRMarijuana.pdf>
- Pertwee, R. & Ross, T. (1991) Drugs which stimulate or facilitate central cholinergic transmission interact synergistically with delta-9-tetrahydrocannabinol to produce motor catalepsy in mice. *Neuropharmacology*. *30*, 67-71.
- Pertwee, R. (2005). Pharmacological Actions of Cannabinoids. In R. Pertwee (Ed.), *Cannabinoids. Handbook of Experimental Pharmacology* (pp. 1–52). Berlin: Springer. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19301485>

- Pertwee, R. (2010). Cannabinoid Receptor Ligands. *Tocris Bioscience Scientific Review Series*, (7), 1553–71. doi:10.1517/13543784.9.7.1553
- Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Bermudez-Silva, F. J., Bilbao, A., Cippitelli, A., & Navarro, M. (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 40(1), 2–14. doi:10.1093/alcalc/agh110
- Romero, J., Berrendero, F., Manzanares, J., Pérez, a, Corchero, J., Fuentes, J. a,... Ramos, J. a. (1998). Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to delta9-tetrahydrocannabinol. *Synapse (New York, N.Y.)*, 30(3), 298–308. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(199811)30:3<298::AID-SYN7>3.0.CO;2-6
- Ruiz-Contreras. A., Méndez-Díaz. M., Romano-Lopez. A., Caynas, S., & Prospéro-García. O. (2012). El cerebro adicto. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana, Especial*(Enero-Junio), 43–50.
- Serrano, A., & Parsons, L. H. (2012). Endocannabinoid influence in drug reinforcement, dependence and addiction-related behaviors. *Pharmacology & Therapeutics*. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.06.005
- Sim-Selley, L. J. (2003). Regulation of Cannabinoid CB1 Receptors in the Central Nervous System by Chronic Cannabinoids. *Critical Reviews in Neurobiology*, 12(2), 91–119.
- Sim-Selley, L. J., & Martin, B. R. (2002). Effect of chronic administration of R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl)methanone mesylate (WIN55,212-2) or delta 9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor adaptation in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(1), 36–44. doi:10.1124/jpet.102.035618.in
- Solomon, R. L., & Corbit, J. D. (1974). An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of affect. *Psychological Review*, 81(2), 119–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4817611>
- Sterling P. (2012). Allostasis: A model of predictive regulation. *Physiology & Behavior*. 106(1), 5-15.
- Stinus, L., Cador, M., Zorrilla, E. P. & Koob, G. F. (2005). Beprenorphine and a CRF1 antagonist block the acquisition of opiate withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. *Neuropsychopharmacology*, 30, 90-98.
- Tanda, G. (1997). Cannabinoid and Heroin Activation of Mesolimbic Dopamine Transmission by a Common μ 1 Opioid Receptor Mechanism. *Science*, 276(5321), 2048–2050. doi:10.1126/science.276.5321.2048
- UNODC. (2013). *WORLD DRUG REPORT (United Nations publication, Sales No. E.13.XI.6)* (pp. 1–151). New York.

- Wang, J., & Ueda, N. (2009). Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 89(3-4), 112–9. doi:10.1016/j.prostaglandins.2008.12.002
- Waraczynski, M. A. (2006). The central extended amygdala network as a proposed circuit underlying reward valuation. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 30(2006), 472-496.
- Zorrilla, E. P., Logrip, M. L., & Koob, G. F. (2014). Corticotropin releasing factor: A key role in the neurobiology of addiction. *Frontiers in Neuroendocrinology*. Article in Press.