



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE PSICOLOGÍA

### EVALUACIÓN DE EFECTOS DE LA ANANDAMIDA SOBRE LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES INDUCIDAS POR ESTRÉS

#### TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Psicología

PRESENTA

**Martín Migliaro**

DIRECTOR:

DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO

REVISOR:

DR. ÓSCAR PROSPÉRO GARCÍA

SINODALES:

DR. FLORENCIO MIRANDA HERRERA

DR. RODRIGO PEDROZA LLINÁS

DRA. LAURA RAMOS LANGUREN

Apoyado por los proyectos  
DGAPA/PAPIME, PE300715  
DGAPA/PAPIIT, RN305715

Área: Neuropsicofarmacología  
Ciudad Universitaria, CD. MX., 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*A fluid life is affirmed with the constant labor of self-overcoming. May we applaud those that can abbreviate the suffering inflicted by their wounds. Moreover, an extension of our empathy is due to those that have become stagnant and tailored to the dimensions of their anguish.*

*Agradezco a mi mamá y a mi papá por fomentar mi curiosidad  
con un microscopio y una vuelta por el mundo.*

## Resumen

El sistema endocannabinoide es un importante regulador de la repuesta de estrés, sin embargo, se desconoce con claridad si tiene propiedades preventivas sobre las afectaciones conductuales del estrés. Para evaluar lo anterior, se administró anandamida u oleamida a ratas macho de la cepa Wistar 10 minutos antes de ser expuestas al olor de depredador (orina de lince). Comenzando 24 horas después de la exposición, la conducta fue evaluada con el laberinto cero elevado, el campo abierto y la prueba de reconocimiento de objetos. Anandamida previno el desarrollo de alteraciones conductuales y déficits en la memoria de manera dosis-dependiente, mientras la oleamida demostró poca capacidad preventiva. Este impacto diferencial puede reflejar el perfil farmacodinámico distinto de cada ligando. Se sugiere que la activación del sistema endocannabinoide en una etapa peritraumática podría ser un blanco para la prevención de secuelas inducidas por estrés.

## Tabla de contenidos

Capítulo 1: La sabiduría del cuerpo.....	1
Capítulo 2: Marco teórico .....	5
I. El estrés .....	6
I.a. Conceptos preliminares para la comprensión del estrés .....	6
I.b. Definición de estrés .....	7
II. Ejes fisiológicos mediadores de la respuesta de estrés en mamíferos.....	8
II.a. Mediadores del estrés .....	8
III. La exposición a olor de depredador como una amenaza contra la vida .....	10
IV. El sistema endocannabinoide.....	11
IV. a. Anandamida .....	13
IV.b. Oleamida.....	13
IV.c. CB1 .....	14
IV.d. TRPV1.....	14
V. El sistema endocannabinoide y la respuesta de estrés.....	14
Capítulo 3: Problemática, Pregunta, Justificación, Objetivo e Hipótesis.....	18
Planteamiento de Problema.....	19
Pregunta general .....	19
Preguntas específicas.....	19
Justificación .....	19
Objetivo.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
Hipótesis .....	20
Capítulo 4: Método .....	21
Sujetos.....	22
Fármacos.....	22
Procedimiento experimental.....	22
Exposición a olor de depredador .....	24
Pruebas conductuales .....	24
Análisis conductual .....	26
Análisis estadístico .....	27

Capítulo 5: Resultados .....	28
Laberinto cero elevado .....	29
Permanencia en brazo abierto.....	29
Cruces al brazo abierto.....	30
Evaluación ambiental.....	31
Campo Abierto .....	32
Cruces totales.....	32
Cruces al centro.....	33
Permanencia en el centro .....	34
Duración de Inmovilidad .....	35
Número de eventos de inmovilidad.....	36
Duración de congelamiento .....	37
Número de eventos de congelamiento .....	38
Duración de acicalamiento .....	39
Número de eventos de acicalamiento.....	40
Número de eventos de erguimiento.....	41
Reconocimiento de Objetos .....	42
Interacción con objetos.....	42
Capítulo 6: Discusión y conclusión .....	44
Efectos preventivos de la anandamida sobre conducta tipo-ansiedad es dosis- dependiente .....	45
Prevención de alteraciones inducidas por estrés sobre la memoria .....	47
Oleamida muestra poca capacidad preventiva .....	48
Implicaciones para tratamientos farmacológicos .....	49
Conclusión .....	51
Referencias .....	53

