



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**“LA POTENCIAL CORRELACIÓN ENTRE LA ANSIEDAD,
EL DOLOR Y EL RECEPTOR CB1 EN LA CORTEZA
PREFRONTAL Y EL NÚCLEO ACCUMBENS FACILITA LA
INGESTIÓN DE ALCOHOL EN RATAS MACHO Y
HEMBRAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A:

Rodrigo Daniel Sepúlveda Cuéllar



DIRECTOR : Dr. Óscar Prospéro García

Revisora: Dra. Corinne J. Montes Rodríguez

Proyecto: DGAPA-PAPIIT número IN218316

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.,

Junio 2017



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 está 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.

Dedicatorias:

A mis padres, Juan e Irma quienes me han apoyado y acompañado en todas mis decisiones personales y académicas, y sin los cuales no hubiera logrado tanto en la vida.

A mis hermanos Juan Carlos e Irma Pamela, con quienes me tocó compartir la vida desde el inicio y de los cuales he aprendido que con esfuerzo, se pueden alcanzar las metas.

A mis abuelos, tíos, tías, primos y primas quienes me han apoyado a lo largo del tiempo y de quienes he aprendido, lo importante que es la unión familiar.

A Angélica Torres, quien estuvo acompañándome en toda mi etapa universitaria.

A mis amigos, que han estado conmigo y me han escuchado en distintas etapas de mi vida: Alberto, Alfonso, Arturo, Brandon, Brenda, Bruno, Byron, David, Emilio, Paco, Ricardo, Ricky, Roberto, Toño, Saúl, Salvador y Yang.

Al Dr. Óscar Próspero García y al Laboratorio de Endocannabinoides, quienes me abrieron las puertas a una serie de conocimientos invaluable.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me ha dado los conocimientos y herramientas para ser profesionista y una mejor persona.

Índice

Resumen	4
Introducción	5
1.Sistema endocannabinérgico	6
1.1Receptores endocannabinérgico	6
1.2 Endocannabinoides	7
2.Trastorno por consumo de alcohol	9
2.1 Neurobiología del consumo de alcohol	11
2.2Alcohol y sistema endocannabinérgico	14
3.Ansiedad	17
3.1 Neurobiología de la ansiedad	18
3.2 Ansiedad y sistema endocannabinérgico	20
4.Dolor	22
4.1 Neurobiología del dolor	22
4.2 Dolor y sistema endocannabinérgico	28
Planteamiento del problema	31
Justificación	31
Preguntas de investigación	31
Objetivos	32
Hipótesis	32
Variables	32
Material y Método	34
1.Sujetos experimentales	34
2.Aparatos y materiales	34
3.Procedimiento	36
3.1. Plancha caliente	37
3.2.Laberinto elevado	37
3.3Prevención pasiva	38
3.4. Ingesta de alcohol	39
3.5. Western Blot	39
3.6. Análisis de resultados	40
Resultados	42
Discusión	56
Conclusión	65
Bibliografía	66
Anexo	80

Resumen

El sistema endocannabinérgico está implicado en una gran cantidad de procesos fisiológicos y conductuales, regulando desde el sistema inmune hasta la adicción a sustancias. Para entender mejor su función moduladora, investigamos su participación en conductas como la ingesta de alcohol, la ansiedad y el dolor. El objetivo del proyecto, es evaluar la ingesta de alcohol, la ansiedad y el dolor en ratas machos y hembras y correlacionarlas con la expresión del receptor CB1 en la CPF y el Nacc. Para evaluar dichas variables, se usó la plancha caliente para evaluar dolor, el laberinto elevado y prevención pasiva para medir ansiedad, consumo de alcohol voluntario (experimento de lección de dos botellas) y Western Blot para evaluar la expresión del receptor CB1. Se encontró una correlación positiva entre la expresión del receptor CB1 en la CPF y el consumo de alcohol en ratas machos, una correlación negativa entre la ansiedad y la expresión del receptor CB1 en la CPF en hembras y como población, otra correlación negativa entre el dolor y la expresión del receptor CB1 en la CPF en hembras. No se encontraron diferencias significativas en el consumo de alcohol, ni en la latencia al dolor entre los machos y las hembras, no obstante, si se encontró una mayor ansiedad en los machos comparados con las hembras. Al ser agrupados por su nivel de ansiedad, se encontró una diferencia significativa en la latencia al dolor entre las ratas hembras ansiosas y no ansiosas. De igual forma, se encontró un mayor consumo de alcohol en las ratas machos no ansiosos en comparación con los no ansiosos. La expresión del receptor CB1 en la CPF mostró una media más alta en los sujetos no ansiosos en comparación con los ansiosos, sucediendo lo mismo entre las ansiosas y no ansiosas, sin embargo no hubo diferencias significativas. En conclusión, se encontró que una mayor expresión en el receptor CB1 en la CPF, correlaciona negativamente con la ansiedad y el dolor, pero de forma positiva con la ingesta de alcohol.

Palabras clave:

Ansiedad, dolor, consumo de alcohol, CB1, ratas machos, ratas hembras.

Introducción y antecedentes:

Datos de la Organización Mundial de la Salud (2010) afirma que el consumo excesivo del alcohol, es uno de los principales factores de morbilidad, discapacidad y mortalidad, causando más de 200 enfermedades y provocando a nivel mundial alrededor de 303 millones de muertes. La misma dependencia ubica a México en el décimo lugar de consumo de alcohol, de entre los países de la América Latina, con una ingesta per cápita de 7.2 litros; siendo la 4° causa de mortalidad (8.4%) a nivel nacional (Medina-Mora 2012).

El abuso o dependencia al alcohol en México, se incrementó de un 4.1 en el 2002 a 5.5% para el año 2008. Cabe mencionar que hubo un mayor incremento en la dependencia al alcohol en el sexo femenino, pasando de un 0.4% en el 2002 a 1.7% en el 2008. En el caso del sexo masculino el incremento fue del 8.3% al 9.7% (Secretaría de Salud, 2009). La principal droga por la cual motivaron a las personas a solicitar tratamiento en el año 2009 en los Centros de Integración Juvenil (CIJ) fue el alcohol (19.9%), seguido de la marihuana (15.6%), inhalables (14.1%) y cocaína (12.5%). De igual forma, en los Centros Nueva Vida el 44.8% de los casos atendidos se debieron a problemas con el alcohol seguida por la marihuana (24%) (Secretaría de Salud, 2011).

Como ya se mencionó, el consumo de alcohol trae serias consecuencias a la salud y economía pública mundial. No obstante, otro padecimiento como la ansiedad, también podría traer consecuencias en estos dos ámbitos, ya que la calidad de vida de las personas que la padecen disminuye, debido a los problemas en la vida diaria ocasionados por el trastorno como: problemas del sueño, dolor de cabeza, tensión muscular, náuseas, nervios, fatiga, dificultad para concentrarse e hiperalertamiento (Martin, 2003). En el caso de México, se estima que un 14.3% ha presentado un trastorno de la ansiedad en algún momento de su vida (Nenelares, citado en Sola, 2016).

Ante estos padecimientos y sus repercusiones en la salud pública, es necesario seguir haciendo investigación básica y seguir generando información para comprenderlas más. Un posible sistema endógeno candidato que podría subyacer a los padecimientos mencionados es: el sistema endocannabinérgico.

1.1. Sistema endocannabinérgico

El sistema endocannabinoide está compuesto por los receptores para cannabinoides tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2) (Matsuda, Lolait, Brownstein, Young & Bonner, 1990; Munro, Thomas, & Abu-Shaar, 1993) endocannabinoides endógenos sintetizados a partir de fosfolípidos de membrana celular y la maquinaria enzimática involucrada tanto en la síntesis como en la eliminación de los endocannabinoides (Hashimoto-dani, Ohno-Shosaku & Masanobu, 2007).

1.2 Receptores endocannabinérgicos

El CB1 y CB2 son receptores de siete dominios transmembranales acoplados a una proteína $G_{i/o}$ ampliamente distribuidos en el Sistema Nervioso Central (SNC) (ver figura 1). Sin embargo, éstos receptores también están expresados en la periferia. Cuando el receptor CB1 es activado, las subunidades “ α ” y “ β - γ ” inhiben la actividad de la adenilato ciclasa, ~~aumentan la actividad de~~ canales de potasio e inhiben la actividad de los canales de calcio, respectivamente. Como se observa en la Figura 2, esta segunda mensajería da como resultado la disminución de la liberación del neurotransmisor (Howlett et al., 2002).

Localización del receptor CB1 en el cerebro de rata.

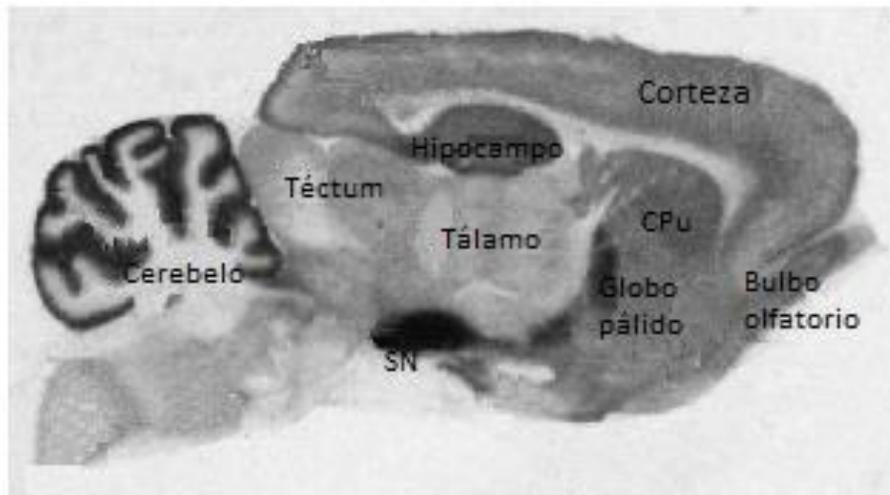


Figura 1. Autorradiografía del CB1 en un corte sagital de un cerebro de rata. Las partes más oscuras indican una mayor presencia del receptor CB1. Observamos una gran expresión del receptor en el cerebelo, hipocampo y corteza. (Imagen tomada y modificada de Freund et al. 2003).

Se ha reportado, por ejemplo, que el CB1 puede modular de esta manera la liberación de GABA y Glutamato (Schlicker & Kathmann, 2001).

Mecanismo de acción del 2-AG

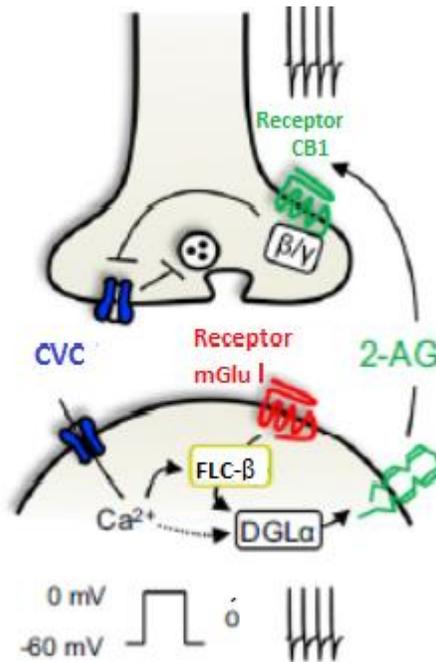


Figura 2. Representación esquemática de uno de los mecanismos por el cual el receptor CB1 ejerce su efecto. La actividad postsináptica dispara la entrada de Ca²⁺ a través de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (CVC). Este Ca²⁺ activa a la diacilglicerol lipasa (DGLα) sintetizando endocannabinoides a partir de diacilglicerol membranar. De igual forma, la actividad postsináptica puede llevar a la movilización de los endocannabinoides por la activación de los receptores metabotrópicos del tipo I a glutamato (mGlu) que activan a la fosfolipasa Cβ (FLC) la cual a su vez genera diacilglicerol, posteriormente será convertido en 2 – araquidonoilglicerol (2-AG) por la DGLα. El 2-AG activa al receptor CB1 presináptico. Al activarse el receptor reduce la liberación del neurotransmisor. (Imagen obtenida y modificada de Castillo et al., 2012). β

1.3. Endocannabinoides

Los endocannabinoides más estudiados son el N-araquidonoyletanolamina o Anandamida (AEA) (Melis, Muntoni y Pistis, 2012) y 2-arachidonylglicerol (Mechoulam, 1995) (Ver figura 3). Son sintetizados a demanda en la postsinapsis y actúan como mensajeros retrógrados, es decir, regulan la liberación presináptica, como ya se vio anteriormente (Castillo, Younts, Chavez & Hashimoto, 2012). La Oleamida es otro endocannabinoide descubierto en el líquido cefalorraquídeo en

gatos privados de sueño, descubierto en los 90's, el cual es capaz de inducir sueño en gatos (Cravatt et al., 1995).

Síntesis y degradación de la AEA y 2-AG

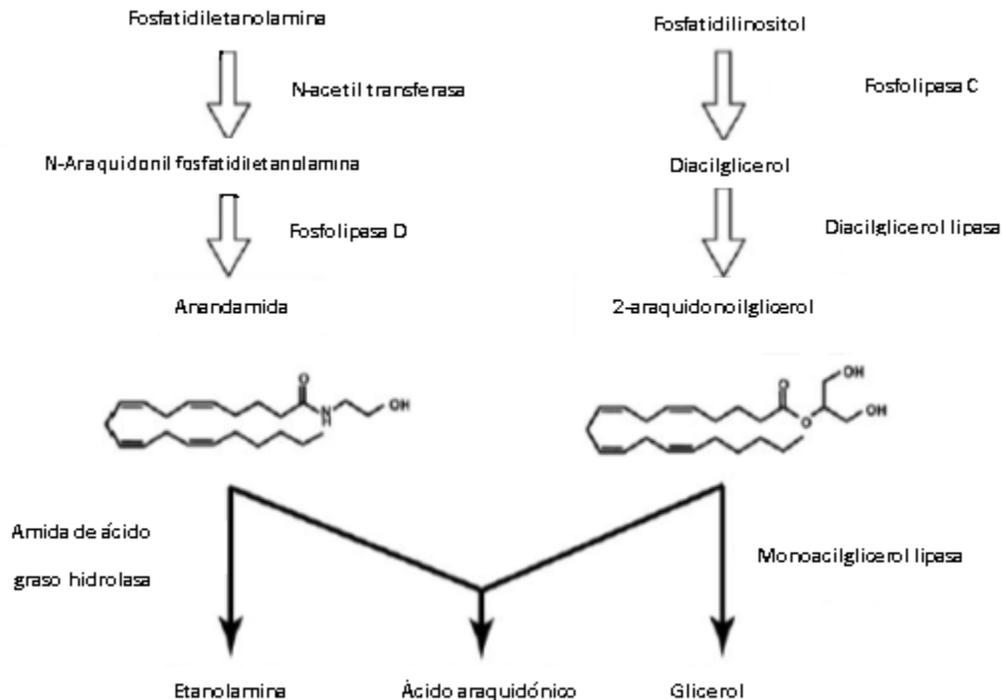


Figura 3. Vías de síntesis y degradación de los endocannabinoides más estudiados. Del lado izquierdo observamos a la Anandamida, mientras del lado derecho vemos al 2-AG (imagen tomada y modificada de Hashimoto et al., 2007).

El sistema endocannabinoide está implicado con un incremento en el consumo de sustancias de abuso como la marihuana (Tanda, Munzar & Goldberg, 2000) y el alcohol (Colombo, Serra, Vacca, Carai & Gessa, 2005). De manera interesante, este sistema también se ha asociado con una disminución al dolor (Murillo Rodríguez et al., 2001) y la ansiedad (Bergamashi et al., 2011). Lo que sugiere que un mecanismo común que subyace a cada una de ellos podría ser el sistema endocannabinoide. Entonces, una vez abordado las generalidades del sistema endocannabinérgico ahora se hablará de una de nuestras variables de interés: trastorno por consumo del alcohol.

2.1 Trastorno por consumo de alcohol

El trastorno por consumo de alcohol se presenta, según el manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, DSM-V (APA, 2013) cuando:

1. Se consume alcohol con frecuencia en cantidades superiores o durante un tiempo prolongado (por lo menos 6 meses).
2. Hay un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de dejar de consumir alcohol.
3. Se invierte mucho tiempo en actividades para consumir el alcohol o recuperarse de él.
4. Ansias desmedidas por consumir alcohol.
5. Consumo recurrente de alcohol que lleva al incumplimiento de deberes de la vida cotidiana como en la escuela, trabajo o el hogar.
6. Consumo continuado a pesar de padecer problemas sociales o interpersonales persistentes provocados por el alcohol.
7. El consumo provoca el abandono o reducción de importantes actividades sociales, profesionales o de diversión.
8. Se consume alcohol en presencia de un riesgo físico.
9. Se continúa con el consumo a pesar de estar consciente del daño físico o psicológico provocado por el alcohol.
10. Se presenta la tolerancia
11. Hay síndrome de abstinencia

El alcohol es un depresor del sistema nervioso central, dada su acción facilitadora sobre los receptores GABA del tipo A. Para producir sus efectos sobre una persona, la concentración en sangre del alcohol debe ser entre 5-10 mmol/L (Katzung, 2001). Sin embargo, el alcohol a diferentes concentraciones en sangre, produce distintos efectos conductuales, psicológicos o fisiológicos. Por ejemplo: en concentraciones bajas, el sujeto presenta euforia y desinhibición. Conforme los niveles van en aumento, se presentan conductas como disminución en los reflejos, falta de coordinación motora, el habla se dificulta ya que el sujeto arrastra la lengua. En concentraciones que van de entre 43 mmol/L a 65 mmol/L en los humanos se

produce vómito y se puede caer en estupor. Por último, en concentraciones a partir de los 109 mmol/L (o 6 g/l), el sujeto puede entrar en un paro respiratorio y morir (Grilly, 2002).

Tabla 1. Concentración de alcohol en sangre (CAS) por cada trago con aproximadamente 12 g de alcohol puro o etanol. (Datos obtenidos de Brailowsky, 1995).

No. de tragos	% de alcohol en sangre (g/l)	% de alcohol en sangre (g/dl)	Efectos físicos y psicológicos
1	0.2 a 0.3	0.02 a 0.03	-Sin efectos evidentes. -Ligera elevación del estado de ánimo.
2	0.5 a 0.6	0.05 a 0.06	-Sensación de relajación y calor -Disminución del tiempo de reacción. - Disminución en la coordinación fina.
3	0.8 a 0.9	0.08 a 0.09	-Alteración ligera del equilibrio, habla, visión y oído. - Sensación de euforia. -Pérdida de la coordinación motora fina.
4	1 a 1.2	0.1 a 0.12	-La coordinación y el equilibrio se dificultan. -Alteración del juicio crítico.
5	1.4 a 1.5	0.14 a 0.15	-Alteración mayor del control físico y mental. -Habla y visión difíciles.
7	2	0.2	-Pérdida completa del control motor -Se requiere de ayuda para moverse. -Hay confusión mental.
10	3	0.3	-Intoxicación severa. -Control consciente mínimo.
14	4	0.4	-Inconsciencia. -Umbral del estado de coma.
17	5	0.5	-Coma profundo.
20	6	0.6	-Muerte por depresión respiratoria.

Gramos (g), litro (l), decilitro (dl).

El alcoholismo es una enfermedad incluida en el DSM-V que puede traer consecuencias a corto, mediano y largo plazo en la vida de cualquier persona. Como ya revisábamos anteriormente, el alcohol puede llevar a la muerte en caso de que su concentración en sangre sea a niveles muy elevados (p. ej. 5 g/l). No obstante,

un sujeto no consume niveles tan altos para morir, pero si para entrar en un estado de intoxicación y por periodos prologados. Esto le trae consecuencias negativas en el ámbito familiar, escolar o laboral. Entonces, surge aquí una pregunta: ¿por qué los seres humanos consumen alcohol aun conociendo sus efectos negativos? Para contestar a esta pregunta y dar una respuesta ante un problema de origen multifactorial, es necesario involucrarse tanto en los factores medioambientales como en la neurobiología del consumo de alcohol, no obstante, en este trabajo nos enfocaremos en un punto neurobiológico y colocar una pieza en el rompecabezas del trastorno por consumo de alcohol.

2.2. Neurobiología del consumo por alcohol

La vía mesolímbico-cortical es el sistema al cual se le atribuye principalmente la mediación de los efectos reforzantes que ejercen sustancias de abuso como el alcohol o la cocaína (Wise, 1989). Este sistema se conforma principalmente por el área tegmental ventral (AVT), un área con neuronas principalmente dopaminérgicas que proyectan al núcleo accumbens (NAcc). Éste a su vez tiene proyecciones GABAérgicas que llegan al AVT, cerrando un circuito de retroalimentación negativa. El NAcc también es regulado por proyecciones glutamatérgicas que se originan en la corteza prefrontal (CPF), el hipocampo, y la amígdala. Otras moléculas que también modulan la actividad del Nacc son opiáceos, endocannabinoides y la norepinefrina (Nestler, 2005).

El AVT posee neuronas dopaminérgicas que proyectan sus axones hacia el NAcc, en donde liberan dopamina. La liberación de este neurotransmisor, se ha asociado con una función determinante en el reforzamiento positivo y con el inicio de la ejecución de una conducta para conseguir el reforzador. Esta vía es llamada mesolímbica (ver Figura 4) (Volkow et al., 2012; Weiss, Lorang, Bloom y Koob, 1993; Wise, 2009). La forma de disparo de las neuronas dopaminérgicas también modula de diferente manera la recompensa de las drogas, presentándose un disparo fásico durante la recompensa y un disparo tónico durante los cambios en las funciones ejecutivas que ocurre en la adicción (Grace, 2000).

Sistema de recompensa

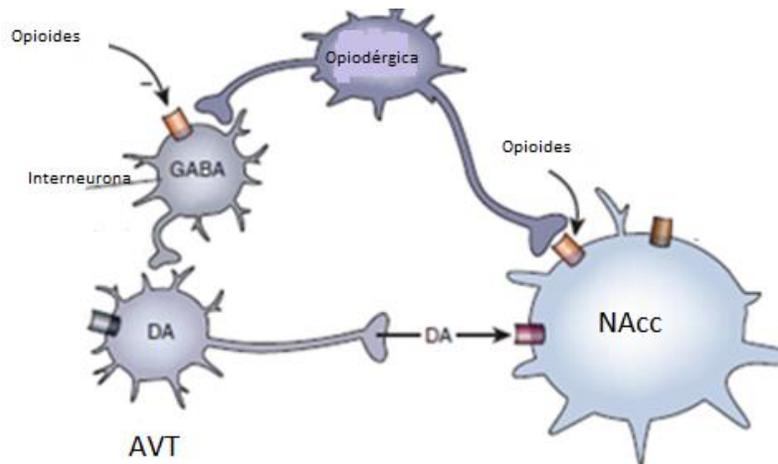


Figura 4. Representación esquemática de la innervación dopaminérgica y opiácea hacia el NAcc. AVT, área tegmental ventral; NAcc, núcleo accumbens, DA, dopamina. (Imagen tomada y modificada de Nestler, 2005).