**Lista de tablas**

Tabla 1. Efectos por la exposición a olor de depredador.....	11
Tabla 2. Grupos.....	22
Tabla 3. Procedimiento experimental .....	23
Tabla 4. Efectos de estresores y la administración de agentes ansiogénicos en roedores sobre varias mediciones conductuales en las pruebas de laberinto cero elevado, campo abierto y reconocimiento de objetos.....	26
Tabla 5. Resumen de efectos preventivos de AEA y OEA en las pruebas de campo abierto y reconocimiento de objetos.....	45

## Lista de figuras

Figura 1. Estructura molecular de anandamida y oleamida. ....	12
Figura 2. Laberinto cero elevado.....	24
Figura 3. Caja de campo abierto. ....	25
Figura 4. Reconocimiento de objetos.....	25
Figura 5. Tiempo de permanencia en el brazo abierto del laberinto cero.....	29
Figura 6. Cruces al brazo abierto en laberinto cero.....	30
Figura 7. Duración de evaluación ambiental en el laberinto cero.....	31
Figura 8. Número de cruces totales en campo abierto.....	32
Figura 9. Número de cruces al centro en campo abierto.....	33
Figura 10. Permanencia en centro en campo abierto .....	34
Figura 11. Duración de inmovilidad en campo abierto.....	35
Figura 12. Número de eventos de inmovilidad en campo abierto .....	36
Figura 13. Duración de congelamiento en campo abierto.....	37
Figura 14. Numero de eventos de congelamiento en campo abierto .....	38
Figura 15. Duración de acicalamiento en campo abierto .....	39
Figura 16. Numero de eventos de acicalamiento en campo abierto .....	40
Figura 17. Numero de eventos de erguimiento en campo abierto.....	41
Figura 18. Duración de interacción con objetos en la prueba de reconocimiento de objetos.....	43

## Lista de acotaciones

$\Delta$ 9-THC:  $\Delta$ 9-tetrahidrocannabinol

ACTH: hormona adrenocorticotrópica

AEA: anandamida, *N*-araquidonoiletanolamina

CB1: receptor a cannabinoides 1

CB2: receptor a cannabinoides 2

CRF: factor liberador de corticotropina

GR: receptor glucocorticoide

HPA: hipotalámico-pituitario-adrenal

FAAH: amina hidrolasa de ácidos grasos

OEA: oleamida, *Cis*-9,10-octadecenoamida

PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo

TRPV1: receptor de potencial transitorio vallinoide 1

# Capítulo 1

## La sabiduría del cuerpo

*“Es gibt mehr Weisheit in deinem Körper als in deiner tiefsten Philosophie.”*

–Nietzsche, 1907

El cuerpo es pincel y lienzo de tus obras maestras. La tensión que genera te dispone para cada acto desafiante que afirma vida y escala montañas. Su fuerza se jacta con sabiduría, provista como manera para afrontar un mundo incierto y hostil. Si no es la guerra que nos llama, será el campo bélico de nuestro deseo. El cuerpo saludable y orgulloso proclama que cada batalla lo redefine de una nueva manera y mejor: ha logrado aceptar y trascender su sufrimiento. Esta alegoría no es comúnmente reconocida en el espejo, se reserva para consejos sobre el “*deber ser*”. Extendiendo la alegoría bélica, una gran derrota puede ser suficiente para desfigurar las capacidades militantes del cuerpo. La tensión se vuelve causa de un infierno silencioso que se esconde detrás de cada mirada.

La labor científica anhela por una comprensión del cuerpo, construye y ajusta sus modelos para producir aproximaciones explicativas y en última instancia, predictivas. La capacidad del cuerpo para lidiar con amenazas ha sido un interés prevalente en la literatura científica. El estrés es un concepto producto de un mosaico conceptual que se traza en ciencia por casi un siglo (Fink, 2010). El proyecto aún está en desarrollo, dado que persiste la carencia de una definición parsimoniosa del estrés (Fink, 2016). A pesar de esta condición, se debe pisar en alguna piedra para permitir el avance. Se ha identificado a la respuesta de estrés como una constelación de patrones fisiológicos que involucra la redistribución de recursos hacia procesos que permiten una mayor probabilidad de supervivencia (Sánchez Castillo, Paz-Trejo, Vazquez Ramírez, Zarate González, & Migliaro, 2014).

A pesar de la efectividad de la respuesta de estrés para facilitar la supervivencia de un organismo, está también puede generar consecuencias adversas para el individuo. Una exposición a un estresor severo o la incapacidad del cuerpo para reequilibrarse es suficiente para crear repercusiones que persisten a largo plazo en la ausencia del estresor original que pueden manifestarse como ansiedad y alteraciones a diversos procesos cognitivos (de Kloet, Joëls, & Holsboer, 2005; Holmes & Singewald, 2013; Pang et al., 2014; Ravindran & Stein, 2009; Wiedemann, 2015).

El sistema endocannabinoide se localiza en una encrucijada funcional en la amortiguación y terminación de la respuesta de estrés (Lutz, Marsicano, Maldonado, & Hillard, 2015). Los endocannabinoides regulan la respuesta de estrés mediante su participación en la liberación de glucocorticoides, la modulación de la excitabilidad de la amígdala y la respuesta de inflamación (Henry, Kerr, Finn, & Roche, 2016; Lutz, Marsicano, Maldonado, & Hillard, 2015; Neumeister et al., 2015). Se ha sugerido que una alteración del sistema endocannabinoide podría explicar en parte la etiología y la sintomatología del trastorno de estrés postraumático (Hill & Lee, 2016; Neumeister et al., 2015). Por estas razones, se ha sugerido que la señalización de endocannabinoides es un blanco terapéutico viable para el tratamiento de psicopatologías relacionadas o inducidas por el estrés (Fowler, 2015; Kinsey, O'Neal, Long, Cravatt, & Lichtman, 2011; Lomazzo et al., 2015; Patel & Hillard, 2006). La amina hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, por sus siglas en inglés) es un enzima degradante de ciertos endocannabinoides que ha recibido mucha atención por su potencial terapéutico (Marco et al., 2015; Moreira, Kaiser, Monory, & Lutz, 2008; Neumeister, Seidel, Ragen, & Pietrzak, 2015). Lamentablemente, en junio del 2016, un estudio clínico de fase II financiado por Pfizer y dirigido por el Dr. Alexander Neumeister, el cual evaluaba la efectividad de un inhibidor de la FAAH para tratar la sintomatología de pacientes diagnosticados con el trastorno por estrés postraumático, fue terminado por razones de fraude científico (U.S. Food and Drug Administration, 2016; U.S. National Library of Medicine, 2016). Tras este incidente, el Dr. Neumesiter renunció su cargo en la Universidad de Nueva York (*New York University*) y los datos del estudio se han etiquetados como poco confiables.

La modulación de la respuesta de estrés para fines preventivos ha sido propuesta como una estrategia terapéutica (Zohar, Sonnino, Juven-Wetzler, & Cohen, 2009) y los estudios que han evaluado esta propiedad con cannabinoides reportan efectos contradictorios. En un estudio con ratas, una administración del agonista al receptor de cannabinoides 1 (CB1), WIN55,212-2, fue administrado en una dosis de 0.5 mg/kg i.p. 2 ó 24 horas posteriores a un protocolo de estrés único prologando y previno el desarrollo de conductas tipo-ansiedad (Ganon-Elazar & Akirav, 2012), mientras que la administración de  $\Delta$ 9-tetrahidrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC) 5 mg/kg i.p. una hora después del estresor no

demostró propiedades preventivas (Mayer, Matar, Kaplan, Zohar, & Cohen, 2014). Agregando a esta falta de claridad, se desconoce por completo si los endocannabinoides podrían tener propiedades preventivas. Siguiendo esta línea de pensamiento, este proyecto evaluó los efectos conductuales de la administración sistémica de anandamida y oleamida en animales expuestos a un estresor agudo.

# Capítulo 2

## Marco teórico

## I. El estrés

### I.a. Conceptos preliminares para la comprensión del estrés

Claude Bernard en 1878 describió que la independencia de los organismos de un medio acuoso se logró cuando los organismos pudieron tener estabilidad de su medio interno, o el *milieu intérieur*. Bernard sugiere que la estabilidad de las condiciones internas resulta ser un requisito para la vida. Profundizando en esta idea, Cannon en 1929 propuso que la estabilidad se lograba con una red de sistemas reguladores (Ramsay & Woods, 2014). El mantenimiento de estados estables por la coordinación de elementos fisiológicos fue definido como homeostasis. Esta palabra fue inventada por Cannon desde los compuestos de *homeo* (similar o parecida) y *estasis* (condición) (Cannon, 1929).