Se ha visto la participación de la dopamina durante el condicionamiento operante. Por ejemplo Wise y Schwartz (1981) limitaron la presencia de dopamina y observaron una disminución en la presión de una palanca para obtener comida, agua o sexo. También se ha registrado que un reforzador, se vuelve ineficaz al tener el sistema dopaminérgico bloqueado (Wise, 2004). Estudios llevados a cabo con cocaína y metanfetamina, han asociado la administración de ambas drogas al incremento de la dopamina en regiones estriatales, en especial en el NAcc (Fowler et al., 2008).

El Nacc tiene proyecciones, principalmente neuronas de espinas medianas GABAérgicas, hacia el pálido ventral, globo pálido, núcleo entopeduncular, la sustancia negra, núcleo rojo, hipotálamo lateral rostral, septum lateral núcleo cama de la estría terminal, núcleo preóptico medial, AVT y el núcleo retrorubral. El Nacc presenta un loop cortico-estriato-pálido-tálamo-cortical, el cual ha sido asociado a la conducta de ingesta, a la motivación y a la adicción. Entonces, el Nacc ha sido asociado a un interfaz funcional entre el sistema límbico y motor, sugiriendo que esta región tiene un papel fundamental en controlar los impulsos biológicos para la supervivencia y la reproducción (Groenewegen y Russchen, 1984; Salgado y Kaplitt, 2015).

Otras vías dopaminérgicas implicadas en el sistema de recompensa, son la vía mesoestriatal, la cual proyecta de la sustancia nigra (SN) al estriado dorsal, y la vía mesocortical, en donde los axones del AVT proyectan hacia la CPF (Volkow et al., 2011).

Dentro de la vía mesocortical, se encuentra la participación de la corteza orbito frontal (OFC), giro cingulado (GC) y la corteza prefrontal dorsolateral (CPF DL) involucradas en la conducta motivada, inhibición y control de la regulación emocional y la toma de decisiones. Cuando estas estructuras tienen un desempeño deficiente, provocado por una regulación a la baja del receptor D₂, por ejemplo, los adictos tienden a incrementar el valor motivacional hacia las drogas y llevarlos a perder el control en su consumo (Volkow y Fowler, 2000). El Alcohol tiene un efecto sobre las neuronas dopaminérgicas del AVT (Brodie et al., 1990), aumentando la liberación de la dopamina en el Núcleo Accumbens. Hay evidencias indicando que el etanol por sí mismo es capaz de excitar a las neuronas dopaminérgicas del AVT aisladas, por lo cual, es probable que las neuronas del AVT no necesiten de la mediación de otras neuronas para excitarse (Brodie et al., 1999).

Las neuronas opioidérgicas pueden regular la liberación de dopamina de forma directa e indirecta en el Nacc. Por un lado, se tiene la inhibición de las interneuronas GABAérgicas propiciado por agonistas opiáceos, generando un incremento de la dopamina en el Nacc al haber mayor disparo de las neuronas dopaminérgicas (vía indirecta) y, por el otro lado, se tiene el incremento de la dopamina por la activación de los receptores opiáceos en Nacc o AVT (vía directa) (Figura 4). Esta información concuerda con la inducción de Condicionamiento de Preferencia de lugar, causada por la administración de morfina en ambas regiones cerebrales (Bozarth & Wise, 1981; Johnson & North, 1992; Wise, Leone, Rivest & Leeb, 1995). Otro dato que apoya la participación del sistema opiáceo en el sistema de recompensa, son los resultados favorables en el tratamiento a la dependencia al alcohol con la administración de un antagonista opiáceo (Srisurapanont & Jarusuraisin, 2005).

Como ya se observó, otro sistema involucrado en el sistema de recompensa y en el consumo de alcohol, es el GABAérgico. En este sistema parecen ocurrir los principales efectos del alcohol, con la activación de los receptores GABA_A del SNC. Dichos receptores tienen un papel preponderante en la inhibición del SNC, al permitir la entrada de iones de cloro (Cl) a la neurona. Esto último genera una hiperpolarización cuyas consecuencias inmediatas consisten en la disminución de la actividad neuronal y la subsecuente disminución en la liberación de neurotransmisores (Barnard et al., 1998; Boehm et al., 2004). Tal como se observa en la figura 4, las interneuronas GABAérgicas inhiben a las neuronas dopaminérgicas provenientes del AVT, esta inhibición promueve una mayor liberación de dopamina en el NAcc provocando un efecto reforzante en el organismo (Nestler, 2005). De manera interesante, los ratones suprimidos a la subunidad delta de los receptores GABA_A (*Knock out* GABA_A) parecen consumir menos alcohol que los ratones íntegros (Mihalek et al., 2001). Lo anterior aporta otro indicio acerca de la participación de los receptores GABA_A en los efectos reforzantes del alcohol.

2.3. Alcohol y el sistema endocannabinérgico

Como ya se mencionó el sistema endocannabinérgico está implicado en el sistema de recompensa, por lo cual, se han llevado investigaciones para conocer su participación en la conducta motivada del consumo de alcohol u otras drogas. Por ejemplo: anomalías en el sistema, como aumento en la expresión de CB1 en el NAcc y una disminución en la expresión de CB1 en la CPF a consecuencia de sufrir estrés en los primeros días posnatales, se ha reportado que incrementa el consumo de alcohol en ratas machos, no obstante, otros sistemas como el de glucocorticoides también se ve afectado por el estrés temprano, lo cual podría generar o tener un efecto sinérgico sobre el organismo y llevarlo a ser más propenso a consumir alcohol (Romano-López et al., 2016). Este modelo de separación materna, se asemejaría en los humanos a una privación de cuidado materno en edades tempranas, y como ha sido mostrado en otros experimentos (Odeon, Andreu, Yamaguchi, Grosman & Acosta, 2015) hace más proclives a las ratas de

consumir más alcohol. Modelos llevados a cabo en primates no humanos (Macacos y monos Rhesus), también sugieren que la separación materna, además de incrementar los niveles de cortisol, hace más propensos a los primates de consumir alcohol en su vida adulta, probablemente inducido por el estrés sufrido en la infancia (Fahlke et al., 2000; Higley, Hasert, Suomi & Linnoila, 1991). El incremento del consumo de alcohol a causa del estrés, se refuerza en otro estudio donde se observó una mayor ingesta de alcohol en monos Rhesus, a causa de un estrés sufrido por restricción de comida (Pakarinem, Williams & Woods, 1999)

La participación del sistema endocannabinérgico se refuerza con el hecho de que el bloqueo del CB1R con un antagonista llamado rimonabant reduce el consumo voluntario (Dyr, Ligieza, y Kostokowski, 2008) la búsqueda y la auto-administración de alcohol en ratas (Economidou et al., 2006). De igual forma, la carencia del receptor CB1 (*Knock out*) en una cepa de ratón (C57Black/6J) muy proclive a consumir alcohol, lleva a los sujetos a consumir una menor cantidad de alcohol comparados con los ratones intactos (Wang et al., 2003). Es importante resaltar que ante la carencia del receptor CB1 no se libera dopamina durante el consumo de diferentes drogas, como la morfina, la nicotina y alcohol. Lo mismo ocurre con el bloqueo de dicho receptor a través de la administración del antagonista SR141716 (Mascia et al., 1999; Cohen et al., 2002; Hungund et al., 2003). Cuando es administrado un agonista sintético al receptor CB1 (CP55 940), parece ocurrir un incremento en la motivación para consumir alcohol en ratas Wistar, no obstante, el efecto puede ser prevenido, con la administración del antagonista SR141716 (Gallate, 1999). Es también importante señalar que otras drogas, como la cocaína (Soria et al., 2005), es capaz de liberar dopamina en ratones silvestres a CB1, pero parece no inducir la búsqueda de ésta, como ocurre en los ratones silvestres.

En un estudio posterior llevado a cabo por Colombo et al. (2002) encontraron que los agonistas al receptor CB1, CP55-940 y Win 55,212-2, son capaces de promover un incremento del consumo de alcohol. También se encontró en el mismo estudio, que los sujetos experimentales no mostraron un aumento en el consumo de comida, agua o sacarosa, sugiriendo un efecto estimulante sólo ante

el consumo de alcohol. También la Anandamida (cannabinoide endógeno) promueve la ingesta de alcohol en ratones; este efecto se pierde con la administración de SR141716 (Wang et al., 2003).

El incremento del consumo de alcohol está asociado a una mayor concentración de alcohol en sangre, lo cual podría sugerir que la activación del receptor CB1 podría estar incrementando el *set point* del reforzamiento positivo hipotético que controla el consumo de alcohol (Colombo et al., 2005). Es decir, al incrementar el *set point* del reforzamiento, se estaría necesitando una mayor cantidad de alcohol para el efecto reforzante. Blednov, Cravatt, Boehm, Walker y Harris, (2007) aportaron evidencia de que la enzima catalizadora de la Anandamida, la FAAH, también podría participar en el consumo de alcohol. Esto lo demostraron en un tarea de elección de dos botellas, donde ratones machos sin la enzima FAAH (*Knock out FAAH*) mostraron una mayor preferencia y consumo de alcohol comparados con los silvestres. Por otro lado, las hembras no mostraron ninguna diferencia significativa en la preferencia o consumo de alcohol, comparadas con su grupo control, lo cual podría indicarnos que la presencia o ausencia de esta enzima podría no modificar el consumo de alcohol en ellas.

En resumen, podemos decir que el ingerir alcohol provoca un estado de reforzamiento positivo sobre el sujeto, mediado en forma principal por el circuito de la recompensa que incluye a los sistemas dopaminérgico, GABAérgico, opiáceo y endocannabinérgico. El efecto reforzante de las drogas una de las causas por la cual se consume alcohol a pesar de su peligro. Sin embargo, es un fenómeno multifactorial que también involucra causas externas, como factores sociales, familiares etc.

No obstante, un factor interno que ha sido asociado al consumo de alcohol es la ansiedad, ya que parece haber una prevalencia relativamente alta (a menos en este estudio fue de 82.5%) de pacientes con algún tipo de trastorno de ansiedad y un alto consumo de alcohol (Smail, Stockwell, Canter & Hodgson 1984). Con relación a lo anterior, la hipótesis de la "Reducción tensional" propone que la búsqueda de alcohol es el resultado de una necesidad por disminuir los estados

negativos del organismo por niveles altos de estrés o ansiedad. El hecho de consumir alcohol podría reflejar las propiedades ansiolíticas del fármaco y de esta manera, los efectos del alcohol serían más reforzantes en comparación con sujetos sin trastorno alguno de ansiedad (Cappell & Herman, 1972).

3.1. Ansiedad

La ansiedad es un estado emocional caracterizado por sentimientos de preocupación y aprehensión, acompañada de manifestaciones somáticas, cognitivas y conductuales. Puede ser distinguida del miedo, ya que la ansiedad es un estado no específico de la conciencia enfocado a resolver la incertidumbre, mientras que el miedo está enfocado a una amenaza específica. La ansiedad es parte del repertorio conductual normal, y su importancia radica en la capacidad de anticipación para generar planes, estrategias y tácticas que dota al organismo para hacer frente a situaciones adversas. No obstante, cuando es de una intensidad desproporcionada al estímulo, es demasiado frecuente o aparece en contextos inadecuados, puede afectar el funcionamiento normal del organismo; es en este momento cuando se considera patológica (Nuss, 2015). En este sentido, los trastornos de la ansiedad, son caracterizados como manifestaciones extremas de aspectos de la ansiedad normal (Gray y McNaughton, 2000).

El DSM-V (APA, 2013) clasifica los trastornos de ansiedad en:

- 1) Trastorno de ansiedad por separación.
- 2) Mutismo específico.
- 3) Fobia específica.
- 4) Trastorno de ansiedad social (fobia social).
- 5) Trastorno de pánico.
- 6) Agorafobia.
- 7) Trastorno de ansiedad generalizada.
- 8) Trastorno de ansiedad inducido por sustancias/medicamentos.
- 9) Trastorno de ansiedad debido a otra afección médica.
- 10) Otro trastorno de ansiedad especificado.

11) Otro trastorno de ansiedad no especificado.

A pesar de la diversa clasificación de los trastornos de ansiedad, es muy probable que compartan total o parcialmente, un sustrato neurobiológico similar.

La ansiedad, es acompañada por cambios en los sistemas neuronales que organizan diferentes respuestas conductuales ante distintas amenazas. Incluye áreas como la corteza prefrontal medial (CPFm), núcleos amigdalinos e hipotalámicos, hipocampo y la sustancia gris periacueductal (SGP) (Canteras, Barbosa, Bertoglio, de Padúa y Silveria, 2010).

3.2. Neurobiología de la ansiedad

A pesar de que es difícil saber si en los modelos animales podemos observar la ansiedad, dado su componente subjetivo, estudios de que evalúen la “reactividad al estrés”, podrían ser vistos como un índice de ansiedad contextual. En este sentido, experimentos de reactividad al estrés que miden la conductancia de la piel, tasa cardíaca, respiración, tensión muscular o reflejo de sobresalto, podrían ser considerados como una forma de evaluar la ansiedad (ver revisión Crascke et al., 2009).

Un mecanismo que podría estar relacionado con la ansiedad, parece involucrar al núcleo cama de la estría terminal (NCET). Esta estructura se encuentra emparentada anatómica, neuroquímica, citoarquitectónica y embriológicamente con el núcleo central de la amígdala (una estructura relacionada a la regulación del miedo). Ambos núcleos pertenecen a la amígdala extendida, y reciben proyecciones del núcleo basolateral (Walker, Toufexis, Davis, 2003). Shekhar y Keim (2000) reportaron que con la administración de un agonista a los receptores GABA A (muscimol) disminuye la ansiedad. Esto ocurrido después de la administración crónica de Aliglicina en el NCET. Davis, Walker, Miles y Grillon (2010) también relacionaron al NCET con la ansiedad en una prueba de condicionamiento clásico al miedo, al notar que esta región responde preferentemente a la duración prolongada de los estímulos, resultando en algo que podría denominar ansiedad.

También se ha adjudicado al sistema septohipocampal una función en la ansiedad. Esta idea surge de la observación de los efectos conductuales que reflejan una reducción en la ansiedad cuando se provoca experimentalmente una lesión temporal o permanente en la región septal y/o hipocampal (Degroot y Treit, 2004; Gray y McNaughton, 2010). De acuerdo a lo anterior, el sistema septohipocampal podría estar generando una respuesta de ansiedad a un conflicto situacional cuando la estabilidad del medio o una conducta en desarrollo es interrumpida súbitamente, generándose un incremento del alertamiento y la atención, aumentando la recolección de información, que llevará al sujeto a resolver la situación conflictiva. Dicho en otras palabras, el conflicto ocurre cuando el sujeto tiene que escoger entre dos distintas metas disponibles (Canteras et al. 2010).

La CPFm de igual manera, parece estar involucrada en respuestas conductuales relacionadas a la ansiedad (Bishop, 2007). Por ejemplo, al someter a sujetos experimentales a depredadores, al laberinto elevado en forma de cruz, a ambientes novedosos, a estrés por restricción o nado forzado, se ha visto un incremento en la actividad de la corteza prelímbica, una subregión de la CPFm (Sewards & Sewards, 2003).

Se han visto una activación anormal de la CPFm en voluntarios sanos durante la presentación de estímulos de miedo (p ej. imágenes). La activación de esta región, se ha asociado a diferentes trastornos de ansiedad, es decir, tanto la activación por estímulos de miedo como por diferentes trastornos de ansiedad, se superponen, sugiriendo el mismo sustrato neuroanatómico en ambos procesos (Vertes, 2006).

La CPFm tiene conexiones directas con estructuras del tallo cerebral, hipotálamo, núcleo del tracto solitario, la sustancia gris periacueductal, núcleo del rafe dorsal y al AVT (Gabbott, Warner, Jays, Salway & Busby, 2005). De estas regiones hay que resaltar a la SGP, la cual se retomará más adelante y es una región asociada con la transmisión del dolor y el AVT región implicada en el sistema de recompensa, como ya se mencionó en el capítulo anterior.

La estimulación de la CPFm parece llevar a la baja cambios fisiológicos que correlacionan con la ansiedad, como la respiración, ritmo cardíaco, piloerección y presión sanguínea. Es capaz de inhibir la respuesta cardiovascular inducida por la estimulación eléctrica del hipotálamo y la amígdala central (Canteras et al., 2010). La influencia que tiene la CPFm sobre las respuestas autonómicas, se llevan a cabo por las conexiones en las regiones hipotalámicas como en el núcleo subparaventricular ventral (sub-NPV), núcleo hipotalámico dorsomedial (HDM) y el hipotálamo lateral (Van Eden y Bujis, 2000). La CPFm también participa en las respuestas endocrinas de estímulos aversivos, modulando al eje Hipófisis-Pituitaria-Adrenal (HPA) mediante las conexiones con el NCET o la región peri-NPV. Además, la CPFm posee proyecciones hacia la SGP en donde puede disminuir la respuesta conductual y autonómica a las entradas de estímulos emocionales (Van Eden & Bujis, 2000).

3.3. Ansiedad y sistema endocannabinérgico

Algunos estudios sugieren la participación del sistema endocannabinérgico en la ansiedad, por ejemplo este sistema inhibe a las hormonas relacionadas con la ansiedad, también porque los agonistas o la carencia del receptor CB1 parecen producir ansiedad. Algunos estudios que han reportado esto son:

La administración crónica de un agonista al receptor CB1 (HU-210), en un modelo de ratas, puede modificar la liberación de la hormona Factor Liberadora de Corticotropina (CRF), hormona relacionada con el estrés pero también con la ansiedad, los niveles de esta hormona aumentan durante un periodo de abstinencia, sugiriéndonos que el receptor podría participar en la regulación a la baja de la hormona CRF (Rodríguez de Fonseca, Carrera, Navarro, Koob & Weiss, 1999).

Onaivi, Green y Martin (2012) administraron diferentes concentraciones de THC en ratones, encontrando un efecto ansiogénico. Sin embargo, también se ha observado que el consumo de dosis bajas de THC induce una disminución de la ansiedad (Ashton, 2001). Por otra parte se ha encontrado una disminución

significativa de la ansiedad en humanos, con una sola administración de cannabidiol (Crippa et al., 2004).

Martin, Ledent, Parmentier, Maldonado y Valverde (2002) hallaron altos niveles de ansiedad en ratones carentes a CB1 (*Knock out CB1*) comparados con los ratones silvestres. Esta observación concuerda con lo ya reportado por Navarro et al. (1997) quienes al administrar de forma aguda 0.3mg/kg de SR141716A (antagonista al receptor CB1) a un grupo de ratas observaron una disminución en el porcentaje de exploración en una prueba de brazos abiertos, probablemente debido a un incremento en la ansiedad.

Los estudios llevados a cabo para relacionar la ansiedad y el sistema endocannabinérgico se han realizado con la administración de fármacos o modelos *Knock out* y por esta razón, es necesario explorar la relación entre la ansiedad y el receptor CB1 sin que haya ocurrido modificación alguna. Ahora bien, la ansiedad modifica el funcionamiento fisiológico de un organismo y, en consecuencia, causa modificaciones conductuales o cognitivas, como el hiperalertamiento (Barlow, 2002). Este hiperalertamiento, pudiera provocar que en sujetos ansiosos se presenten una menor atención a otros tipos de señales externas o internas, debido a que estarían ocupados en busca de señales amenazantes inespecíficas.

Una de las estructuras cerebrales que está implicada en la atención, es la CPF, perteneciente a la red atencional y que junto con la red atencional posterior, regulan cual información es relevante y cuál no (Posner & Petersen, 1990). Esta red se encarga de la planificación, desarrollo de estrategias, resolución del conflicto, y situaciones que impliquen la generación de una respuesta novedosa (Posner & Dehaene, 1994). La ansiedad podría actuar como un “distractor cognitivo”, provocando que la red anterior emplee más recursos en ella y de esta manera interferiría con la percepción de otros estímulos externos o internos. Es decir, al estar prestando más atención a la ansiedad (como si fuera un estímulo) el sistema detectaría como menos relevantes otros estímulos, por ejemplo el dolor.

4.1. Dolor

El dolor fue definido por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) como una experiencia sensorial o emocional asociada con daños físicos potenciales o reales (Merskey & Bogduk, 1994). El dolor involucra a la percepción, debido a que es necesaria la capacidad de abstracción y elaboración de impulsos sensoriales y por lo tanto, es necesario diferenciarlo de la nocicepción. Esta último, implica la respuesta neurofisiológica del organismo ante un estímulo nociceptivo y de esta manera no requiere de un procesamiento elaborado en comparación con el dolor (Millan, 1999).

El dolor constituye una alerta que tiene la función de proteger al organismo, disparando reacciones hormonales e induciendo conductas aprendidas de evitación que pueden disminuir el daño potencial o una consecuencia dañina (Le Bars et al. 2001). Dennis y Melzack (1983) argumentan que el dolor tiene por lo menos 3 funciones: hacer consciente al sujeto de la existencia de un daño real tisular, advertir a un sujeto de la probabilidad de que un daño tisular puede ocurrir por la acción continua de un estímulo y advertir a un grupo social de un daño, tan pronto como sea posible para cualquiera de los miembros.

Una vez definido al dolor, se debe hablar acerca de sus componentes neurobiológicos y su relación con el sistema endocannabinérgico.

4.2. Neurobiología del dolor

La propagación del dolor comienza cuando los receptores nociceptivos son activados. Estos receptores se encuentran en la piel, mucosas, tendones, músculos, tejido conectivo, mucosa, membranas y arterias, entre otros tejidos (Mense, 1983).

Se han identificado por lo menos 3 tipos de receptores nociceptivos (Kandel, Schwartz, Jessell, y Agud, 2012):

1. Térmicos: activados por temperaturas mayores a 45 C° y menores a 5 C°.
2. Mecánicos: activados por la presión ejercida sobre la piel.

3. Polimodales: activados por una alta intensidad mecánica, química o térmica

A diferencia de los demás receptores, los receptores nociocéptivos son terminaciones libres de una neurona sensorial primaria, y son fibras que reciben información de todo el cuerpo. Las neuronas sensoriales que reciben la información del cuerpo, tienen sus somas en los ganglios de la raíz dorsal ubicados en la región posterior de la médula espinal, mientras que la información sensorial proveniente de la cabeza es recibida por el nervio trigeminal. Una vez recibida la información sensorial en las terminaciones libres, puede ser transmitida por 1 de los 3 tipos de fibra. Dependiendo el tipo de información sensorial, es la fibra que lleva la información (Kandel et al. 2012; Julius & Basbaum, 2001):

1. Fibras A β : altamente mielinizadas y de rápida conducción. Estas fibras detectan estímulos inocuos en la piel, músculos, articulaciones. También contribuyen a la propiocepción.
2. Fibras A δ : son fibras predominantemente nociocéptivas. Se encuentran ligeramente mielinizadas y transmiten el llamado “primer dolor”.
3. Fibras C: Son fibras nociocéptivas carentes de mielina. Llevan información inocua sobre la temperatura y son los encargados de transmitir el “segundo dolor”.

Una vez que las fibras de las neuronas sensoriales transfieren el impulso eléctrico a las láminas I, II, V y VI, ubicadas en los cuernos posteriores de la espina dorsal, los axones de segundo orden llegan a formar parte del fascículo anterolateral o del fascículo posterior, los cuales transmiten la información nociocéptica a diferentes regiones como el tronco cerebral, tálamo, sustancia gris periaqueductal, región parabraquial, formación reticular de la médula, complejo amigdalino, núcleos septales, hipotálamo, entre otros (Millan, 1999; Willis y Westlund, 1997) (Ver Figura 5).

Transmisión del dolor en el cerebro

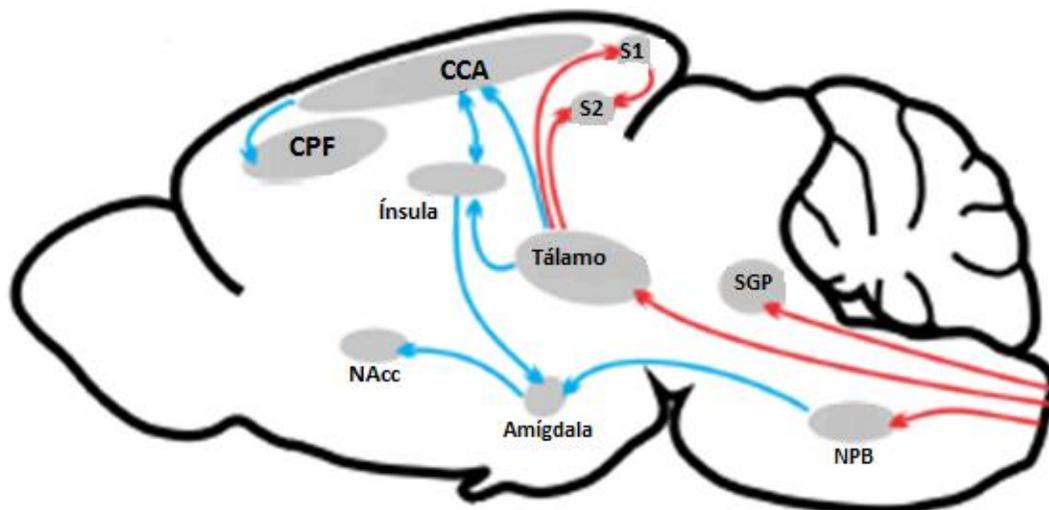


Figura 5. Esquema ilustrativo de las redes neuronales implicadas en el dolor. Las flechas rojas indican procesamiento sensorial, mientras que las azules procesamiento afectivo. CCA: corteza cingulada anterior. CPF: corteza prefrontal. NAcc: núcleo accumbens. NPB: núcleo parabraquial. S1: corteza somatosensorial primaria. S2: corteza somatosensorial secundaria SG: sustancia gris periaqueductal. (Imagen tomada y modificada de Cahill et al 2014).

La SGP es una estructura mesencefálica encargada de mandar información descendente hacia el núcleo del rafé magnus (NRM). Los axones de la NRM descienden hacia las astas dorsales, junto con los axones provenientes del Locus coeruleus a través de la porción dorsal del funículo lateral en donde ejerce un control sobre la transmisión del dolor al activar interneurons encefalinérgicas, las cuales inhiben la liberación de glutamato de la neurona periférica e inhiben a la neurona de segundo orden de la sustancia gris de la médula espinal (Masson, 1999; Vanegas y Schaible, 2004).

Con la administración de morfina en la SGP, las neuronas de “encendido” son inhibidas, mientras las células de “apagado” continuamente incrementan su disparo. Cuando ocurre un estímulo nociceptivo, las células encendido no son activadas y por lo tanto no hay transmisión del estímulo hacia el circuito espinal, mientras tanto, las células de apagado no decrementan su tasa de disparo y mantienen los circuitos espinales bajo una inhibición (Hernández & Vanegas, 2001; Meng, Manning, Martin & Fields 1998;). Otro neurotransmisor involucrado en la disminución del dolor son los opioides, ya que al ser estimulada la SGP, ocurre la liberación de estos (Manning, Merin, Meng y Amaral, 2001). Estudios llevados a

cabo en humanos con IRMf han observado un incremento en la activación de la SGP cuando los sujetos experimentales eran sometidos a un estímulo nociceptivo y a la vez eran distraídos del estímulo, es decir, con la tarea distractora se pretendía focalizar su atención hacia otro estímulo y de ésta forma disminuir su percepción hacia el estímulo doloroso. Al ocurrir una mayor activación por parte de la SGP, podría sugerir que ésta estructura tiene un papel importante en la disminución del dolor. (Tracey et al 2002).

El tálamo es la principal estructura de relevo que dirige hacia la corteza cerebral, información sensorial, además de recibir, integrar y transferir la información nociceptiva. Dependiendo desde que núcleos talámicos se proyecte a la corteza, es el tipo de información nociceptiva procesada (Millan 1999). Por ejemplo; los núcleos ventroposterior lateral (VPL), ventroposterior medial (VPM) y ventroposterior inferior (VPI), parecen estar involucrados en estímulos térmicos y mecánicos e incluso a los estímulos de frío. La proyección por parte del VPI hacia la corteza somatosensorial secundaria (S2) sugiere un procesamiento afectivo, es decir, aspectos cognitivos del dolor. El núcleo VPL, también tiene conexiones a la corteza somatosensorial, pero a diferencia del núcleo VPI, envía sus axones hacia la región primaria (S1) región responsable de la localización e intensidad del dolor (Apkarian y Shi 1994; Rektor, Kanovsky, Bares, Louvel y Lamarche 2001; Timmerman, Ploner y Haucke 2001).

Otra región a la cual proyecta el tálamo, junto con la corteza del cíngulo anterior, es la ínsula. Ésta estructura manda sus axones principalmente a la amígdala, sin embargo, también tiene eferencias hacia la corteza prefrontal relacionada a componentes afectivos, emocionales y de memoria. De igual forma, la ínsula podría estar implicada en integrar información visceral, vestibular y táctil (Picard y Strick 1996; Price, 2000).

Se le ha atribuido a la amígdala un papel importante para asignarle a estímulos ambientales significativos, un aspecto afectivo, al ser un vínculo entre las regiones cerebrales que procesan información sensorial y las áreas involucradas en la producción de respuestas emocionales. Existe evidencia donde se señala a la

amígdala junto con la corteza del cíngulo anterior, como regiones importantes que juegan una función crítica en el procesamiento de los componentes afectivos del dolor (Bie, Brown & Naguib, 2011; Cahill et al., 2014).

El NAcc parece estar relacionado con el dolor ya que recibe proyecciones directamente de la médula espinal y al estar ante un estímulo doloroso, la dopamina liberada por el AVT, inhibiría la propagación del dolor de regreso hacia la medula espinal (Altier & Stewart, 1999; Burstein & Giesler, 1989). La administración de amfetamina en el NAcc, la cual incrementa la cantidad de dopamina en ésta región, disminuye la respuesta al dolor (Thierry, Tassin, Blanc y Glowinski, 1976). Saade, Atweh, Bahuth y Jabbur (1997) reportaron un decremento en la analgesia cuando lesionaron el AVT y el estriado. Aunado a esto, si se activa eléctricamente el AVT hay un incremento en la analgesia (Sotres-Bayón, 2001). También se ha observado que el bloqueo de los receptores D₂ en el NAcc Shell, disminuye la antinociocepción; es decir, el umbral al dolor disminuye (Koyanagi, Himukashi, Mukaida, Shichino & Fukuda 2008).

A la corteza del cíngulo anterior, se le ha asociado con los cambios subjetivos del dolor, es decir, cuando existe una manipulación del dolor, se modifica la actividad de la corteza del cíngulo, lo cual parece indicar que ésta área se podría encargar meramente de una dimensión afectiva en contra parte de una dimensión sensorial, llevada a cabo por la S1. Las regiones dorsales y ventrales de la corteza del cíngulo anterior interactúan con regiones frontales, como la corteza prefrontal. Ésta interacción influye en las proyecciones descendientes que van hacia estructuras subcorticales como la amígdala y la SGP (Hofbauer, Rainville, Duncan, y Bushnell, 2001; Rainville, 2002). También se ha reportado una activación importante del sistema opioide en regiones de la corteza del cíngulo anterior, NAcc (ipsilateral) y tálamo relacionada al dolor y a una baja intensidad afectiva. Mientras que la activación ipsilateral del NAcc, tálamo, amígdala y la SGP se ha asociado a una baja intensidad sensorial. Lo anterior sugiere que la corteza del cíngulo anterior, contribuye independientemente de la sensación de dolor a los cambios afectivos sobre el dolor (Zubieta et al., 2001).

La activación cortical de S1 parece estar asociada al “primer dolor” transmitido por las fibras A δ , mientras que el “segundo dolor” está asociado a la corteza del cíngulo anterior. La región S2 muestra actividad bilateral con ambas sensaciones. Esta activación diferenciada puede reflejar las diferentes funciones biológicas acerca de las estructuras. Mientras el primer dolor proporciona información sensorial necesaria para una respuesta inmediata motora, el segundo dolor provee de una atención sostenida y una conducta motivada para limitar el daño y facilitar la curación (Ploner, Gross y Timmerman, 2002; Ploner y Schnitzler, 2004). Se ha involucrado a la corteza orbital ventromedial (COV) con la modulación del dolor, ya que esta región se conecta en un loop de retroalimentación que involucra a la medula espinal-núcleo submedio talámico-COV-PAG-médula espinal. En un estudio llevado a cabo en ratas, se activaron con morfina a los receptores opioides μ de la COV provocando un incremento en la analgesia. Este incremento en la analgesia se podría deber a una inhibición de las neuronas GABAérgicas localizadas en la COV, las cuales mantienen una inhibición tónica en ésta región y que proyectan hacia la SGP, por lo tanto, al ser inhibidas las neuronas GABAérgicas por la activación opioide, las salidas de ésta región activarían a la SGP induciendo un efecto analgésico (Xie, Wang, Hou, Jia y Tang, 2004). La lesión electrolítica o microinyección de GABA en la COV provoca una reducción en la analgesia (Lu, Tang, Yuan y Jia, 1996). Otro estudio llevado a cabo por Sheng, Qu, Hou, Du y Tang (2009) aportaron evidencia sobre la participación del sistema dopaminérgico en el dolor mediado por la COV. Cuando administraron un agonista a los receptores D₂ en la COV se produjo analgesia de manera dosis dependiente y a su vez, el efecto fue erradicado con la preinyección de un antagonista a los receptores D₂. Grachev et al., (2002) mostraron evidencia de la participación de la corteza prefrontal dorsolateral (CPFDL) y de la corteza orbitofrontal (COF) en un estudio realizado en humanos con resonancia magnética de espectrografía donde observaron una activación mayor en pacientes con dolor crónico en dichas regiones.

4.3. Dolor y sistema endocannabínico

El sistema endocannabínico, parece modular la respuesta al dolor, ya que la activación de sus receptores disminuye la excitabilidad del nociceptor produciendo analgesia periféricamente (Ver figura 6) (Julius y Basbaum, 2001).

Mecanismo de acción de los endocannabinoídes en el dolor

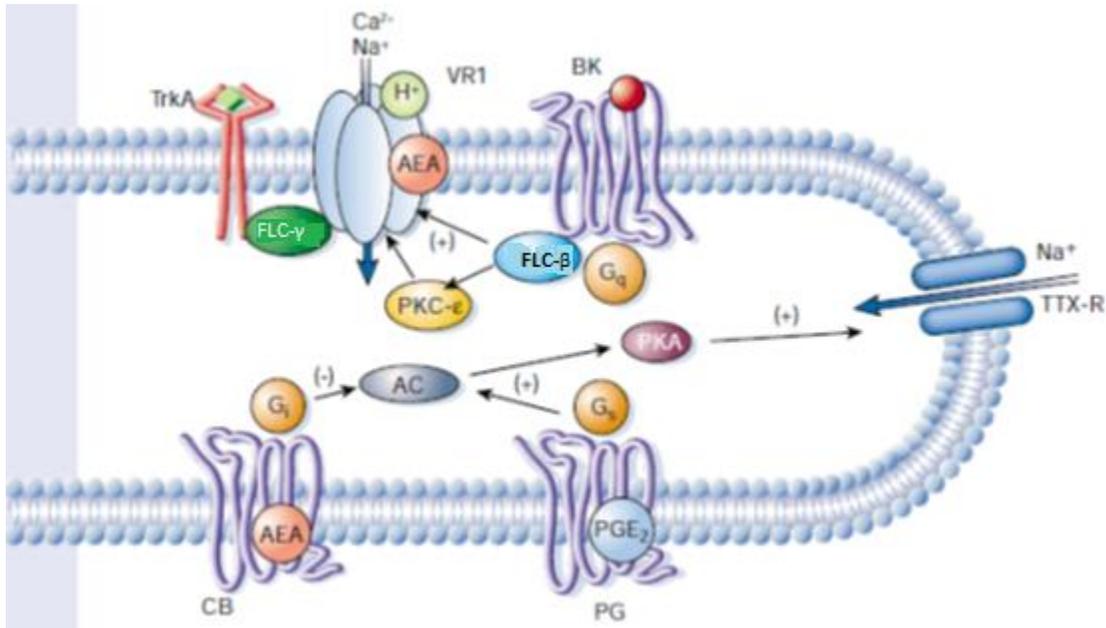


Figura 6. Cuando los nociceptores son expuestos como producto de un daño o una inflamación, su excitabilidad es alterada por una variedad de señalizaciones intracelulares. En la imagen observamos al receptor vaniloide 1 (VR1). La respuesta del VR1 al calor puede ser potenciado por una interacción directa del canal con metabolitos extracelulares de protones (H⁺) o lípidos, como la Anandamida. Al activarse el receptor CB1 y disminuir la Adenilato Ciclasa (AC) lleva a la baja la excitabilidad del receptor nociceptor y produce analgesia. (Imagen tomada de Julius y Basbaum, 2001).

Diversos estudios con administración de distintos cannabinoides han reportado los efectos analgésicos que pudieran tener. Por ejemplo, la estimulación eléctrica de la SGP más específicamente las regiones dorsales, también parece producir analgesia a través de receptores CB1, con un incremento en la liberación de Anandamida. Esto se concluye dado que la SGP puede liberar Anandamida cuando se presenta un estímulo doloroso (Walker, Huang, Strangman, Tsou y Sañudo-Peña, 1999). Caligno, La Rana, Guiufrida, y Piomelli (1998) reportaron una

disminución del dolor ante un daño tisular con la administración de los agonistas anandamida y palmitoyletanolamina (PEA, de igual forma inyectaron los antagonistas a los receptores CB1 y CB2, SR141716A y SR144528 respectivamente, observándose un incremento en el dolor. Murillo-Rodríguez et al., (2001); reportaron un incremento en la latencia al dolor (analgesia) con la administración de 50 mg/kg de Oleamida en ratas. También la administración L-nantradol o desacetil-L-nantradol (cannabinoides “no clásicos”) en ratas, se ha registrado un incremento de la antinocepción en pruebas como el “el retiro de cola” y en la plancha caliente (Yaksh, 1981). La administración oral o intravenosa de un compuesto análogo del THC, el compuesto O-1057, tiene efectos antinocioceptivos, incluso mayor al Δ -9 THC en una prueba de retiro de cola (Petwee et al., 2000). De igual forma, la administración de un agonista sintético como el WIN55212-2 de forma intravenosa, disminuye la hiperalgesia (Li, Tang, Yuan y Jia 1999).

No solo la administración periférica de un cannabinoide disminuye el dolor, sino también la administración de un agonista sintético como el compuesto HU210, en una región directamente relacionada con el dolor como es la RVM. Y como ya lo hemos en visto en distintos experimentos, éste efecto es inhibido por la administración del antagonista SR141716. El hecho de que disminuya el dolor por administrar un cannabinoide, sugiere un mecanismo generador de la analgesia por la activación de las vías inhibitoras descendentes del dolor (Martin, Tsou y Walker 1998). Está inhibición en las células de la RVM fue demostrado por Meng y Johansen (2004), donde al administrar WIN 55,212-2, en dicha región, las células disminuyeron su tasa de disparo, provocando la disminución de la algesia. Y además, el efecto fue revertido con la administración del antagonista SR141716.

Es importante mencionar que con la administración de un cannabinoide, principalmente Δ -9 THC o CP55940 de manera sistémica, podría existir un efecto de dosis respuesta e incluso podría estar mediado tanto por el receptor CB1 y CB2 (Petwee, 1999; Petwee, 2000).

Un estudio llevado en ratones *knock out* a CB1, aportó evidencia de una posible diferenciación en el cual, el sistema endocannabinérgico participa en la

nociocepción, ya que al someter a los sujetos a la prueba de retiro de cola no se mostró una diferencia significativa con el grupo control, sin embargo, en la prueba de plancha caliente, mostraron hipoalgesia en los ratones *knock out* comparados con los sujetos controles. Esto sugiere que en los ratones transgénicos, la nociocepción involucrada en los reflejos espinales no se ve afectada, mientras la nociocepción dependiente de procesos más complejo (supraespinal) si se vea afectado. Esta distinción se puede hacer, dado los diferentes niveles de procesamiento de nociocepción que evalúan las pruebas de tail flick y plancha caliente (Franklin y Abbott, 1989; Zimmer, Zimmer, Hohmann, Herkenham, y Bonner 1999). El efecto de la anandamida como analgésico, también se ha visto que en ratones sin la enzima encargada de degradarla (*Knock out FAAH*), presentan una disminución en la sensación del dolor comparados con los ratones silvestres, además de hipomotilidad e hipotermia. Éste efecto de hiperanalgesia, como lo podríamos denominar se revirtió con la administración del antagonista al receptor CB1 SR141716A (Cravatt et al 2001). Una vez establecido las relaciones entre las variables y el sistema endocannabinérgico, se presentará el planteamiento del problema.

Planteamiento del problema

Se ha mostrado evidencia de que el sistema endocannabinérgico así como las diversas estructuras cerebrales discutidas en la introducción están implicadas en la regulación de la ansiedad y del dolor y hay evidencias que indican que también en el consumo de alcohol; sin embargo, no se ha establecido la función de los receptores CB1 de la corteza prefrontal y del núcleo accumbens en la ansiedad y el dolor y su potencial correlación con la ingestión de alcohol.

Justificación

Dada la alta prevalencia en el país del trastorno por consumo de alcohol (5.5%), y de algún trastorno de ansiedad (14.3%), se debe continuar la investigación básica que nos permita aclarar no solo la etiología (p. ej. una variación en la expresión del receptor CB1), sino también las interacciones que pudieran tener entre ellos u otras variables como el dolor, y así identificar ciertas poblaciones aparentemente susceptibles de tener ambos o uno solo de estos padecimientos. De esta manera, el establecimiento de una correlación entre la ansiedad el umbral al dolor permitirá usar estos parámetros como indicadores de vulnerabilidad para el consumo de alcohol. Asimismo, la correlación entre la expresión del receptor CB1 en la corteza prefrontal y/o en el núcleo accumbens, la ansiedad, dolor y el consumo de alcohol, nos permitirán identificar poblaciones vulnerables al consumo de alcohol mediante la identificación de ciertos rasgos conductuales y expresión del receptor CB1.

Preguntas de investigación

¿La expresión del receptor CB1 en el NAcc y CPF, correlaciona con la ingesta de alcohol?

¿La expresión del receptor CB1 en el NAcc y CPF, correlaciona con la ansiedad?

¿La expresión del receptor CB1 en el NAcc y CPF, correlaciona con el dolor?

Objetivos

General

Identificar correlaciones entre la expresión del receptor CB1 en la CPF y el Nacc y entre la ansiedad, dolor y consumo de alcohol.

Particulares

Correlacionar la ansiedad con la expresión del receptor CB1 en la CPF y en el NAcc.

Correlacionar el umbral al dolor con la expresión del receptor CB1 en la CPF y en el Nacc.

Correlacionar el consumo de alcohol a la expresión del receptor CB1 en la CPF y en el NAcc.

Correlacionar los niveles de ansiedad con el consumo de alcohol.

Correlacionar el umbral al dolor con el consumo de alcohol.

Hipótesis

H₁: La mayor expresión del CB1 en la corteza prefrontal y en el núcleo accumbens correlaciona con menos ansiedad.

H₂: La mayor expresión del CB1 en la corteza prefrontal y en el núcleo accumbens correlaciona con mayor analgesia.

H₃: La menor expresión del CB1 en la corteza prefrontal y una mayor expresión en el núcleo accumbens correlacionan con una mayor ingesta de alcohol.

H₄: A mayor ansiedad mayor consumo de alcohol.

H₅: A mayor analgesia mayor consumo de alcohol.

Variables

Dada la naturaleza de estudio exploratorio del trabajo, no se contaron con variables dependientes, por lo tanto solo se mencionarán las variables independientes.

.Variable independientes:

Ansiedad:

Definición conceptual: es un estado de ánimo orientado hacia el futuro asociado con la preparación para posibles acontecimientos negativos. Correspondería en un modelo animal, al estado que presente durante un posible ataque predatorio o amenaza inminente (Barlow, 2002, Crascke et al., 2004).

Definición operacional: Tiempo empleado en brazos cerrados en un laberinto elevado en forma de cruz (Onaivi et al., 1990). Latencia de entrar al compartimiento oscuro después del entrenamiento (Tsuji, Takeda & Matsumiya, 2003).

Consumo de alcohol:

Definición conceptual: Ingesta de una bebida alcohólica (APA 2013).

Definición operacional: Ingesta de una solución con un cierto porcentaje de etanol (Romano-López et al., 2015).

Dolor:

Definición conceptual: como una experiencia sensorial o emocional asociada con daños físicos potenciales o reales (Merskey & Bogduk, 1994).

Definición operacional: Tiempo en que el sujeto experimental (rata) brinca o se lame las patas, en el experimento de la plancha caliente (Millan, 1999).

Expresión del receptor CB1:

Definición conceptual: Cantidad de proteínas elaborada por una célula (NIH, 2017)

Definición operacional: A través de la técnica de Western Blot, cuanta proteína (receptor CB1) se detecta (Romano-López, 2015).

Material y Método

Sujetos experimentales

10 Ratas machos y 10 ratas hembras de la cepa Wistar con un peso de entre 250-350 g, las cuales se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, se mantuvieron en cajas individuales en un bioterio de ciclo de luz-oscuridad invertido (luces prendidas 20:00 h – luces apagadas 8:00 h) a una temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$. Los sujetos experimentales fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio con acceso al agua y alimento *ad libitum*.

Aparatos y materiales

Plancha caliente Socrel modelo DS 37.

Laberinto elevado en cruz: brazos con 50 cm de longitud y 10 de ancho y con una elevación del suelo de 100 cm. Los brazos cerrados están rodeados por un muro de 50 cm

Aparato de Prevención Pasiva Omniaiva. Compartimento iluminado: superficie de 20 cm de longitud, 10 cm de ancho y 40 cm de altura. Compartimento oscuro de 50 cm, 10 cm de ancho y 40 cm de altura. Genera una descarga de $0.8 \mu\text{A}$ (micro Amperios).