La postura de Cannon se basa en el organismo como un sistema abierto que interactúa con su medio. Un sistema se refiere a la interacción entre elementos, donde la funcionalidad emergente de esta interacción no es reducible a sus componentes. Un sistema abierto en el sentido utilizado por Cannon, que luego fue expandido por Bertalanffy años después, connota a una organización de elementos que permite la importación de energía, material e información. Cannon argumentó que el organismo tiene a su disposición mecanismos que le permiten ajustarse a los disturbios internos causados por la inestabilidad ambiental que posibilita la continuidad de su estado estable.

La regulación por mecanismos de retroalimentación negativa fue considerado por décadas como mecanismo homeostático por excelencia (Carpenter, 2004), pero una revisión de esta exclusividad ha evidenciado limitaciones explicativas (Goldstein & Kopin, 2017; Ramsay & Woods, 2014). Se define a la retroalimentación negativa como un proceso reactivo y correctivo que actúa posterior a un disturbio en los parámetros vitales. Por ejemplo, una alteración en el nivel óptimo de oxígeno es corregido por la modulación de la respiración, la tasa cardíaca y constricción de vasos sanguíneos. Sin embargo, el organismo también posee otros procesos de reorganización sistémica que facilitan resultados adaptativos para el organismo. Goldstein & Kopin (2017) han sugerido dos

mecanismos, además de la retroalimentación negativa, que se relacionan al mantenimiento de la homeostasis: la amortiguación (*buffering*) y la prealimentación (*feed-forward*). La regulación por amortiguación se refiere a la atenuación en la intensidad de un disturbio externo que reduce la necesidad de desencadenar mecanismos correctores. El pelaje de animales, por ejemplo, resulta ser un aislante que disminuye la pérdida de calor en ambientes fríos. Conductas instintivas o aprendidas también pueden servir como amortiguación. La regulación por prealimentación consta de ajustes anticipatorios sobre sistemas fisiológicos que pueden estar basados en experiencias pasadas o desencadenados por un reconocimiento instintivo. Los estímulos son reconocidos como amenazas por interceptores y/o exteroceptores que pueden ser integrados como información en vías relacionadas al aprendizaje asociativo y operacional. Se sugiere que la apropiación del concepto de prealimentación homeostática resulta útil para la propuesta de una definición de estrés.

#### I.b. Definición de estrés

Una estrategia para definir al estrés es partir desde una descripción funcional y luego aterrizar el concepto en sustratos biológicos. De manera más general, el estrés se define como una función de prealimentación dirigida a lidiar con una amenaza (Joëls & Baram, 2009; Mora, Segovia, Del Arco, De Blas, & Garrido, 2012; Ulrich-Lai & Herman, 2009). Los organismos están constantemente sujetos a condiciones que ponen en riesgo a su estabilidad, donde la historia evolutiva favorece la adquisición de mecanismos dirigidos a lidiar con estímulos o situaciones potencialmente desestabilizantes. Lo amenazante requiere la detección o percepción de una posible causa de riesgo. Los tipos de amenazas pueden incluir aquellas provenientes de depredadores, conspecíficos y características adversas del medio ambiente. La efectividad de una respuesta se rige por su adecuación a las particularidades de la amenaza, cual solicita que el organismo sea capaz de reconocer el tipo de estímulo amenazante (Blanchard & Blanchard, 2008).

La *respuesta de estrés* se define como la cascada biológica de que se desencadena por una amenaza y promueven la supervivencia del organismo (Morena,

Patel, Bains, & Hill, 2016). Este proceso consta de un conjunto de acciones en una red no-lineal (McEwen, 2009) que modifican las interacciones entre elementos del sistema orgánico. A nivel molecular, los agentes que llevan a cabo el proceso de reorganización se denominan *mediadores de estrés* (De Quervain, Schwabe, & Roozendaal, 2016). Por lo que el aspecto procedimental de la respuesta de estrés se rige por la cascada de señalización endógena en una ventana temporal que se encauza hacia un estado de activación particular.