Programa Omniaiva

Cámara de Omniaiva 10 megapíxeles y visión nocturna.

Etanol PUREX (DF, México)

Cronómetro de mano

Para el Western Blot se utilizaron los siguientes materiales:

- Espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 V3.1.0 Thermo Fischer technology.
- Sonicador Ultrasonic Homogenizer 4710 Cole Palmer Instrument Chicago II.
- Vortex Genie 2 Cat 22220^a Daigger.
- Centrifugadora Sorvall Super T21.
- Inhibidores de proteasas y fosfatasa (Mini 1 tableta/50 mL, Roche Diagnostic, Rotkreutz Switzerland).
- Agua desionizada.

- Tris Bio-Rad Cat 161-0719.
- Ácido clorhídrico (J. T. Baker).
- Sucrosa (J. T. Baker).
- Hidróxido de Sodio (J. T. Baker).
- Sulfato dodecil de sodio (SDS) (Bio-Rad).
- Membrana PVDF (Milipore).
- Leche sin grasa (5%, Bio-Rad).
- Tween 20 (Thermo Fischer).
- 2-Mercaptoetanol (Bio Rad).
- Anticuerpos: Donkey anirrabbit IgG.HRP sC-2305 (Santa Cruz). Actina (1-19)-R sC-1616 rabbit policlonal IgG (Santa Cruz).
- Reagente de detección para Western Blot (Amersham Biosciences).
- Película autorradiográfica (Kodak).
- Programa ImageJ

Procedimiento

Una vez colocadas las ratas en el bioterio de luz invertida se dio un periodo de habituación a los sujetos durante 7 días por el cambio de fase y el nuevo ambiente. Después, al transcurrir este tiempo se comenzó la fase de experimentos con el siguiente orden:

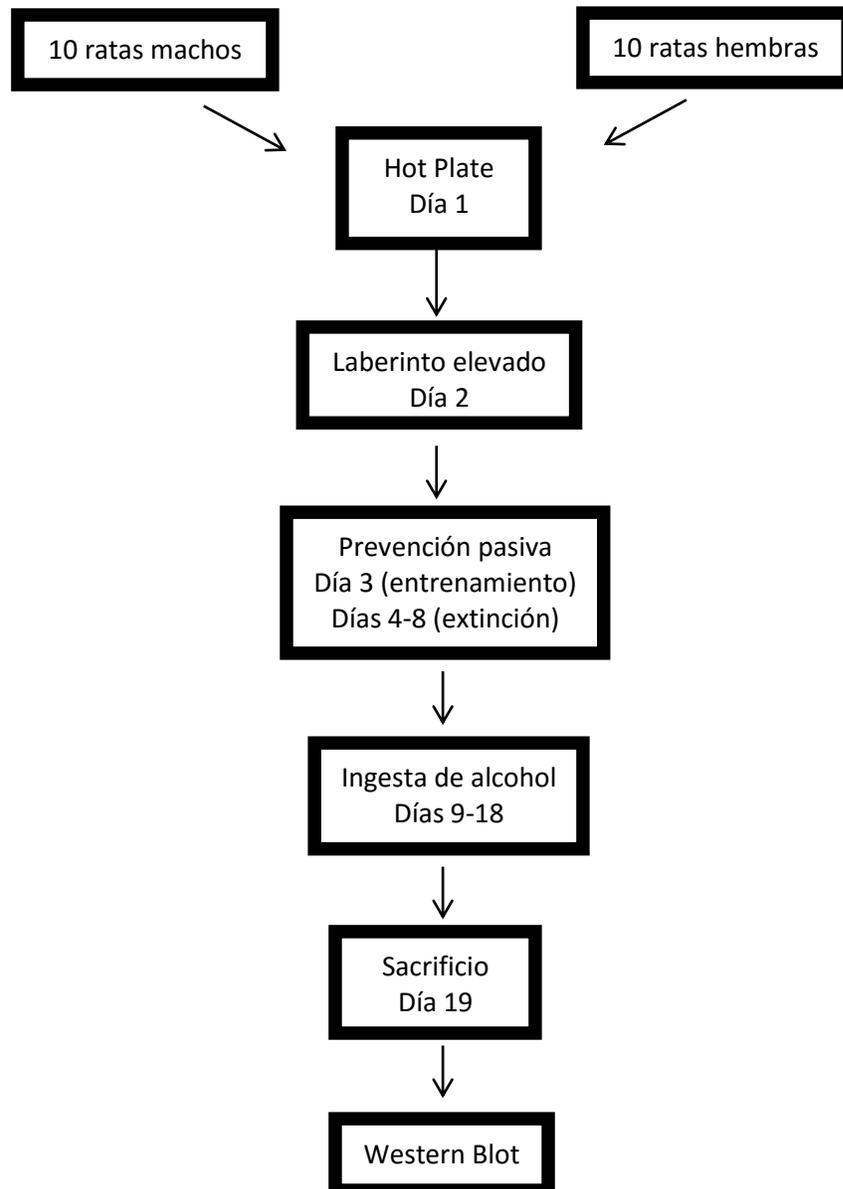


Figura 7. Representación esquemática de los protocolos experimentales que se llevarán a cabo.

Plancha caliente

Esta prueba se llevó a cabo en un cuarto iluminado con luz blanca en un entorno silencioso. Se colocó al sujeto en la plancha del Hot Plate a $50 \pm 0.2^\circ \text{C}$, rodeado por un cilindro transparente para evitar su escape. Se tomó el tiempo que pase hasta que presente signos de disconformidad como: brincos o lamidas de pata. El tiempo se tomó con un cronómetro provisto por el mismo Hot Plate, el cual se activa y desactiva por medio de un pedal. Una vez concluida la prueba, se regresó al sujeto a su caja correspondiente y fue devuelto al bioterio.

Laberinto elevado

Esta prueba se realizó en un lugar iluminado con luz blanca en un entorno silencioso. Se empleó una cámara para grabar los 5 minutos de duración de la prueba. Al inicio de la sesión, el sujeto se colocó en el centro del laberinto y se grabó su actividad. Si el sujeto caía del laberinto era regresado al centro del mismo. Una vez concluida la prueba, fue devuelto a su correspondiente caja y llevado al bioterio. Para separar a nuestras poblaciones en ansiosos/ansiosas y no ansioso/no ansiosas, tomamos como variable de agrupación a la conducta "Postura de atención estirada desprotegida" (por sus siglas en inglés uSAP), la cual consiste en el estiramiento de la parte delantera del sujeto y a su vez, el regreso a la posición inicial en el brazo abierto y la cual ha sido asociada a una conducta de ansiólisis en el laberinto elevado (Espejo, 1997a, Espejo 1997b). El punto de corte usado para agrupar a nuestras poblaciones fue la mediana (machos = 8 y hembras = 10.5). Todos los sujetos machos por debajo del punto de corte 8, eran agrupados en ansiosos mientras que por arriba se agruparon como no ansiosos. Con las hembras ocurrió lo mismo pero su punto de corte fue de 10.5, por debajo se agruparon como ansiosas y por arriba como no ansiosas. Una vez separados los grupos (machos ansiosos $n = 5$, machos no ansiosos $n = 5$, hembras ansiosas $n = 5$ y hembras no ansiosas $n = 5$) se obtuvieron las medias de ésta conducta para corroborar niveles diferentes de ansiedad, encontrándose diferencias significativas (ansiosos/no ansiosos $p < 0.001$ y ansiosas/no ansiosas $p < 0.05$) (Figura 31). Posteriormente se compararon las medianas (machos) y las medias del tiempo en brazos cerrados

entre ansiosos/no ansiosos y ansiosas/no ansiosas, encontrándose de igual forma diferencias significativas entre sus niveles de ansiedad ($p < 0.008$ machos y $p < 0.01$ hembras) (Figura 8) indicándonos que nuestra variable de agrupación fue adecuada, teniendo por lo tanto, dos indicadores de ansiedad para poder discriminar poblaciones.

Prevención pasiva

Para esta prueba se empleó el aparato de Prevención pasiva, el programa OmniAlva y una cámara OmniAlva.

La prueba consistió en dos fases:

Entrenamiento: los sujetos eran colocados en un compartimiento iluminado con una puerta levantada durante 10 segundos; transcurridos éstos, el programa OmniaAlva bajaba la puerta permitiendo el acceso al pasillo oscuro. El programa registraba el tiempo de latencia, es decir, tiempo total en el cual cruza completamente al pasillo oscuro, con el uso de sensores. Cuando hubieron cruzado el pasillo, la puerta se cerraba y una descarga eléctrica era dada durante 10 segundos. Transcurridos los 10 segundos, se bajaba la puerta permitiendo a los sujetos escapar y regresar al compartimiento iluminado. Una vez que se encontraban en el compartimiento iluminado, se dejó transcurrir 60 segundos de reposo. Al terminar la prueba, se regresó al sujeto a su caja correspondiente y a al bioterio.

Extinción: al día siguiente del entrenamiento, los sujetos fueron colocados en el compartimiento iluminado con la puerta levantada durante 10 segundos. Una vez transcurrido el tiempo, la puerta se bajaba con la ayuda del programa OmniaAlva y se comenzó a contar el tiempo de latencia con un cronómetro de mano y otro cronómetro provisto por el programa. El tiempo fue detenido cuando los sujetos ingresaban al compartimiento oscuro completamente (el cual ya no dio ninguna descarga). Si los animales no llegaban a cruzar el primer día de extinción al pasillo oscuro, se repetía el procedimiento 4 ocasiones más en los 4 días siguientes (una

fase de extinción por día) hasta que cruzara; teniendo como un máximo de 5 días de extinción.

Tanto la sesión de entrenamiento como de extinción, fueron grabados.

Al día siguiente de que transcurrieron los 5 días de extinción cruzaran o no todos los sujetos, se continuó con la fase de ingestión de alcohol.

Ingestión de alcohol

A las 8:00 hrs (cambio a la fase de oscuridad) se pesó a los sujetos experimentales al igual que su alimento. Se les proveyó a los sujetos de dos probetas: una contenía agua y la otra alcohol al 10%. Las probetas eran pesadas antes de ser colocadas en las cajas. Transcurridas 24 h, se pesaron a los sujetos junto con su alimento, agua y alcohol y se anotarán los pesos obtenidos. El sobrante de alcohol en las probetas era vaciado y rellenado de nuevo con alcohol, mientras que el agua se le reponía el líquido perdido, al igual que la comida. Este procedimiento se repitió en 9 ocasiones para tener un total de 10 mediciones, es decir, 10 días.

Western Blot

Al transcurrir los 10 días de medición, los sujetos fueron sacrificados por dislocación cervical. Esto ocurrió el siguiente día a la 1:00 am. Fueron extraídas dos regiones de interés: la Corteza Prefrontal y el Núcleo Accumbens. Una vez extraídas se guardaron en hielo y en un congelador a una temperatura de -80°C . Al día siguiente de haber sido extraídas, se homogenizaron las muestras (0.1 g tejido/1 mL) en una solución de buffer que contenía 250 nM sucrosa, 1nM EDTA, buffer con 10 nM Tris HCl, 10 nM PMSF, un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Mini 1 tableta/50 mL, Roche Diagnostic, Rotkreutz Switzerland). Los restos del tejido y fragmentos nucleares, fueron removidos en dos centrifugaciones (1000, 10 min, 4°C). Los supernadantes fueron recolectados y centrifugados (17,000g, 20 min, 4°C). Los pellets enriquecidos en membranas plasmáticas, fueron resuspendidos en una solución de buffer (85 μl). La concentración proteica se midió con un espectrofotómetro (NanoDrop ND 1000 V3.1.0 Thermo Fischer technology).

La fracción de la muestra plasmática (40-60 µg) fue separada electroforéticamente en SDS al 8-12% y electrobloteada en una membrana PVDF (milipore) la cual fue bloqueada con leche sin grasa (5%, Bio-Rad) en TBS-T (20nM Tris HCl, 136 nM NaCl, 01% Tween 20, pH de 7.6) por 1 hora a temperatura ambiente (25±2 °C). La membrana PVDF se incubó toda la noche con el anticuerpo policlonal de conejo para CB1 (1:1000) diluido en TBS-T a 4 °C. Las membranas se sometieron a 3 lavados de 10 minutos, cada uno, con TBS-T e incubados con el anticuerpo de burro secundario anticonejo IgG acoplado en suero de caballo (1-1000) en TBS-T por una hora. Los immunoblots se detectaron usando la detección de reagentes (Amersham Biosciences) y fueron expuestos a una película autorradiográfica (Kodak) entre 1-3 min. Para la detección de bandas se usó el programa ImageJ.

Análisis de resultados

Se utilizó el programa SPSS (versión 21) para el análisis estadístico. Para encontrar diferencias significativas entre dos grupos, ya sea macho o hembra, ansioso-no ansioso, o ansiosa-no ansiosa, en las pruebas de Plancha caliente, Laberinto elevado, Prevención Pasiva y expresión del receptor CB1, se utilizó un *t* – *student* y se utilizó un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se empleó una U- de Mann Whitney si los datos no tenían una distribución normal, y se usó el valor de $p < 0.05$ como significativo. Para llevar a cabo las correlaciones en las mismas variables, se utilizó el Coeficiente de Pearson utilizando el nivel de significancia de $p < 0.05$.

Para evaluar el consumo de alimento y agua se obtuvo un índice que reflejara la ingesta respecto al peso corporal de cada sujeto: gramos de alimento consumido / peso corporal (g) * 1000. Al obtener el índice de todos los sujetos, se promediaban por día y se obtenía el error estándar. En el caso del agua, se pesó los gramos de la probeta y se utilizó la misma fórmula: gramos de probeta (peso inicial-peso final) / peso corporal (g) * 1000. Para evaluar el consumo de alcohol, se ajustó la concentración del alcohol considerando una diferencia de densidad con el agua con la siguiente fórmula: $(1/0.982)*(10/100)*(0.8)$. Donde 1 corresponde a la densidad

del agua, 0.982 a la densidad del alcohol, 10/100 a la disolución al 10% y 0.8 a la densidad de la disolución al 10% al ser alcohol al 96%. Entonces, una vez restado el peso inicial al peso final se multiplicó por la fórmula para ajustar la densidad y el resultado obtenido se dividió por el peso corporal y multiplicado por 1000. Es decir $(p_i - p_f) * (1/0.982) * (10/100) * (0.8)$, Densidad ajustada (g) / peso corporal (g) * 1000.

Para analizar el consumo promedio por día de la ingesta de alimento, agua y alcohol, se utilizó una ANOVA de medidas repetidas y en caso de no cumplir con los criterios paramétricos (igualdad de varianzas principalmente) se empleó la prueba no paramétrica de Friedman. Se utilizó un nivel de significancia de $p < 0.05$. Cuando se encontraba una diferencia significativa, se utilizaba la prueba *post hoc* de Bonferroni, para la prueba paramétrica.

Resultados

La figura 8 nos muestra el tiempo total que pasaron machos y hembras en los brazos cerrados del laberinto elevado. De igual forma, cuando se agrupó a los machos y hembras por su nivel de ansiedad, encontramos diferencias significativas (figura 9).

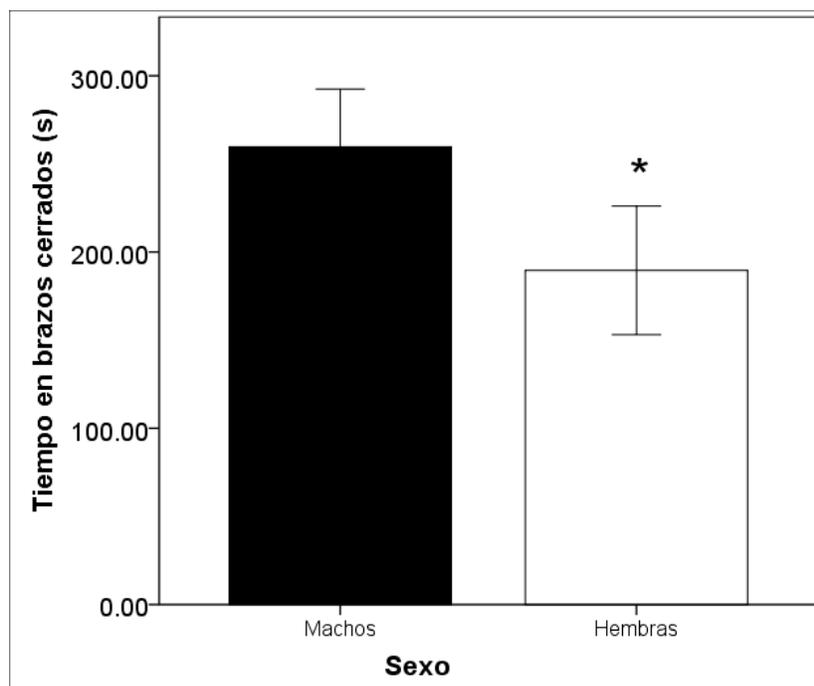


Figura 8. Tiempo en brazos cerrados en el laberinto elevado de machos (n=10) y hembras (n=10). Se observa una diferencia significativa ($p= 0.01$) en el tiempo empleado en los brazos abiertos por parte de los machos ($\bar{x}= 259.67$, Error típico=16.4) en comparación con las hembras ($\bar{x}=189.58$, Error estándar de la media = 18.25). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media.

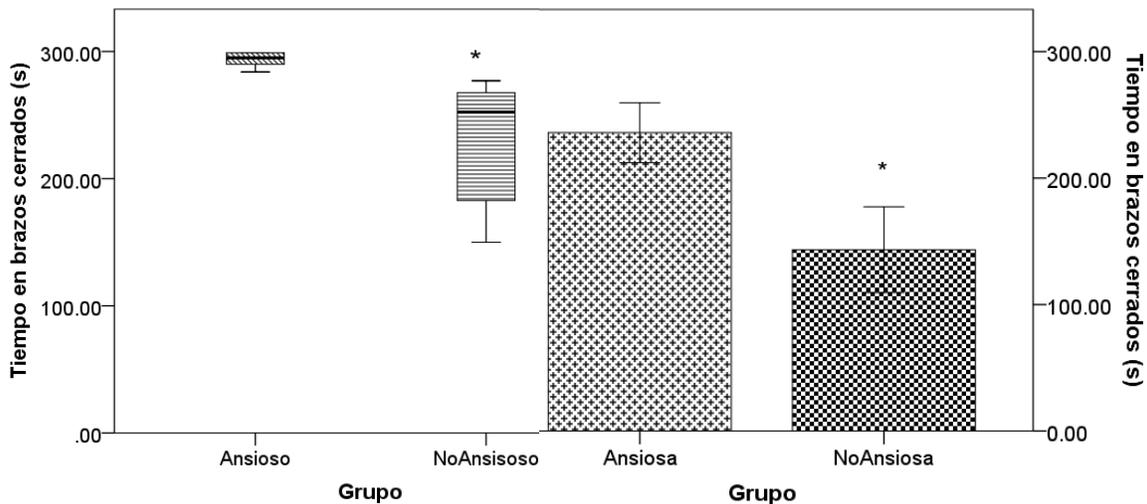


Figura 9. Tiempo en brazos cerrados en machos y hembras. Encontramos diferencias significativas entre los machos agrupados como ansiosos y no ansiosos ($p= 0.008$) y entre las hembras agrupadas como ansiosas y no ansiosas ($p= 0.01$) (imagen derecha). Para los machos, los datos se presentan como la mediana. Para las hembras los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media.

La correlación de Pearson mostró entre el tiempo en brazos cerrados (ansiedad) con la latencia al dolor (algasia), una posible asociación ya que se encontró una tendencia ($r= -0.565$, $p= 0.058$), en el grupo de las hembras (figura 10). Se encontró con el mismo tipo de análisis, una correlación negativa entre el tiempo en brazos cerrados y la expresión del receptor CB1 en la CPF en el grupo de las hembras ($r= -0.714$, $p< 0.02$ y $r^2 = 0.32$). Ver figura 11.

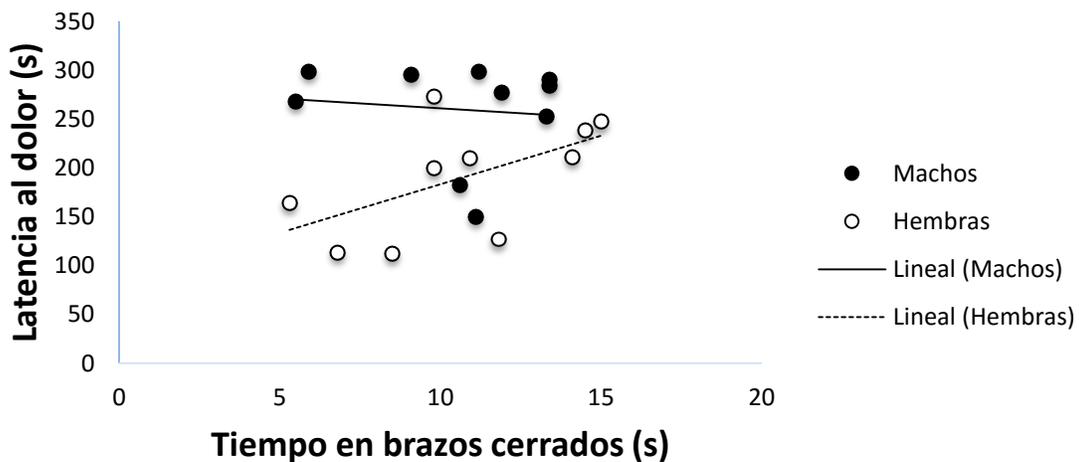


Figura 10. Correlación entre el tiempo en brazos cerrados y latencia al dolor en machos ($n=10$). Observamos una tendencia ($p= 0.089$) hacia una correlación negativa ($r = -0.565$) en las hembras. En los machos no encontramos correlación ($r= 0.112$, $p= 0.754$).

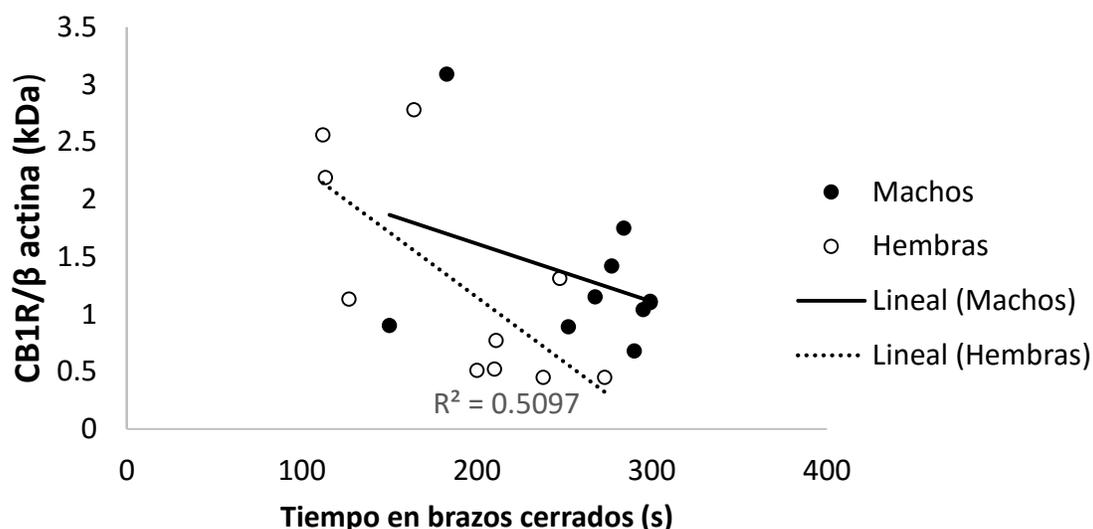


Figura 11. Correlación entre el tiempo en brazos cerrados y la expresión del receptor CB1 en la CPF en machos ($n=10$) y hembras ($n=10$). Observamos una correlación negativa en las hembras ($r=-0.714$, $p<0.02$), en los machos no hubo correlación alguna ($r=0.379$, $p<0.280$).

No se encontró correlación tanto en machos ($r=0.415$, $p<0.232$) como en hembras ($r=0.436$, $p<0.207$) entre la expresión del receptor CB1 en el NAcc y el tiempo en brazos cerrados (ver Figura 12). Tampoco hubo en machos ($p<0.108$) ni en hembras ($p<0.116$) una correlación entre uSAP y el consumo de alcohol.

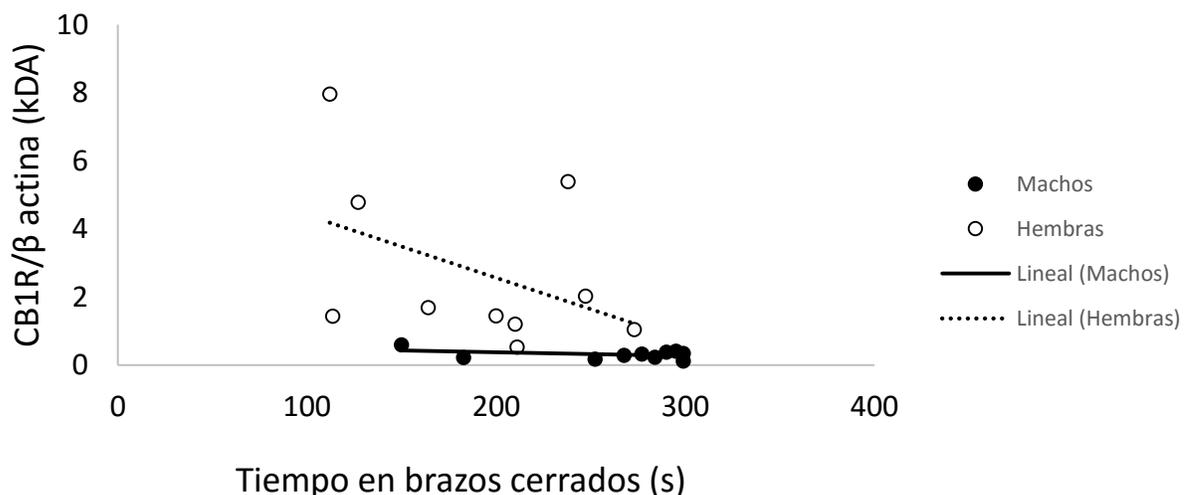


Figura 12. Correlación entre el tiempo en brazos cerrados y la expresión del receptor CB1 en el NAcc en machos ($n=10$) y hembras ($n=10$). No se observa correlación en los machos ($r=-0.419$, $p=0.232$) ni en las hembras ($r=-0.436$, $p=0.207$).

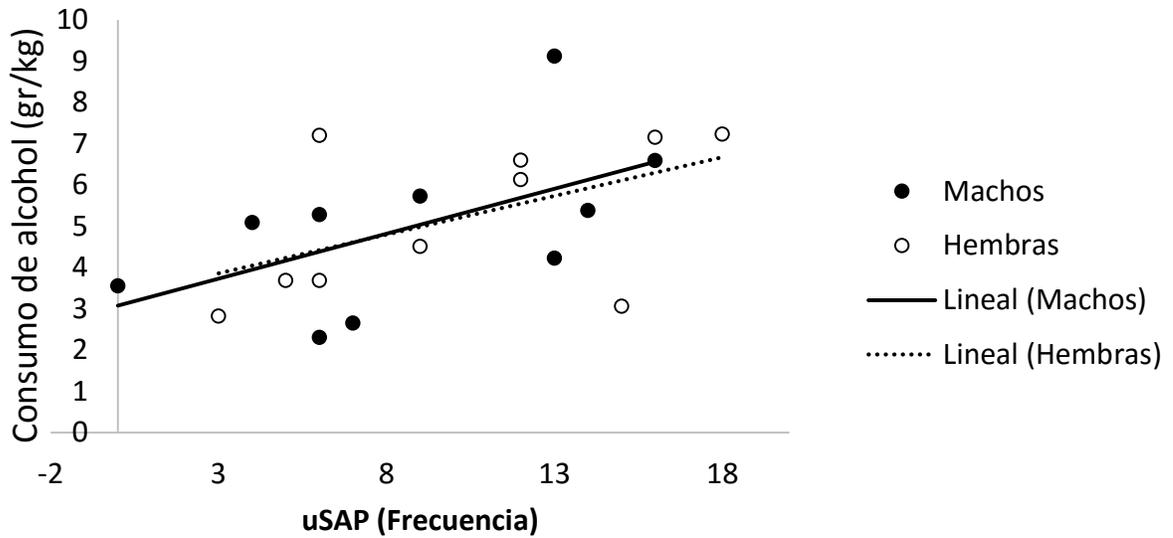


Figura 13. Correlación entre uSap y consumo de alcohol en machos (n=10) y hembras (n=10). No se encontró significancia en los machos, ($r= 0.538$, $p= 0.118$) ni en las hembras ($r= 0.529$, $p= 0.116$).

En la figura 14 se observa la algia tanto en machos como en hembras. Al hacer un *t-student*, no vemos significancia entre ambos grupos ($p= 0.937$).

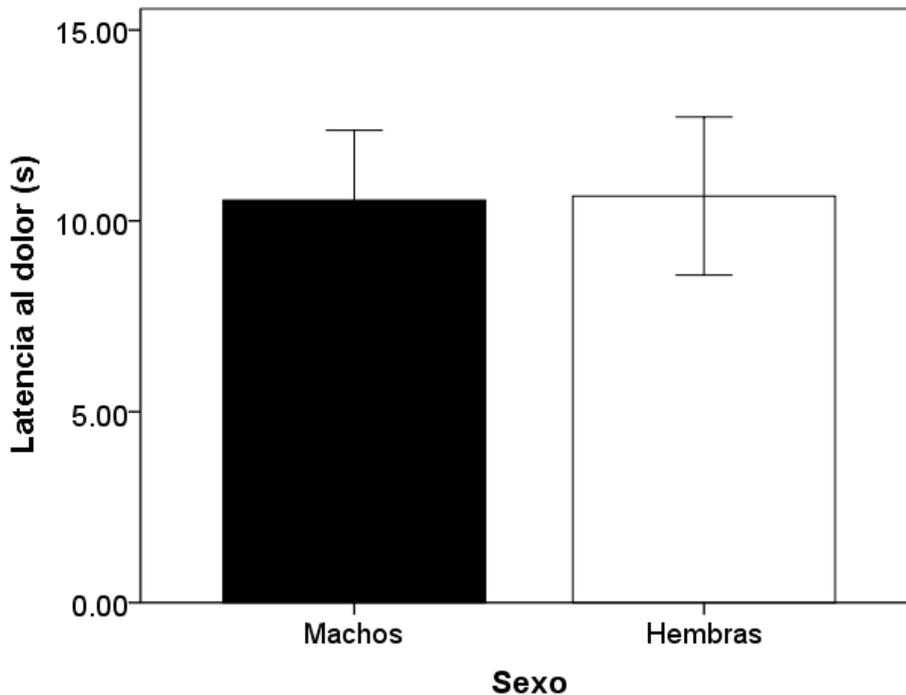


Figura 14. Latencia al dolor en machos (n=10) y hembras (n=10). No se observan diferencias significativas entre machos ($\bar{x} = 10.54$, Error estándar= 0.91) ni hembras ($\bar{x}= 10.65$, Error estándar= 1.03). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media.

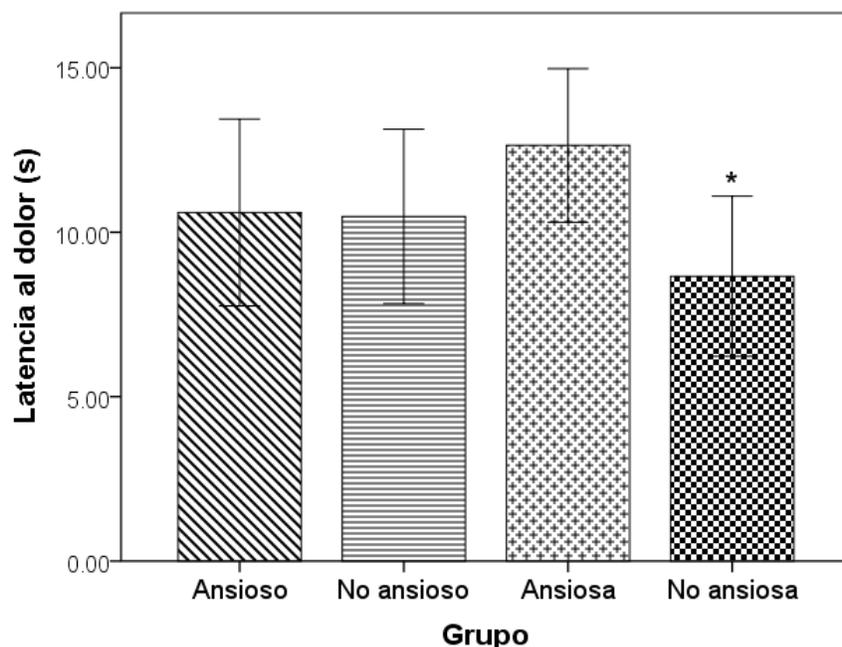


Figura 15. Latencia al dolor agrupados en ansiosos (n=5), no ansiosos (n=5), no ansiosas (n=5) y ansiosas (n=5). No se observan diferencias entre los machos ($p= 0.952$) no obstante, las hembras no ansiosas presentaron una menor latencia al dolor comparadas con las ansiosas ($p= 0.046$). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media.

Cuando se separan por su nivel de ansiedad, y realizar una *t-student* intragrupo, no se observa una diferencia significativa entre los machos ($p= 0.952$), sin embargo, en las hembras si encontró una diferencia significativa ($p= 0.046$). Ver Figura 15. En la figura 16 se muestra una correlación negativa ($r = -0.671$, $p= 0.034$, $r^2 = 0.45$) en las hembras entre la algesia y la expresión del receptor del CB1 en la CPF. En los machos no se observa esta misma correlación ($r= 0.017$, $p= 0.963$). En la Figura 17 no se encontró una correlación entre la algesia con la expresión del receptor CB1 en el Nacc (machos $r= -0.143$, $p= 0.963$, hembras $r= 0.047$, $p= 0.897$).

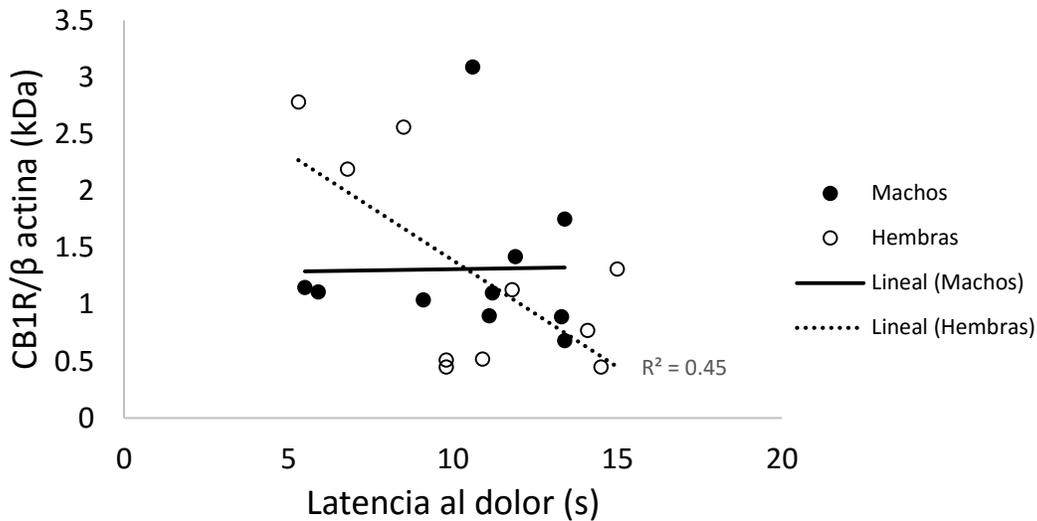


Figura 16. Correlación entre la latencia al dolor y la expresión del receptor CB1 en la CPF en machos (n=10) y hembras (n=10). Observamos una correlación negativa en las hembras ($r= -0.671$, $p= 0.034$), en los machos no vemos correlación ($r= 0.017$, $p= 0.963$).

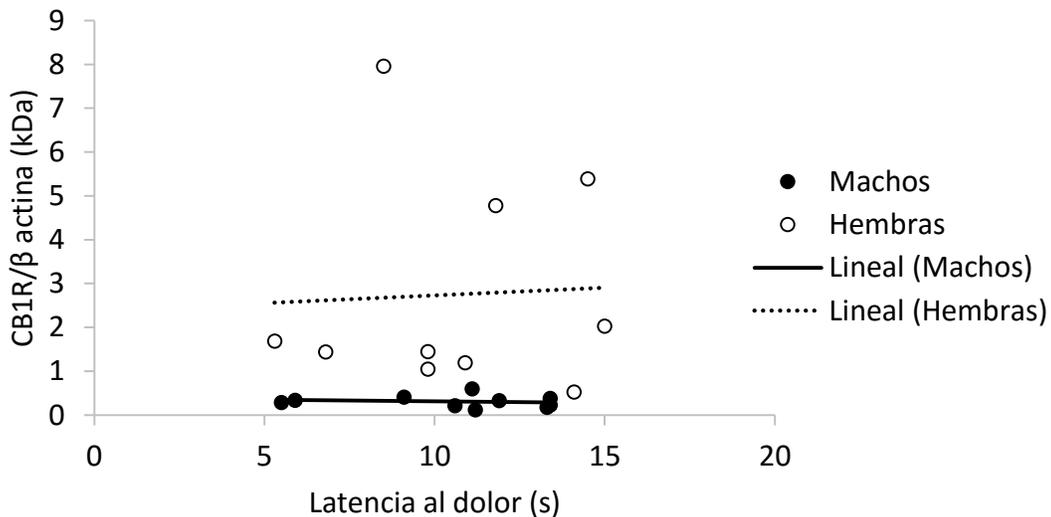


Figura 17. Correlación entre la latencia al dolor y la expresión del receptor CB1 en el Nacc en machos (n=10) y hembras (n=10). No se observa correlación en machos ($r= -0.143$, $p= 0.963$) ni en hembras ($r= 0.047$, $p= 0.897$).

La expresión del receptor CB1 en la CPF no es diferente en los machos ($p= 0.451$) al ser agrupados por su nivel de ansiedad, sin embargo, en las hembras hay una tendencia ($p= 0.058$), cuando son agrupadas por su nivel de ansiedad. (Ver Figura 18).

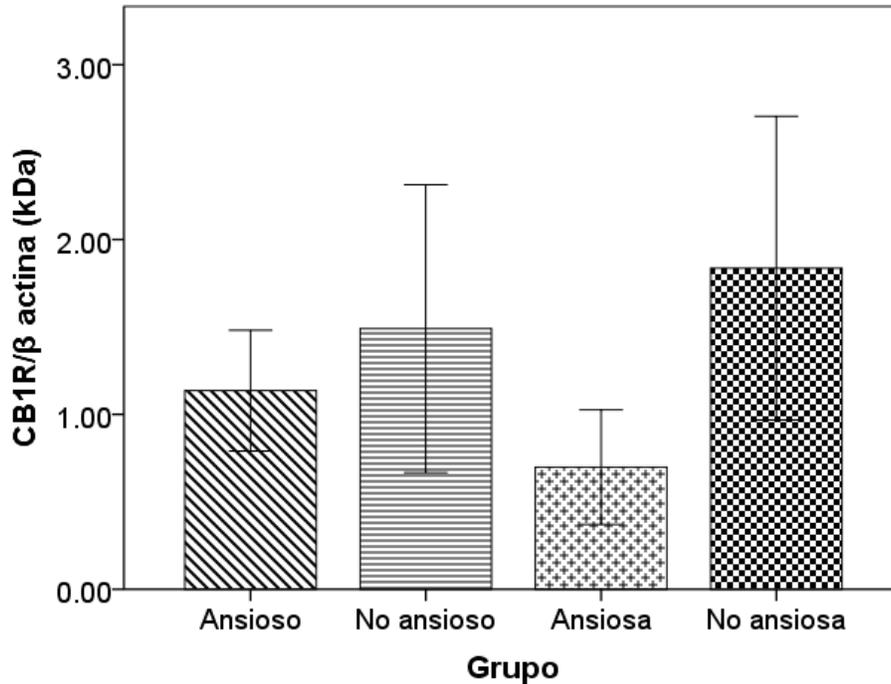


Figura 18. Expresión del receptor CB1 en la CPF en machos y hembras agrupados por ansiosos (n=5), no ansiosos (n=5), ansiosas (n=5) y no ansiosas (n=5). No se observan diferencias significativas en la expresión del receptor entre los machos ($p=0.451$), sin embargo en las hembras vemos una tendencia ($p=0.058$). Los datos son presentados como la media \pm error estándar de la media.

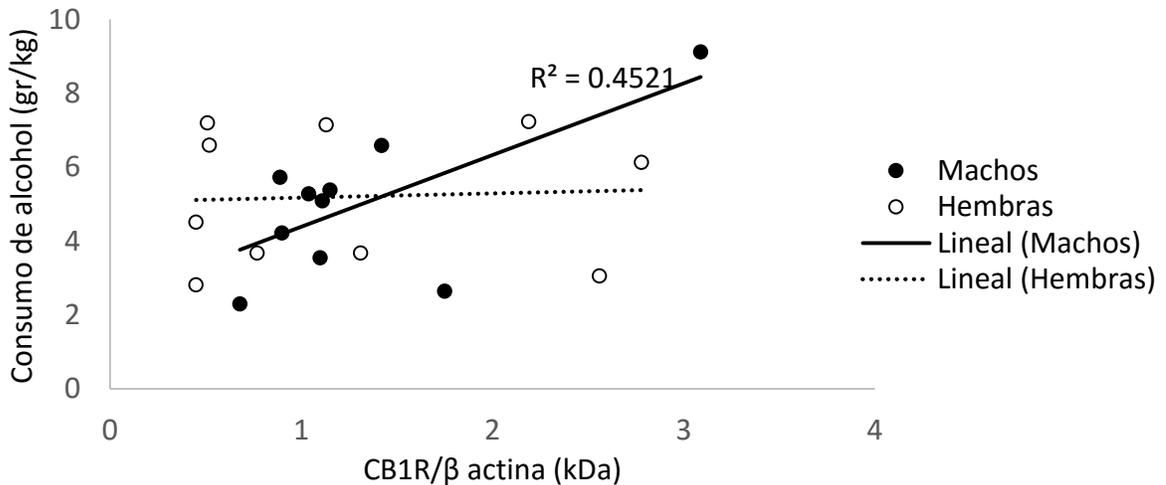


Figura 19. Correlación entre la expresión del receptor CB1 en la CPF y consumo de alcohol. Se observa una correlación positiva ($r=0.673$, $p=0.033$) entre la expresión del receptor CB1 en la CPF y consumo de alcohol en los machos, mientras que en las hembras no hay correlación alguna ($r=0.058$, $p=0.873$).

El consumo de alcohol en los machos parece tener una correlación positiva ($r=0.673$, $p<0.033$, $r^2=0.45$) con la expresión del receptor CB1 en la CPF, es decir, a mayor expresión del receptor, más consumo de alcohol. En las hembras parece no haber correlación alguna ($p=0.873$) (Figura 19). En la Figura 20 se encuentra la

expresión del receptor CB1 en el Nacc en machos y hembras agrupados por su nivel de ansiedad. No observamos diferencia alguna intragrupo de la expresión de éste receptor (machos $p= 0.767$, hembras $p= 0.387$). De igual forma, no hay correlación alguna entre éste receptor y el consumo de alcohol en machos ($p= 0.684$) y hembras ($p= 0.221$). (Ver Figura 21).

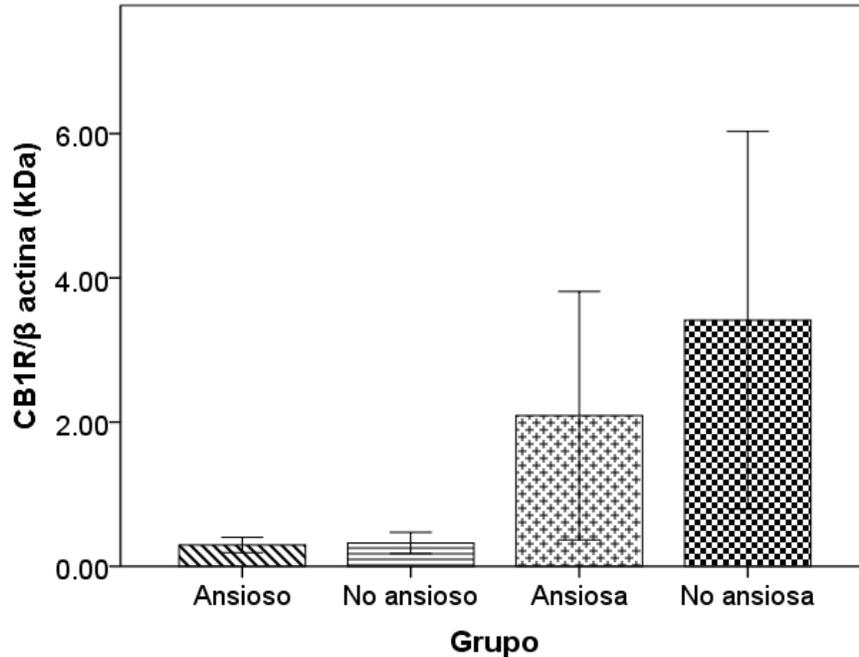


Figura 20. Expresión del receptor CB1 en el Nacc en machos y hembras agrupados en ansiosos (n=5), no ansiosos (n=5), ansiosas (n=5) y no ansiosas (n=5). No se observan diferencias significativas intragrupo (machos $p= 0.767$ y hembras $p= 0.387$). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media.

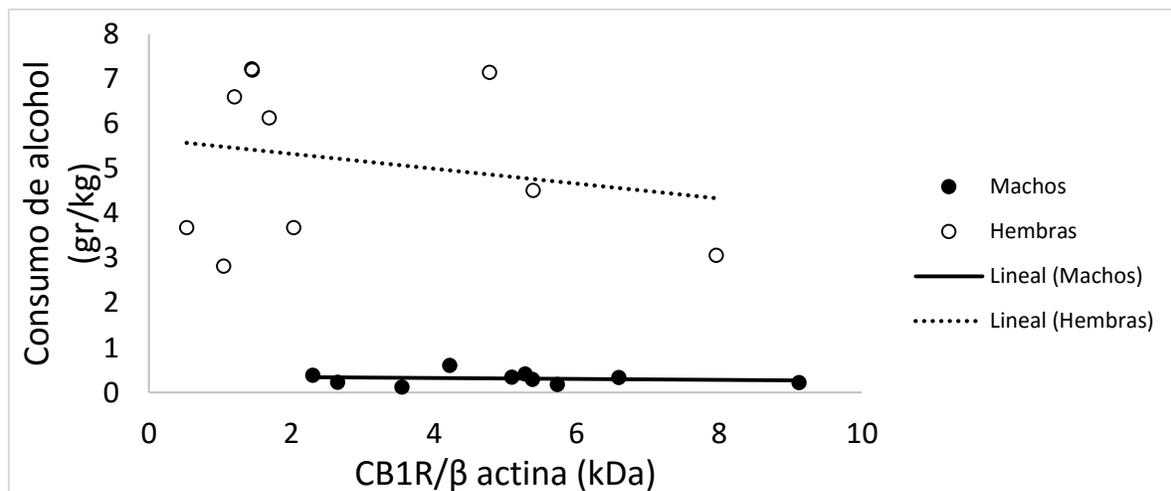


Figura 21. Correlación entre la expresión del receptor CB1 en el Nacc y el consumo de alcohol en machos (n=10) y hembras (n=10). No se encontraron correlaciones en ninguno de los grupos (machos $r= -0.147$, $p < 0.684$ y hembras $r= -0.221$, $p < 0.221$).

No se encontró alguna correlación entre la expresión del receptor CB1 en el Nacc y la algesia en machos ($r = -0.143$, $p = 0.693$) y hembras ($r = 0.047$, $p = 0.897$). (Figura 22).

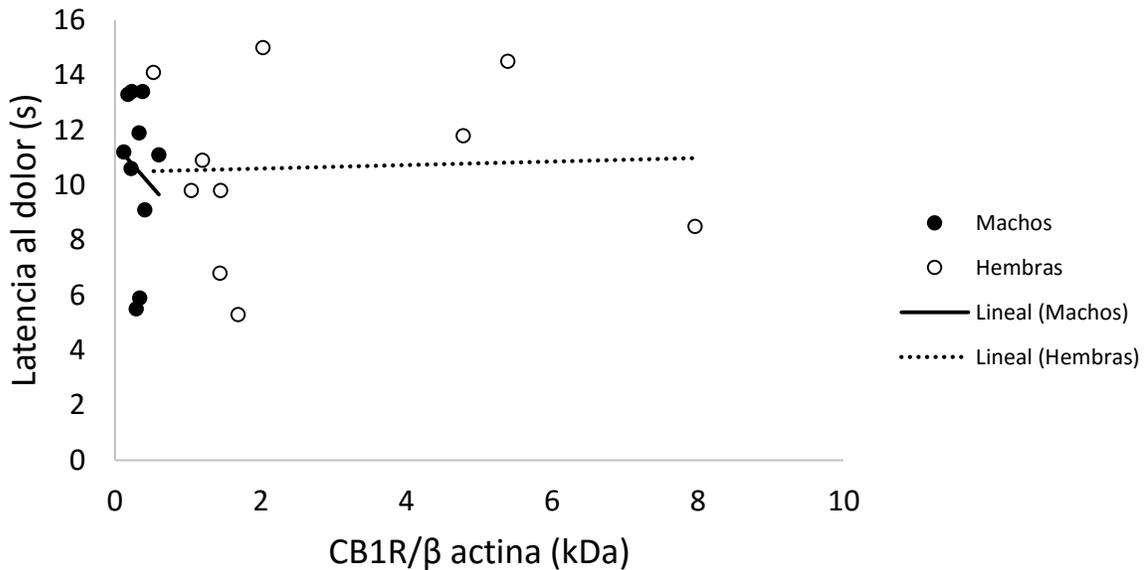


Figura 22. Correlación entre la expresión del receptor CB1 en el Nacc y la latencia al dolor en machos ($n=10$) y hembras ($n=10$). No se observan correlación alguna en ambos grupos (machos $r = -0.143$ $p = 0.693$, hembras $r = 0.047$ $p = 0.897$).

Durante los 10 días de consumo de alcohol, se registró el peso, consumo de alimento y agua. En la figura 23 se observa el peso en los machos, donde se halló un incremento significativo de su peso, ($F_{(9,80)} = 65.092$, $p < 0.000$). La prueba *post hoc* reveló que el incremento significativo se dio a partir del tercer día en comparación con el primer día ($p = 0.01$). Por otro lado, las hembras reportaron un incremento significativo de su peso ($F_{(9,80)} = 5.380$, $p < 0.000$), sin embargo, después de la prueba *post hoc*, no se encontró alguna diferencia en ninguno de los días ($p > 0.05$ en todos los días). De igual forma, en la Figura 24 se muestra el consumo promedio de comida por día en machos donde no hubo diferencias significativas ($F_{(9,80)} = 1.494$, $p = 0.164$) y hembras donde tampoco se encontró una diferencia significativa en ningún día ($p = 0.165$).

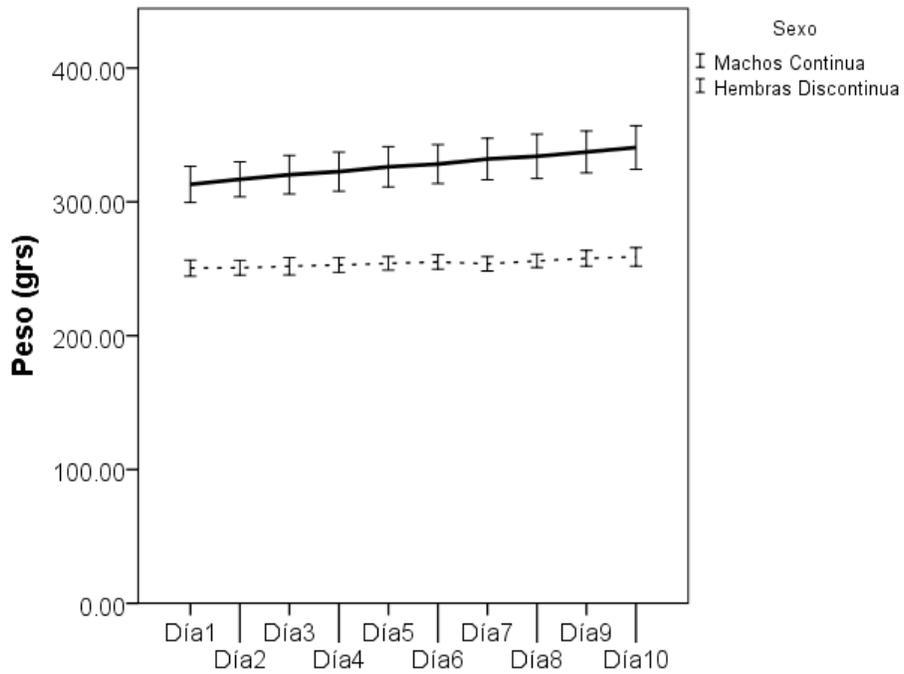


Figura 23. Peso de las ratas machos (n=10) y hembras (n=10) durante los 10 días de consumo de alcohol. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media.

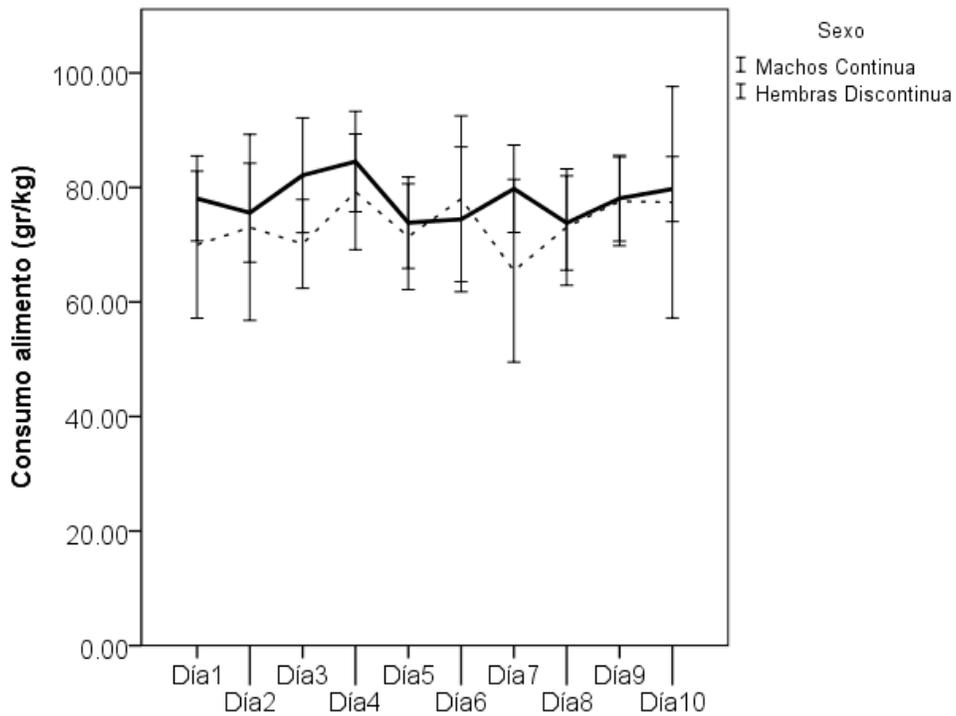


Figura 24. Consumo de alimento de machos (n=10) y hembras (n=10) durante los 10 días de consumo de alcohol. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media.

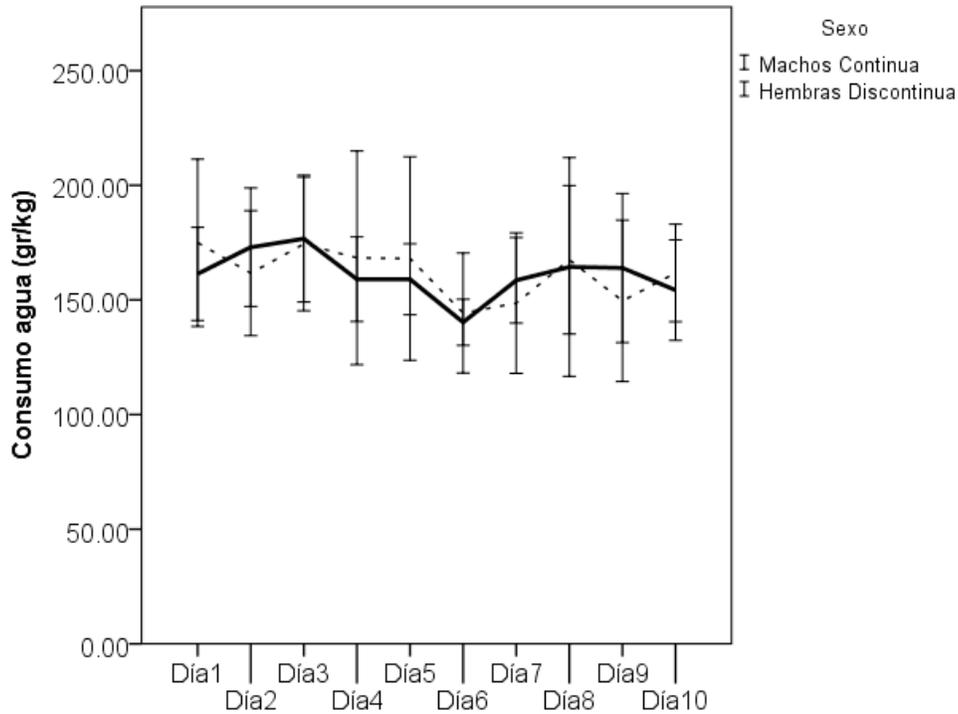


Figura 25. Consumo de agua en machos (n=10) y hembras (n=10) durante 10 días de consumo de alcohol. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media.

El consumo de agua promedio de agua (Figura 25), tomando en cuenta el agua de la botella con el alcohol diluido al 10% no mostraron diferencias significativas en machos ($F_{(9,80)}=0.667$, $p= 0.737$) y hembras ($p= 0.628$).

No se hallaron diferencias significativas en el consumo de alcohol durante los 10 días de medición en los machos ($p= 0.436$) ni en las hembras ($p= 0.165$) (Figura 26). Tampoco hubo una diferencia significativa ($p= 0.804$) en el consumo de machos y hembras en promedio por día (Figura 27).

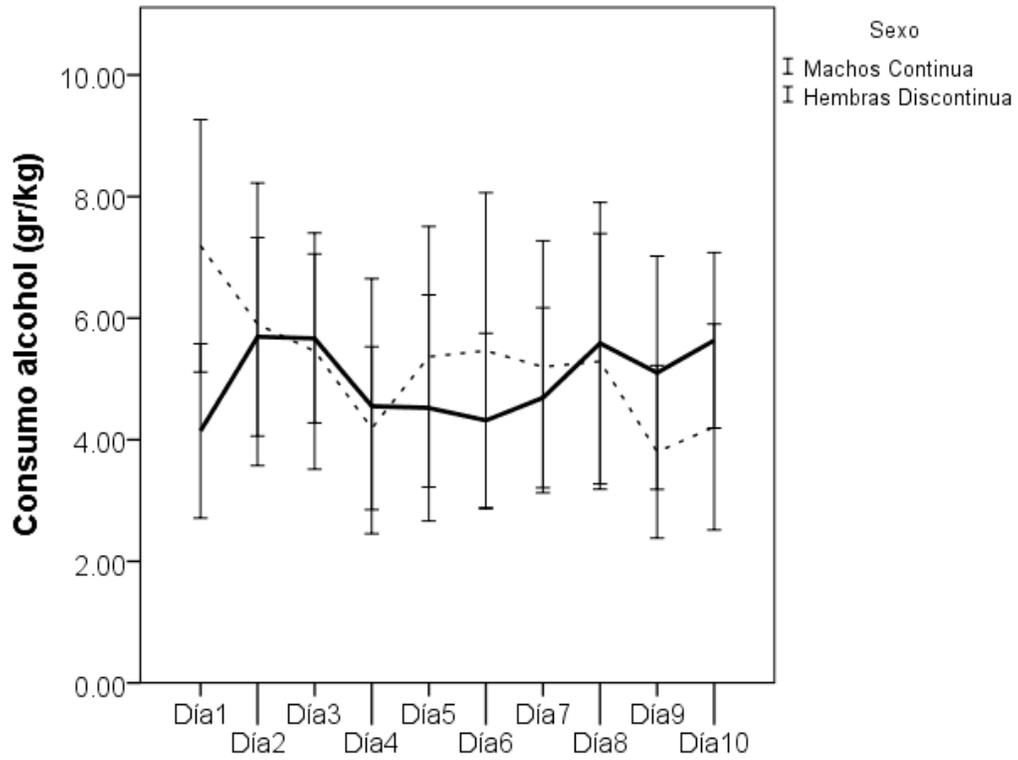


Figura 26. Consumo de alcohol en machos (n=10) y hembras (n=10) durante 10 días. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media.

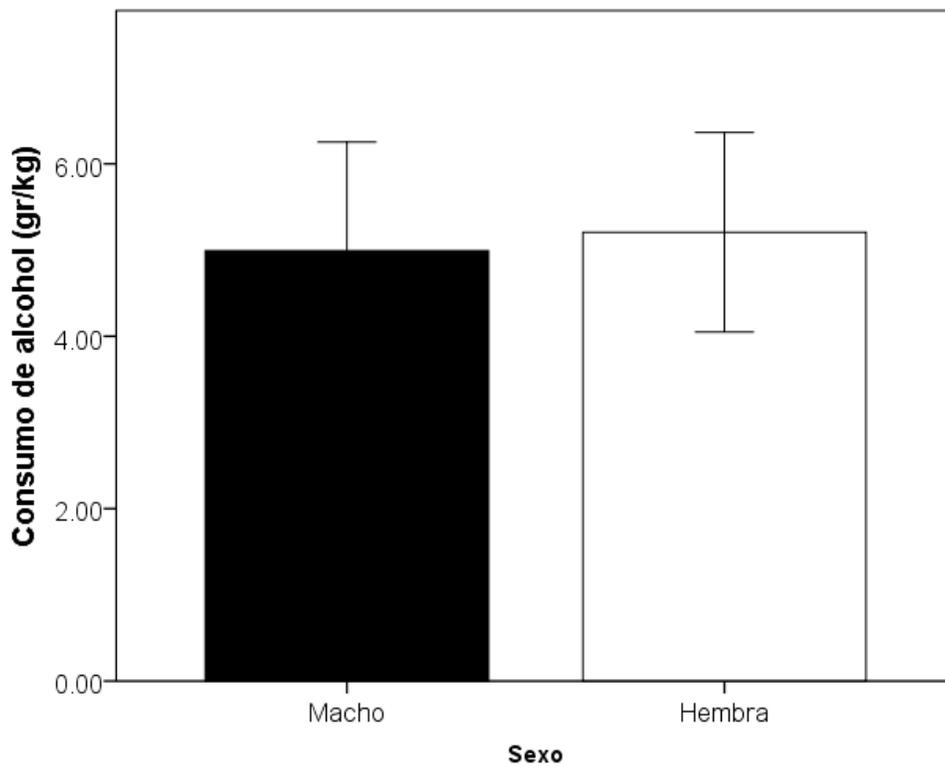


Figura 27. Consumo promedio de alcohol por día en machos (n=10, \bar{x} = 4.99 y Error estándar= 0.63) y hembras (n=10, \bar{x} = 5.2 y Error estándar= 0.63). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media.

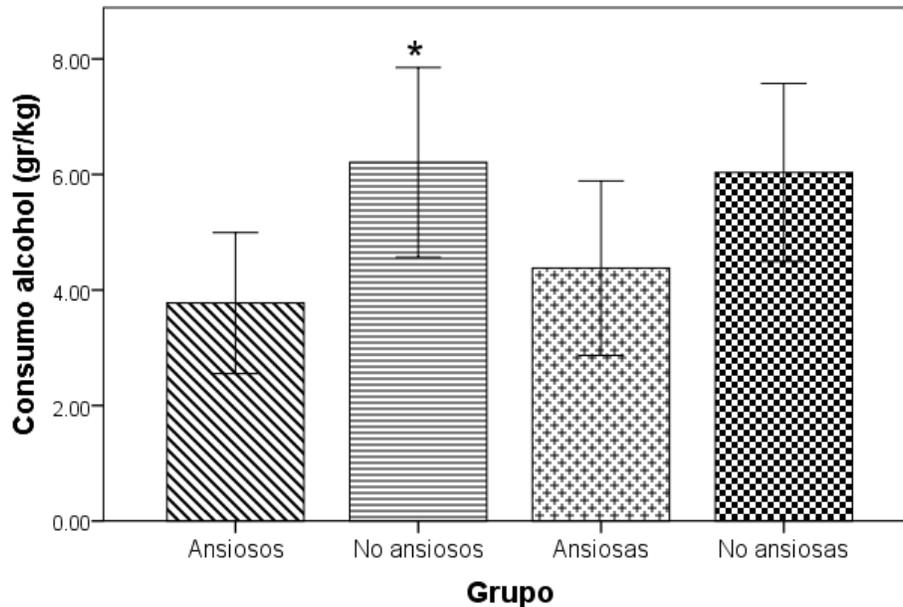


Figura 28. Consumo de alcohol en promedio de los días en machos y hembras agrupados por su nivel de ansiedad (ansiosos n=5, no ansiolos n=5, ansiosas n=5 y no ansiolas n=5). Se encontró una diferencia significativa entre los ansiosos y no ansiosos ($p= 0.045$), en las hembras no hubo diferencia alguna ($p= 0.102$). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media.

Se encontró una diferencia significativa en el consumo de alcohol, dentro el grupo de machos catalogados como no ansiosos ($p= 0.045$), mientras que en las hembras no hubo diferencia significancia entre ansiosas y no ansiosas ($p= 0.163$)

Tabla 2. Muestras representativas de las bandas del receptor CB1 y las β actinas en machos y hembras en la corteza prefrontal. Las bandas superiores, tanto en machos como en hembras, se observa la expresión del receptor CB1 en la CPF. Las bandas inferiores, nos muestra la expresión de una proteína control, contra las cuales se comparan las primeras para obtener un índice (ver figura 18).

Corteza Prefrontal			
Machos		Hembras	
CB1R 52kDa		CB1R 52kDa	
β actina		β actina	

Tabla 3. Muestras representativas de las bandas del receptor CB1 y las β actinas en machos y hembras en el núcleo accumbens. Las bandas superiores, tanto en machos como en hembras, se observa la expresión del receptor CB1 en el NAcc. Las bandas inferiores, nos muestra la expresión de una proteína control, contra las cuales se comparan las primeras para obtener un índice (ver figura 20).

Núcleo Accumbens			
Machos		Hembras	
CB1R 52kDa		CB1R 52kDa	
β actina		β actina	

Discusión

El objetivo de la presente tesis, fue correlacionar en machos y hembras la expresión del receptor CB1 en la CPF y el NAcc con la ansiedad, el dolor y la ingesta de alcohol con el fin de ampliar el conocimiento acerca de su participación en dichos procesos. Es importante resaltar el hecho de haber utilizado sujetos intactos y sin el empleo de fármacos (a excepción del alcohol, para evaluar su consumo) para evaluar su conducta espontánea. La importancia de haber empleado a sujetos intactos radica en que en la literatura existe una gran cantidad de experimentos que evalúan la ingesta de alcohol, la ansiedad o el dolor, junto con el sistema endocannabinérgico, pero con la administración de algún fármaco (ya sea agonista o antagonista al receptor CB1), manipulación genética (ratones *knock out*), o privación de alimento, entre otros factores, que modifican su conducta espontánea. En este sentido, nos referiremos a conducta espontánea como a aquella que se presentaría de una manera natural en los ambientes expuestos y no es afectada por factores externos específicos, como los anteriormente mencionados. Es decir, cuando se evaluó la ansiedad en el laberinto elevado, se trató de que fuera una conducta lo más libre posible de factores externos que pudieran modificarla, como pudo haber sido la administración de un agonista o antagonista al receptor CB1. Por otro lado, el trabajar con ratas hembras puede generar ciertos problemas debido a su ciclo estral; sin embargo, el empleo de hembras ovariectomizadas podría modificar su conducta al cambiar drásticamente sus niveles hormonales y de ésta manera no se obtendría una conducta espontánea como la deseada.

Estos experimentos intentaron demostrar una correlación negativa entre el consumo de alcohol y la expresión del receptor CB1 tanto en el grupo de los machos y hembras, pero la correlación se dio en el sentido inverso en el grupo de los machos, apuntando que a mayor expresión del CB1 en la CPF hay una mayor ingestión de alcohol (Figura 19). La hipótesis se había planteado de esta manera porque Romano et al, (2015) habían reportado un mayor consumo de alcohol en sujetos con una menor expresión del receptor CB1 en la CPF, no obstante, éstos sujetos experimentales también presentaban una mayor expresión del receptor CB1

en el Nacc, y por lo tanto no necesariamente se contrapone a lo reportado en este trabajo.

De hecho, nuestros resultados también están en desacuerdo con los de Romano et al, (2015) ya que tampoco encontramos una correlación entre la expresión del receptor CB1 en el Nacc y el consumo de alcohol (Figura 24). Con todo en el estudio de Romano *et al.* (2015), las ratas habían sido sometidas a periodos de separación materna, y mostrando en la adultez afectación en distintos sistemas como el dopaminérgico, en especial a los receptor D₂ y D₃ así como también al eje Hipófisis-Pituitaria-Adrenal. Como se mencionó anteriormente, en este trabajo se evaluó la conducta de ingesta de alcohol y la expresión del receptor sin manipulación alguna, a diferencia de los estudios donde se observó la participación del sistema endocannabinérgico y la ingesta de alcohol (Gallate 1999; Wang et al 2003; Colombo et al 2005; Economidou et al, 2006; Blednov et al, 2007; Dyr et al., 2008), no necesariamente están en contradicción con los datos obtenidos al no encontrar correlación alguna entre la ingesta de alcohol y la expresión del receptor en el NAcc. Se menciona esto porque a pesar de que los agonistas al receptor CB1 incrementan la ingesta de alcohol y los antagonistas la disminuyen, se esperaría encontrar una correlación positiva entre la ingesta de alcohol y la expresión del receptor CB1 en el Nacc, una de las principales estructuras relacionadas con la adicción (Nestler, 2005). Entonces, una explicación probable haría referencia al hecho de que el sistema endocannabinérgico es necesario pero no suficiente para llevar a cabo los efectos reforzantes y sería necesario la participación de otros sistemas como el opioidérgico, el cual presentan una interacción con el sistema endocannabinérgico y se ha observado, por ejemplo, que la administración de THC puede activar este sistema (Mason et al 1999; Welch & Eads, 1999). Como se vio en el apartado 2.2, ambos sistemas son importantes en los efectos reforzantes de una droga.

Se planteó también que mientras más expresión del receptor CB1 en la CPF, menos ansiedad. Los resultados arrojaron una correlación negativa entre la ansiedad y la expresión del receptor en la CPF en hembras, sin embargo, en los

machos no se encontró correlación alguna (Figura 11). Entonces, el hecho de existir una correlación negativa entre dichas variables (en las hembras) podría sugerir que una mayor expresión del receptor en la CPF puede llevar a la baja a la ansiedad. Esto concuerda con lo reportado por Martin *et al* (2012) en sujetos *Knock out* a CB1 que presentaron mayores niveles de ansiedad en comparación con los sujetos silvestres, es decir, parece ser que cuando se carece del receptor CB1, los sujetos presentaron una mayor ansiedad, como si la ausencia de dicho sistema pudiera incrementar la ansiedad al no tener un sistema de inhibición, como lo es el sistema endocannabinérgico. Los estudios hechos por Sowards y Sowards (2003) y Vertes (2006) muestran una mayor activación de la CPF durante la ansiedad, entonces aunado a lo encontrado en éste trabajo, se podría sugerir que el receptor CB1 al ser activado en la CPF podría disminuir la actividad de la CPF y así, disminuir la ansiedad en el sujeto. Entonces, ésta información junto con la aportado por Lu *et al* (1996), Grachev *et al* (2002) y Xie *et al* (2004), parecerían indicar que una sobreactivación de la CPF lleva a la alta una conducta ansiosa y por lo tanto, una inhibición de la región por la activación de los receptores CB1 en disminuiría la ansiedad, tal como ocurre con la activación de los receptores D₂.

Otra hipótesis fue que se esperaba encontrar una correlación positiva entre la expresión del receptor CB1 en el NAcc y la ansiedad. En la Figura 12 se encontró una correlación negativa entre la expresión del receptor en el NAcc y la ansiedad, sin embargo, solo la observamos cuando agrupamos tanto a machos como hembras (información no mostrada). Esto podría significar que es necesario incrementar la n para muy probablemente alcanzar la significancia necesaria. No obstante, el encontrar esta correlación como grupo poblacional, nos podría indicar que a pesar del sexo, la expresión del receptor en el NAcc estaría relacionada con la ansiedad. Se planteó esta relación entre el NAcc y la ansiedad, dada su conexión directa con el hipocampo ventral (Friedman *et al* 2002), una región que al ser dañada provoca una disminución en conductas relacionadas a la ansiedad, es decir, produce efectos ansiolíticos (McHugh *et al* 2004) también por su estrecha relación con la CPF, otra región implicada en la ansiedad y además por su interacción que mantiene con la amígdala, donde se ubica el NCET (ver capítulo 3.2).

Otra hipótesis apuntaba a encontrar una correlación positiva entre la analgesia y una mayor expresión del receptor CB1 en la CPF. Sin embargo, encontramos una correlación negativa en el grupo de las hembras, es decir, mientras más receptor CB1 en la CPF menos analgesia (Figura 16). Estos resultados podrían ir en contra de lo observado en la Figura 6, donde los endocannabinoides tienen un papel en la disminución del dolor a través de la inhibición del nociceptor y además en sentido opuesto de lo reportado por Sheng *et al* (2009) quienes encontraron una disminución del dolor con la administración de un agonista a los receptores D₂, un receptor que al igual que el CB1 están acoplados a una proteína G_i, es decir muy probablemente llevaría a la baja la actividad del sistema. Como se observó en el capítulo de Neurobiología del dolor, una subregión de la CPF involucrada en el dolor es la COV. Parece ser que cuando las neuronas GABAérgicas son inhibidas por una activación opiácea en dicha región, hay una activación de la SGP y ocurre una disminución del dolor (Xie et al., 2004). Entonces, al no encontrar una correlación positiva entre la expresión del receptor CB1 en la CPF y la analgesia, y por el contrario, encontrar una correlación negativa en las hembras podría indicar que la activación del receptor CB1, a diferencia de la activación opiácea, llevaría a la alta la algesia, inhibiendo por ejemplo la actividad opiácea e impidiendo la activación de la SGP vía COV. No obstante, y como se comentó, esta correlación se presentó sólo en el grupo de las hembras, lo cual podría sugerir que en el grupo de los machos, no estaría involucrado éste sistema, o necesitaría de la participación de otro sistema, como el dopaminérgico u opiáceo.

La última hipótesis trataba de encontrar una correlación negativa entre la expresión del receptor CB1 en el NAcc y el dolor. No se encontró correlación entre ambas variables en ninguno de los grupos (Figura 17). Esta hipótesis había sido planteada porque el incremento de la dopamina en el NAcc parece llevar a la baja el dolor (Altier & Stewart, 1999) y una lesión en el AVT, una de sus principales aferencias dopaminérgica (Sotres et al., 2001) puede incrementar el dolor y por lo tanto, como la activación de los receptores CB1 pueden incrementar la dopamina en el NAcc, parecía tener sentido la idea de que una mayor expresión del receptor CB1 en el NAcc correlacionaría positivamente con la disminución del dolor.

Como ya se mencionó el objetivo de este trabajo era encontrar una correlación entre el consumo de alcohol, la ansiedad, el dolor y la expresión del receptor CB1 en la CPF y NAcc. Sin embargo, también se realizaron otros análisis estadísticos como la correlación a las distintas variables entre sí (ansiedad-dolor, ansiedad-consumo de alcohol, consumo de alcohol-dolor) y una comparación de los resultados obtenidos entre machos y hembras en las distintas pruebas.

Por otro lado, se agrupó tanto al grupo de los machos y hembras en ansiosos/ansiosas y no ansiosos/no ansiosas, con la finalidad de separar posibles poblaciones y observar si alguna variable se modificaría al separar las poblaciones (Ver anexo).

En la Figura 8 observamos la media de los tiempos que pasaron tanto el grupo de los machos y hembras en los brazos cerrados. Como bien se sabe, a mayor tiempo en los brazos cerrados es un indicador de mayor ansiedad. En este sentido, se encontró una diferencia significativa entre el grupo de los machos y hembras, siendo las hembras menos ansiosas. En la Figura 9 se encontró una diferencia significativa en la ansiedad. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Zimmerberg y Farley (1993) quienes encontraron que las hembras pasaron más tiempo en los brazos abiertos en comparación con los machos, es decir, fueron menos ansiosas. No obstante, en otro experimento, estos mismos autores (Zimmerberg & Farley, 1993) administraron un tratamiento neonatal en las hembras para una castración química con flutamida o tamoxifen, y al ser adultas se evaluó el tiempo en brazos abiertos, reportándose un decremento en el tiempo gastado en comparación con su grupo control. Esta información podría indicar que las hormonas gonadales podrían tener una influencia en ésta conducta asociada a la ansiedad.

Hay información contradictoria sobre el efecto de la ansiedad en el dolor. Se ha reportado un incremento del umbral al dolor bajo un estado ansioso (Malow 1981), sin embargo, también se ha descrito que cuando un sujeto esta bajo un estado ansioso el umbral al dolor no se ve modificado (Al & Rokke 1990). En nuestro estudio se halló una tendencia hacia una correlación negativa entre ansiedad y dolor

en el grupo de las hembras, mientras en los machos no encontramos nada (Figura 10). Esta tendencia en caso de hacerse significativa (sería necesario aumentar la n para probablemente encontrarla), sugeriría que a mayor ansiedad menos dolor y se podría comprobar una idea planteada en el apartado 3.3., donde se sugería que la ansiedad pudiera estar funcionando como un “distractor cognitivo” y de esta manera, el dolor no sería percibido de igual manera por un sujeto ansioso dados los recursos cognitivos que estaría empleando para detectar una amenaza externa.

De igual forma, no hay diferencias significativas en la medición del dolor cuando se compararon las medias entre machos y hembras (Figura 14) y cuando fueron agrupados de acuerdo a su nivel de ansiedad (Figura 15), lo cual podría reafirmar que en nuestro experimento no hubo influencias hacia el dolor a causa del ciclo como se mencionaba anteriormente y además concuerda con lo reportado por Tseng y Craft (2001) quienes no reportaron variaciones en el dolor a causa del ciclo en las hembras.

La reactividad conductual que presentan los sujetos a la exposición de un ambiente novedoso y/o luz, ha sido asociada como una respuesta relacionada a la ansiedad (Crestani et al 1999). No se observa ninguna diferencia significativa en esta conducta asociada a la ansiedad en ninguno de los grupos (Datos no mostrados).

Como se había dicho anteriormente, una mayor expresión del receptor CB1 en la CPF, se correlacionó con una menor ansiedad. Cuando se juntaron los nuestros grupos por su nivel de ansiedad, los grupos no ansiosos/no ansiosas tienden a tener una media por arriba de los ansiosos/ansiosas, en la expresión del receptor CB1 en la CPF. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas, aunque en el grupo de las hembras hubo una tendencia ($p = .058$). Esto probablemente se deba a la n utilizada en cada grupo (Figura 18). De manera interesante, se observó poca variabilidad en la expresión del receptor CB1 en ansiosos/no ansiosos, ocurriendo lo mismo entre ansiosas/no ansiosas (Figura 20).

El peso de los machos durante el consumo de alcohol se mantuvo en ascenso, como era de esperarse. El peso de las hembras prácticamente no se incrementó ni disminuyó (Figura 23). El consumo de comida y agua también se mantuvieron constantes y sin diferencias significativas entre los distintos días, sugiriendo que el consumo de alcohol, no alteró ninguna de las dos ingestas (Figura 24 y 25). De manera similar, la ingesta de alcohol no varió a lo largo de los 10 días en ninguno de los grupos (Figura 26).

En este estudio no se encontró alguna diferencia en el consumo de alcohol entre los machos y hembras (Figura 27) lo cual resulta interesante ya que se ha observado un consumo mayor en ratas hembras sin ser ovariectomizadas, y en este sentido cuando son ovariectomizadas disminuye el consumo, restaurándose la ingesta con la administración de estradiol (Ford et al 2002). Otros estudios también han reportado un mayor consumo de alcohol en sujetos hembras en comparación con los machos (Veter-O'Hagen et al 2009; Chester et al 2006); sin embargo, también se ha hallado información contradictoria, donde machos y hembras consumen la misma cantidad de alcohol (Schramm-Sapyta et al 2014) Estas diferencias probablemente se deban a las especies o cepas utilizadas, al modelo empleado y la concentración de alcohol dada. Por otro lado, cuando clasificamos a los sujetos por su nivel de ansiedad, encontramos un consumo mayor significativo en las ratas machos no ansiosos, comparados con los ansiosos; mientras que en las hembras no encontramos ninguna diferencia significativa (Figura 28). De igual forma se encontró una correlación positiva en los machos entre una mayor ansiólisis y un mayor consumo de alcohol (Figura 13). Estos datos podrían contradecir lo reportado por la literatura, donde se afirma que a mayor ansiedad más consumo de alcohol (Teoría de la reducción tensional) no obstante, también se ha reportado un "bajo o normal" consumo de alcohol en sujetos con ansiedad social, por lo cual, no necesariamente la ansiedad pueda generar un consumo mayor. Incluso dentro de la comorbilidad existente entre ansiedad y consumo de alcohol, hay un porcentaje de humanos con un trastorno de ansiedad y no altos consumidores de alcohol (Cappell y Herman, 1972; Smail et al, 1984 Brunch et al 1992). Aunado a esto, los sujetos experimentales, no fueron modificados genéticamente o fueron puestos

ansiosos durante su ingesta, lo cual también podría explicar la discrepancia en los resultados encontrados con la literatura. Como perspectivas, se sugiere buscar otras conductas que pudieran estar incrementando la probabilidad de consumir alcohol, ya que por lo visto en este trabajo, la percepción al dolor parece no estar correlacionado con la ingesta de alcohol, además un incremento de la n .

Conclusión

En conclusión, el presente trabajo aporta evidencia de que una mayor expresión del receptor CB1 en la CPF correlaciona con una menor ansiedad en las hembras. También se observó que a menor expresión del receptor CB1 en la CPF menos dolor en las hembras. De igual forma se encontró que una alta expresión del receptor CB1 en la misma región, correlaciona positivamente con el consumo de alcohol en los machos. De manera sorprendente, no se encontró una correlación entre el consumo de alcohol y el dolor con la expresión del receptor CB1 en el Nacc.

Referencias

- Altier, N. & Stewart, J. (1999). The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia. *Life Sciences*. 65(22),2269-2287.
- Ashton, A. (2001). Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *British journal of Psychiatric*. 178;101-106.
- Asociación Americana de Psiquiatría. (2013). Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (5ª ed.). Arlington, VA. American Psychiatric Publishing. EE.UU.
- Apkarian, A & Shi, T. (1994). Squirrel monkey lateral thalamus: Somatic nociresponsive neurons and their relation to spinothalamic terminals. *Journal of Neuroscience*. 14;6779-6795.
- Barlow, D (2002). Anxiety and its disorders: The nature and treatment of anxiety and panic. New York: The Guilford Press.
- Barnard, E., Skolnick, P., Olsen, R., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Batenson, A & Langer S. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacology Reviews*, 50(2),291–313.
- Basbaum, A., Fields, H. (1984). Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, 7; 309–338.
- Bergamaschi, M., Queiroz R, Chagas, M., de Oliveira, D., De Martinis, B., Kapczinski, F., Quevedo, J., Roesler, R., Schröder, N., Nardi, A., Martín-Santos, R, Hallak, J., Zuardi, A & Crippa, J. (2011). Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients. *Neuropsychopharmacology*, 36(6),1219–1226.
- Blednov, Y., Cravatt, B., Boehm, S., Walker, D & Harris, A. (2007). Role of endocannabinoids in alcohol consumption and intoxication: studies of mice of mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Neuropsychopharmacology*, 32;1570-1582.
- Bie, B., Brown, D & Naguib, M (2011). Synaptic plasticity and pain aversion. *European Journal of Pharmacology*, 667;26-31.
- Bishop, S. (2007). Neurocognitive mechanisms of anxiety: an integrative account. *Trends in cognitive science*, 11;307-316.

- Boehm, S., Ponomarev, I., Jennings, A., Whiting, P., Rosahl, T., Garrett, E., Blednov, Y. & Adron, R. (2004). Gamma-Aminobutyric acid A receptor subunit mutant mice: new perspectives on alcohol actions. *Biochemical Pharmacology*, 68(8),1581–602.
- Brailowsky, S. (1995). *Las sustancias del sueño*. Fondo de Cultura Económica:México.
- Breier, A et al (1997). Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: Evidence from a novel positron emission tomography method. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 94;2569-2574.
- Brodie, S., Haman, A. & Dunwiddie, T. (1990). Ethanol increases the firing rate of dopaminergic neurons of the rat. *Brain Research*. 508;65-69.
- Brodie, M., Pesold, C. & Appel S. (1999). Ethanol directly excites dopaminergic ventral tegmental area reward neurons. *Alcoholism: clinical and experimental research*, 23;1848-1852.
- Brunch, M., Heimberg, R., Harvey, C., McCann, M, Mahone. M. & Slavkin, S. (1992). Shyness, alcohol expectancies, and alcohol use: Discovery of a supresor effect. *Journal of Research in Personality*, 26(2),137-149.
- Burstein, R. & Giesler, G. (1989). Retrograde labeling of neurons in spinal cord that project directly to nucleus accumbens or the septal nuclei in the rat. *Brain Research*, 497;149-154.
- Calignano, A., La Rana, G., Guiufrida, A. & Piomelli, D. (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*. 394;277-281.
- Canteras, N., Barbosa, L., Bertoglio, L., de Padúa, A. & Silveria, F. (2010). Neuroanatomy of anxiety. *Current Topics in behavioral Neurosciences*. 2:77-96.
- Cappell, H., Herman, C. (1972). Alcohol and tension reduction. *Journal of studies on Alcohol and drugs*. 33;33–64.
- Cahill, C., Taylor, A., Cook, C., Ong, E., Morón, J. & Evans, C. (2014). Does the kappa opioid receptor system contribute to pain aversion? *Frontiers in Pharmacology*. 5;1-15.
- Castillo, P., Younts, T., Chavez A., Hashimotodani Y. (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*. 76;70–81.

- Castro, D. & Berridge, K. (2014). Opioid hedonic hotspot in Nucleus Accumbens Shell: Mu, Delta and Kappa maps for enhancement of sweetness “Liking” and “Wanting”. *The Journal of Neuroscience*. 34(12),4239-4250.
- Cheng, Z., Fields, H. & Heinricher, M. (1986). Morphine microinjected into the periaqueductal gray has differential effects on 3 classes of medullary neurons. *Brain Research*. 375;57-65.
- Cohen, C., Perrault, G., Voltz, C., Steinberg, R. & Soubrié P. (2002). SR141716, a central cannabinoid (CB(1)) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats. *Behavioral Pharmacology*. 13;451-463.
- Colombo, G., Serra, S., Brunetti, G., Gomez, R., Melis, S., Vacca, G., Carai, M. & Gessa, L. (2002). Stimulation of voluntary ethanol intake by cannabinoid receptor agonists in ethanol-preferring sP rats. *Psychopharmacology*. 159;181-187.
- Colombo, G., Serra, S., Vacca, G., Carai, M., Gessa G. (2005). Endocannabinoid system and alcohol addiction: pharmacological studies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 81;369–380.
- Covarrubias-Gómez A. (2008) Papel del anesthesiólogo en el manejo del dolor crónico. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 31(Supl.1),S235-237.
- Crabbe, J., Phillips, T., Harris, R., Arends, M. & Koob G. (2006). Alcohol-related genes: contributions from studies with genetically engineered mice. *Addiction Biology*.11;195–269.
- Crascke, M., Rauch, S., Ursano, R., Prenoveau, J., Pine, D. & Zinbarg, E. (2009). What is an anxiety disorder? *Depression and Anxiety*. 26;1066-1085.
- Cravatt, B., Prospero-García, O., Siuzdak, G., Gilula, N., Henrikensen, S., Boger, D. & Lerner, R. (1995). Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science*. 268(5216),1506-1509.
- Cravatt, B., Demarest, K, Patricelli, M., Bracey, M., Giang, D., Martin, B & Lichtman, A. (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy Sciences*. 98;9371-9376.

- Crestani, F., Lorez, M., Baer, K., Essrich, C., Benke, D., Laurent, J., Belzung, C., Fritshcy, J., Lüscher, B. & Mohler, H. (1999). Decreased GABA_A –receptor clustering results in enhanced anxiety and bias for threat cues. *Nature neuroscience*. 2(9),833-839.
- Chester, J., de Paula, G., De Maria, A. & Finegan, A. (2006) Different effects of stress on alcohol drinking behaviour in male and female mice selectively bred for high alcohol preference. *Alcohol & Alcoholism*. 41(1),44-53.
- Crippa, J., Zuardi, A., Garrido, G., Wichert-Ana, L., Guarnieri, R., Ferrari, L., Azevedo-Marquez, P., Cecilio, J., Maguire, P. & Busatto, G. (2004). Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. *Neuropsychopharmacology*. 29(2),417-426.
- Davis, M., Walker, D., Miles, L. & Grillon, C. (2010). Phasic vs sustained fear in rats and humans: Role of the extend amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology*. 35(1),105-135.
- Dennis S and Melzack R (1983) Perspective on phylogenetic evolution of pain expression in *Animal Pain: Perception and Alleviation* pp 151–160, American Physiological Society, Bethesda: Maryland.
- Dyr, W., Ligieza, J. & Kostokowski, W. (2008). The effect of Cannabinoid CB1 receptor antagonist Rimonabant (SR-141716) on ethanol drinking in high preferring rats. *Alcohol*. 42;509-512.
- Economidou, D., Mattioli L., Cifani, C., Perfumi, M., Massi, M., Cuono, V., Trabace, L. & Ciccociopo, R. (2006). Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR-141716A on ethanol self-administration and ethanol seeking behavior in rats. *Psychopharmacology*. 183;394-403.
- Ervin, F., Palmour, R., Young, S., Guzman-Flores, C., & Juarez, J. (1990). Voluntary consumption of beverage alcohol by vervet monkeys: population screening, descriptive behavior and biochemical measures. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 36(2),367–373
- Espejo, E. (1997a). Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behavioural Brain Research*. 87;233-238.
- Espejo, E. (1997b). Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behavioural Brain Research*. 86;105-112.

- Fahlke, C., Lorenz, J.G., Long, J., Champoux, M., Suomi, S.J., & Higley, J.D. (2000). Rearing experiences and stress-induced plasma cortisol as early risk factors for excessive alcohol consumption in nonhuman primates. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 24(5),644–650.
- Ford, M., Eldridge, C. & Samson H. (2002). Ethanol consumption in the female Long-Evans rat: a modulatory role of estradiol. *Alcohol* 26;103-113.
- Fowler, J., Volkow, N., Logan, J., Alexoff, D., Telang, F., Wang, G., Wong, C., Ma, Y., Kriplani, A., Pradhan, K., Schlyer, D., Jayne, M., Hubbard, B., Carter, P., Warner, D., King, P., Shea, C., Xu, Y., Muench, L. & Apelskog, K. (2008). Fast uptake and long-lasting binding of methamphetamine in the human brain: comparison with cocaine. *Neuroimage*. 43;756-763
- Freund, T., Katona, I. & Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiology Reviews*. 83;1017–66.
- Gabbott, P., Warner, T., Jays, P, Salway, P. & Busby, S. (2005). Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *Journal of Comparative Neurology*. 492;145-177.
- Gallate, J. & McGregor, I. (1999). The motivation for beer in rats: effects of ritaserin, naloxone and SR141716. *Psychopharmacology*. 142;302-308.
- Grace, A. (2000). The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction* .95;119–128.
- Grachev, I., Fredrickson, B. & Apkarian, A (2002). Brain chemistry reflects dual states of pain and anxiety in chronic low back pain. *Journal of Neural Transmission*. 109;1309-1309.
- Gray, J & McNaughton, N. (2000). *The neuropsychology of anxiety*. Oxford Medical Publications: Oxford.
- Grilly, D. (2002). *Drugs and human behavior*. Allyn and Bacon: Toronto.
- Groenewegen, H. & Russchen, F. (1984) Organization of the efferent projections of the nucleus accumbens to pallidal, hypothalamic and mesencephalic structures: a tracing and immunohistochemical study in the cat. *The Journal of Comparative Neurology*. 223;347-367.

- Harstall, C. & Ospina, M. (2003). How Prevalent is Chronic Pain? *Pain Clinical Update*. 11;1-4.
- Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T. & Masanobu. K. (2007). Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *The Neuroscientist*. 13(2),127-137.
- Hernandez, N. & Vanegas, H. (2001). Encoding of noxious stimulus intensity by putative pain modulating neurons in the rostral ventromedial medulla and by simultaneously recorded nociceptive neurons in the spinal dorsal horns of rats, *Pain*. 91;307-315.
- Higley, J., Hasert, M., Suomi, S. & Linnoila, M. (1991). Nonhuman primate model of alcohol abuse: effects of early experience, personality, and stress on alcohol consumption. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 88:7261-7265.
- Hofbauer, R., Rainville, P., Duncan, G & Bushnell, M. (2001). Cortical representation of sensory dimension of pain. *Journal of Neurophysiology*. 86;402-411.
- Howlett A., Barth F, Bonner, T., Cabral, G., Casellas, P. & Devane, W. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacology Reviews*.54;161–202.
- Howlett, A., Breivogel, C., Childers, S., Deadwyler, S., Hampson, R. & Porrino, L. (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*. 47(1),345-358.
- Hungund, B., Szakall, I., Adam, A., Basavarajappa, B. & Vadasz, C. (2003). Cannabinoid CB1 receptor Knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Journal of Neurochemistry*. 84;698-704.
- Huot, R., Thirivikraman, K., Meaney, M., & Plotsky, P. (2001). Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology*. 158;366–373.
- Johnson, S. & North, R. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The journal of Neuroscience*. 12;483-488.
- Julius, D. & Basbaum, A. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 413;203-210.

- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., & Agud, J. (2012). Principios de neurociencia. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España.
- Katzung, B. (2001). Basic and clinical pharmacology. Toronto: Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- Koster, A., Montkowski, A., Shulz, S., Stube, E., Knautd, K., Jenk, K., Moreau, J., Nothacker, H., Civelli, O. & Reinscheid, R. (1999). Targeted disruption of the orphanin FQ/nociception gene increases stress susceptibility and impairs stress adaptation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(18),10444-10449.
- Koyanagi, S., Himukashi, S., Mukaida, K., Shichino, T. & Fukuda, K. (2008). Dopamine D2-like receptor in the nucleus accumbens is involved in the antinociceptive effect of Nitrous Oxide. *Anesthesia & Analgesia*. 106(6),1904-1909.
- Kuhn, C. (2015). Emergence of sex differences in the development of substance use and abuse during adolescence. *Pharmacology & Therapeutics*. 153;55-78.
- Le Bars, D., Gozariu M. & Cadden, W. (2001). Animal Models of nociception. *Pharmacological Reviews*. 53;597-652.
- Li, J., Daughters, R. Bullis, C., Bengiamin, R., Stucky, M., Brennan, J. & Simone, D. (1999). The cannabinoid receptors agonist Win 55,212-2 mesylate blocks the development of hyperalgesia produced by capsaicin in rats. *Pain*. 81;25-33.
- Lu, F., Tang, J., Yuan, B. & Jia, H. (1996). Effects of bilateral lesions of ventrolateral orbital cortex on the rat tail flick reflex inhibition evoked by electroacupuncture. *Acupuncture research*. 21;39-42.
- Mallow, R. (1981). The effects on induced anxiety on pain perception: a signal detection analysis. *Pain*. 11(3),397-405.
- Manning, B., Merin, N., Meng I & Amaral, D. (2001). Reduction in opioid and cannabinoid induced antinociception in Rhesus monkeys after bilateral lesion of amygdaloid complex. *Journal of Neuroscience*. 20;8238-8246.
- Martin, W., Tsou, K. & Walker, M. (1998). Cannabinoid receptor-mediated inhibition of the rat tail-flick reflex after microinjection into the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience Letters*. 242;33-36.

- Martin, P. (2003). The epidemiology of anxiety disorders: a review. *Clinical Research*. (5)3,281-298.
- Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., & Valverde, O. (2000). Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *European Journal of Neuroscience*. 12;4038–4046.
- Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., & Valverde, O (2002). Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacological*. 159;379-387.
- Mascia, M., Obinu, M, Ledent, C., Parmentier, M., Böhme, G., Imperato, A. & Fratta, W. (1999). Lack of morphine induced dopamine release in the nucleus accumbens of cannabinoid CB(1) receptor knockout mice. *European Journal of pharmacology*. 383;R1-R2.
- Mason, D. & Welch, S. (1999). A diminution of D₉-tetrahydrocannabinol modulation of dynorphin A in conjunction with tolerance development. *European Journal of Pharmacology*. 381;105-111.
- Masson, P. (1999). Central mechanism of pain modulation. *Neurobiology*. 9;436-441.
- Matsuda, L., Lolait, S., Brownstein, M., Young, A. & Bonner, T. (1990). Structure of cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346(6284),561-564.
- Mechoulam R, Ben-Shabat, S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski N , Schatz AR, et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*. 50:83-90.
- Medina-Mora, M. (2012) *¿Cuál es la naturaleza del problema que estamos enfrentando? Alcohol y políticas públicas*. México: El Colegio Nacional.
- Melis M, Muntoni A, Pistis M. (2012) Endocannabinoids and the processing of value-related signals. *FrontPharmacology* 3:7
- Meng, I., Manning, B., Martin, W. & Fields (1998) An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature*. 395:381-383

- Meng, I. & Johansen, J. (2004). Antinociception and modulation of rostral ventromedial medulla neuronal activity by local microinfusion of a cannabinoid receptor agonist. *Neuroscience*. 124;685-693.
- Merskey, H. & Bogduk, N. (1994). *Classification of Chronic Pain*. IASS Press.
- Mense, M. (1983). Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia. *The American Journal of Medicine*. 75;4-14.
- Middaugh, L., & Kelley, B. (1999). Operant ethanol reward in C57BL/6mice: influence of gender and procedural variables. *Alcohol*. 17(3),185-194.
- Mihalek, R., Bowers, B., Wehner, J., Kralic, J., VanDoren, M., Morrow, A. & Homanic, G. (2001). GABA_A-Receptors δ subunit Knockout mice have multiple defects in behavioral responses to ethanol. *Alcoholism: Clinical and experimental Research*. 25(12),1708-1718.
- Millan, M. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology* 57;1-164.
- Mullaney, J. & Trippett, C. (1979). Alcohol dependence and phobias: Clinical description and relevance. *British Journal of Psychiatry*. 135;565-573.
- Munro, S., Thomas, K. & Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365:61-65.
- Murillo-Rodríguez, E., Giordano, M., Cabeza, R., Henriksen, S., Méndez, M., Navarro, L. & Prospéro-García O. (2001). Oleamide modulates memory in rats. *Neuroscience Letters*.313:61-64.
- Navarro, M., Hernández, E., Muñoz, R., Arco, I., Angeles, M., Carrera, M & Rodríguez de Fonseca, F. (1997). Acute administration of CB1cannabinoid receptor antagonist SR141716 induces anxiety like response in the rat. *Neuropharmacology and Neurotoxicology*. 8;491-496.
- Nenelares, A. (24 de junio 2012). El trastorno de ansiedad afecta a mas de 14 millones de mexicanos. *Crónica*. Recuperado de: <http://www.cronica.com.mx/notas/2012/671248.html>
- Nuss, P. (2015). Anxiety disorders and GABA neurotransmission: disturbance of modulation. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 11;165-175.

- Odeon, M., Andreu, M., Yamauchi, L., Grosman, M. & Acosta, G. (2015). Chronic postnatal stress induces voluntary alcohol intake and modifies glutamate transporters in adolescent rats. *Stress*. 18(4),427-434.
- Onaivi, E., Green, M. & Martin, B. (1990). Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 253;1002-1009.
- Organización Mundial de la Salud (2010). *Alcohol atención primaria*. Recuperado el 5 de abril 2016 de: http://www.who.int/substance_abuse/publications/alcohol_atencion_primaria.pdf
- Pakarinem, E., Williams, K. & Woods, J. (1999). Food restriction and sex differences on concurrent, oral ethanol and water reinforcers in juvenile Rhesus monkeys. *Alcohol*. 17(1),35-45.
- Petwee, R. (1999). Pharmacology of cannabinoid ligands. *Current Medicinal Chemistry*. 6;635-664.
- Petwee, R., Gibson, T., Steventson, L., Ross, R., Banner, S. Razdan, R. & Martin, B. (2000). O-1057 a potent water soluble cannabinoid receptor agonist with antinoceptive properties. *British Journal of Pharmacology*. 129;1577-1584.
- Picard, N. & Stirck, P. (1996). Motor areas of the medial wall: a review of their location and functional activation. *Cerebral cortex*. 6;342-353.
- Ploner, M., Gross, J. & Timmerman, L. (2002). Cortical representation of first and second pain sensation in humans. *Proceedings of the National Academy of Science*. 99;12444-12448.
- Ploner, M. & Schnitzler, A. (2004). Kortikale Repräsentation von Schmerz. *Der Nervenarzt*. 75;962-969.
- Posner, M. & Petersen, S. (1990). The attention system of the human brain. *Annual Review of Neuroscience*. 13;25-42.
- Posner, M.I. & Dehaene, S. (1994). Attentional networks. *Trends in Neuroscience*. 17;75-79.
- Price, D. (2000). Psychological and neuronal mechanism of the affective dimension of pain. *Science*. 288;1769-1772.

- Quitkin, F., Rifkin, A., Kaplan, J. & Klein, D. (1972). Phobic Anxiety Syndrome Complicated by Drug Dependence and Addiction: A Treatable Form of Drug Abuse. *Archives of General Psychiatry*. 27(2),159-162
- Raja, S., Meyer, R., Ringkamp, M. & Campbell, J. (1999). *Textbook of Pain* Churchill Livingstone: Edinburgh.
- Rainville, P. (2002). Brain Mechanism of pain affect and pain modulation. *Neurobiology*. 12;195-204.
- Rektor, I., Kanovsky, P., Bares, M., Louvel, J. & Lamarche, M. (2001). Event related potentials, CNV, readiness potential, and movement accompanying potential recorded from posterior thalamus in human subjects. *Clinical Neurophysiology*. 31;253– 261.
- Rhodes, J., Ford, M., Yu, C., Brown, L., Finn, D., Garland, T. & Crabbe, J. (2006). Mouse inbred strain differences in ethanol drinking to intoxication. *Genes Brain Behav* 6(1),1–18.
- Rodríguez de Fonseca, F., Carrera, M., Navarro, M., Koob, G & Weiss, F. (1999). Activation of Corticotropin-Releasing Factor in the Limbic System during cannabinoid withdrawal. *Science*. 276;2050-2053.
- Romano-López, A; Méndez-Díaz M, García, F; Regalado-Santiago, C; Ruiz-Contreras, E & Porspéro-García O. (2016). Maternal separation and early stress cause long-lasting effects on dopaminergic and endocannabinergic systems and alters dendritic morphology in the nucleus accumbens and frontal cortex in rats. *Development neurobiology*.76;819-831.
- Saade, N., Atweh, S., Bahuth, N. & Jabbur, S. (1997). Augmentation of nociceptive reflexes and chronic deafferentation pain by chemical lesion of either dopaminergic terminals or midbrain dopaminergic neurons. *Brain Research*. 751;1-12.
- Salgado, S. & Kaplitt, M. (2015). The Nucleus Accumbens: A comprehensive review. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*. 93;75-93.
- Secretaría de Salud. (2009). Encuesta Nacional de Adicciones 2008. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz / Secretaría de Salud. México DF: México.

- Secretaría de Salud. (2012). Encuesta Nacional de Adicciones 2011. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz / Secretaría de Salud. México DF: México.
- Sewards, T. & Sewards, M (2003). Representation of motivational drives mesial cortex, medial thalamus and midbrain. *Brain Research Bull.* 61;25-49.
- Sewards, T. & Sewards, M. (2003). Representations of motivational drives in medial cortex, medial thalamus, hypothalamus and midbrain. *Brain Research Bulletin.* 61;25–49.
- Schramm-Sapyta, N., Francis, R., MacDonald, A. & Keistler, C. (2014). Effect of sex on ethanol consumption and conditioned taste aversion in adolescent and adult rats. *Psychofarmacology.* 231(8),1831-1839.
- Shekhar, A., Keim, S. (2000) LY354740, a potent group II metabotropic glutamate receptor prevents lactate-induced panic response in panic-prone rats. *Neuropharmacology.* 39(7):1139-1146.
- Sheng, H., Qu, C., Hou, F., Du., J. & Tang, J. (2009). D2-like but not D1-like dopamine receptors are involved in the ventrolateral orbital cortex-induced antinociception: a GABAergic modulation mechanism. *Experimental Neurology.* 215;128-134.
- Smail, P. Stockwell, T. Canter, S. Hodgson, R. (1984). Alcohol dependence and phobic anxiety states. I. A prevalence study. *British Journal of Psychiatry.* 144;53-57.
- Soria, G., Mendizábal, V., Touriño, C., Robledo, P., Ledent, C., Parmentier, M., & Valverde, O. (2005). Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology.* 30;1670–1680.
- Sotres-Bayón, F., Torres-López, A., López-Ávila, A. del Ángel, R. & Pellicer, F. (2001). Lesion and electrical stimulation of the ventral tegmental area modify persistent nociceptive behavior in the rat. *Brain Research.* 2;342-349.
- Srisurapanont M, Jarusuraisin N (2006). Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 25;CD001867

- Tanda G, Munzar P, Goldberg S. (2000). Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nature Neuroscience*. 3;1073–1074.
- Tambour, S., Brown, L., & Crabbe, J. (2008). Gender and age at drinking onset affect voluntary alcohol consumption but neither the alcohol deprivation effect nor the response to stress in mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 32(12), 2100–2106.
- Thierry, A., Tassin, J., Blanc, G. & Glowinski, J. (1976). Selective activation of the mesocortical dopamine system by stress. *Nature*. 263;242-243.
- Timmermann, L., Ploner, M. & Haucke, K. (2001). Differential coding of pain intensity in the human primary and secondary somatosensory cortex. *Journal of Neurophysiology*. 86;1499–1503.
- Tracey, I., Ploghaus, A., Gati, J., Clare, S., Smith, S., Menon, R. & Matthews P. (2002). Imaging attentional modulation of pain in periaqueductal gray in humans. *Journal of Neuroscience*. 22;2748-2752.
- Tracey, I. & Mantyh, P. (2007). The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*. 55;377-391.
- Tsuji, M., Takeda, H. & Matsumiya, T. (2003). Modulation of passive avoidance in mice by the 5-HT_{1A} receptor agonist Flesinoxan: comparison with the Benzodiazepine receptor agonist Diazepam. *Neuropsychopharmacology*. 28;664-674.
- Van Eden, C. & Buijs, R. (2000). Functional Neuroanatomy of the prefrontal cortex: autonomic interactions. *Progress in Brain Research*. 126;49-62.
- Vanegas, H. & Schaible, H. (2004). Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Research Review*. 46;295-309.
- Vertes, R. (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience*. 142;1-2.
- Vetter-O'Hagen, C., Varlinskaya, E. & Spear, L. (2009). Sex differences in ethanol intake and sensitivity to aversive effects during adolescence and adulthood. *Alcohol & Alcoholism*. 44(6),547-554.

- Vivian, J., Green, H., Young, J., Majerksy, L., Thomas, B., & Shively, C.A., (2001). Induction and maintenance of ethanol self-administration in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): long-term characterization of sex and individual differences. *Alcoholism: Clinical of Experimental Research*. 25(8), 1087–1097.
- Volkow, N. & Fowler, J. (2000). Addiction, a disease of compulsion and drive: Involvement of the orbitofrontal cortex. *Cerebral Cortex* 10;318–325.
- Volkow, N., Wang, G., Fowler, J. & Tomasi, D. (2012). Addiction circuitry in the human brain. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 10(52),321-336.
- Walker, J., Huang, S., Strangman, N., Tsou, K & Sañudo-Peña, M. (1999). Pain modulation by release of endogenous cannabinoid anandamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96;12198-12203.
- Walker, D., Toufexis, D. & Davis, M. (2003). Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus amygdala in fear, stress and anxiety. *European Journal of Pharmacology*. 463;199-216.
- Wang, L., Liu, J., Harvey-White, J., Zimmer, A. & Kunos, G. (2003). Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its agedependent decline in mice. *Proceeding National Academy of Science*. 100;1393-1398.
- Willis, W. & Westlund, K. (1997). Neuroanatomy of the pain system that modulate pain. *Journal of Clinic Neurophysiology*. 14;2-31.
- Wise, R. (1989). Basis of Reward. *The Neuropharmacological*. Oxford University, Press Oxford.
- Wise, R. & Schwartz, H. (1981). Pimozide attenuates acquisition of lever pressing for food in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 15;655–656.
- Wise, R., Leone, P., Rivest, R. & Leeb, K. (1995). Elevations of nucleus accumbens dopamine and DOPAC levels during intravenous heroin self-administration. *Synapse*. 21;140–148.
- Wise, R. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews*. 5;1-12.
- Wise, R. (2009). Roles for nigrostriatal not just mesocorticolimbic dopamine in reward and addiction. *Trends in Neuroscice*. 32;517–524.
- Weiss, F., Lorang. M. Bloom., & Koob, G. (1993). Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat Nucleus Accumbens: Genetic and

- motivational determinants. *The Journal of pharmacological and experimental therapeutics*. 267;250-258.
- Willis, W & Westlund, K. (1997). Neuroanatomy of the Pain System that modulate pain. *Journal of Clinical Neurophysiology*. 14;2-31.
- Xie, Y., Wang, J., Hou, F., Jia, H. & Tang, J. (2004). Mu but not delta and Kappa opioid receptor Involvement in ventrolateral orbital cortex opioid-evoked antinociception in formalin tests rats. *Neuroscience*. 126;717-726.
- Yaksh, T. (1981). The antinociceptive effects of intrathecally administered levonantradol and desacetlevonantradol in rat. *Journal Clinical of Pharmacology*. 21;334S-340S.
- Zhang, A., Hao, J., Seiger, A., Xu, X. J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Grant, G. and Aldskogius, H. (1994). Decreased GABA immunoreactivity in spinal cord dorsal horn neurons after transient spinal cord ischemia in the rat. *Brain Research*. 656;187-190.
- Zimmerberg, B. & Farley. (1999). Sex differences in anxiety behavior in rats: role of gonadal hormones. *Physiology & Behavior*. 54(6);1119-1124.
- Zimmer, A., Zimmer, A., Hohmann, A., Herkenham, M. & Bonner, T. (1999). Increased mortality, hypoactivity and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proceedings of National Academy of Science*. 96;5780-5785.
- Zubieta, J., Smith, Y., Bueller, J., Xu, Y., Kilbourn, M., Jewett, D., Meyer, C., Koeppe, Stohler, C. (2001). Regional μ opioid receptor regulation of sensory and affective dimension of pain. *Science*. 293;311-315.
- <http://www.cronica.com.mx/notas/2012/671248.html>

Anexo

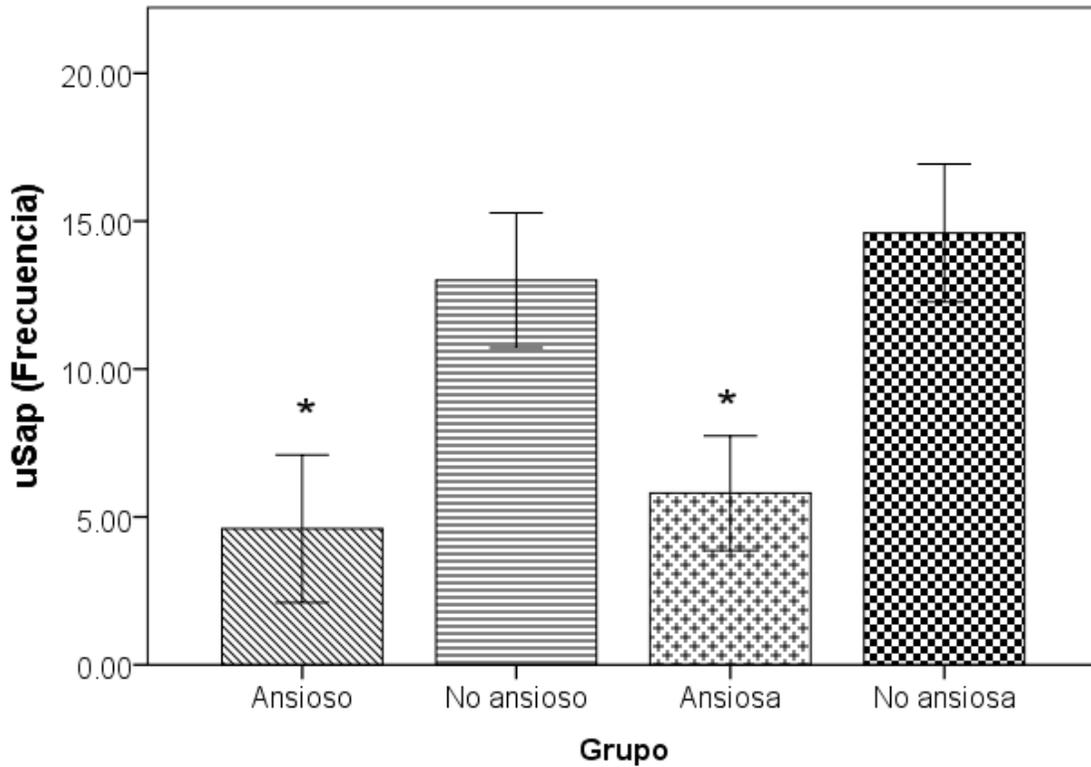


Figura 29. Frecuencia uSAP agrupados por sexo y nivel de ansiedad. Encontramos diferencias significativas entre ansiosos y no ansiosos ($p < 0.001$) ansiosas y no ansiosas ($p < 0.05$). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media.