## II. Ejes fisiológicos mediadores de la respuesta de estrés en mamíferos

Las estructuras biológicas y procesos funcionales (incluyendo a la conducta) involucrados en la respuesta de estrés en mamíferos han variado dependiendo de la perspectiva que ha definido al fenómeno (Day, 2005; G. Fink, 2010; Karatsoreos & McEwen, 2011; Lazarus, 2000). Desde una definición estricta de la neuroendocrinología, el estrés se refiere a cualquier estímulo que induzcan la actividad del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) que culmina en la liberación de glucocorticoides (G. Fink, 2010; Shin & Liberzon, 2010). Otros autores han negado reducir el estrés a la actividad de glucocorticoides e incluyen a vías adrenérgicas de circuitos del sistema nervioso autónomo (Doczy, Seroogy, Harrison, & Herman, 2009). La inclusión de estructuras extrahipotalámicas del sistema límbico y la corteza cerebral en la conceptualización de estrés ha permitido contemplar a procesos cognitivos de memoria y aprendizaje como componentes que modulan la actividad del eje HPA (McEwen et al., 2015; Shin & Liberzon, 2010; Tovote, Fadok, & Lüthi, 2015). La literatura actual sugiere una conceptualización aún más compleja de la respuesta de estrés, que involucra a estructuras y procesos neuronales, endócrinos e inmunológicos que actúan juntos de una manera no-lineal para mantener estados estables en el organismo (Crowe, Nass, Gabella, & Kinsey, 2014; Hodes, Kana, Menard, Merad, & Russo, 2015; Maldonado-Bouchard et al., 2015; McEwen et al., 2015).

### II.a. Mediadores del estrés

La activación del eje HPA es un factor importante en la respuesta de estrés que

integra componentes estructurales del cerebro y glándulas periféricas. La actividad del núcleo paraventricular (PVN, por sus siglas en inglés) del hipotálamo inducida por un estresor lleva a la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF, por sus siglas en inglés) en la eminencia medial. Esta región del hipotálamo tiene mayor permeabilidad hacia vasos sanguíneos para hormonas proteicas que facilita su transporte a la glándula pituitaria anterior. En esta estructura, el CRF señala la liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH, por sus siglas en inglés) en el torrente sanguíneo e induce la síntesis y secreción de glucocorticoides desde la corteza de la glándula adrenal. En el plano periférico, los glucocorticoides promueven la generación de glucosa desde sustratos proteicos y lipídicos en un proceso denominado como gluconeogénesis. Una mayor disponibilidad de glucosa sistémica permite la regulación a la alta de procesos metabólicos requeridos para funciones fisiológicas involucradas en la respuesta de estrés (De Quervain et al., 2016).

Los glucocorticoides ejercen sus efectos a través de los receptores a glucocorticoides (GR) y los receptores mineralocorticoides (MR). Los últimos tienen una mayor afinidad a los glucocorticoides y se ha sugerido que están involucrados en el mantenimiento de circuitos neuronales relacionados al estrés y con el inicio de la respuesta al estrés. Los GR tienen menor afinidad con los glucocorticoides y se saturan tras una alta liberación sistémica inducida por estrés, lo cual lo vincula con la movilización de recursos energéticos (de Kloet, Joëls, & Holsboer, 2005). Además, los GR participan en el desencadenamiento de mecanismos de retroalimentación negativa que participan en la terminación de la liberación de glucocorticoides (Herman, Mcklveen, Solomon, Carvalho-Netto, & Myers, 2012). Los componentes funcionales involucrados en este haz de retroalimentación negativa incluyen al núcleo paraventricular del hipotálamo (Di, Malcher-Lopes, Halmos, & Tasker, 2003; Di, Malcher-Lopes, Marcheselli, Bazan, & Tasker, 2005; Evanson, Tasker, Hill, Hillard, & Herman, 2010; Nahar et al., 2015); el complejo basolateral de la amígdala (Hill & Tasker, 2012; Karst, Berger, Erdmann, Schütz, & Joëls, 2010; Tasker & Herman, 2011); el hipocampo (Furay, Bruestle, & Herman, 2008; Tasker & Herman, 2011; M. Wang et al., 2012) y la corteza prefrontal (Hill et al., 2011).

### **III. La exposición a olor de depredador como una amenaza contra la vida**

Los modelos murinos son sumamente útiles para comprender la neurobiología del estrés porque permiten el análisis de relaciones causales entre variables y la implementación de intervenciones invasivas que aportan mayor certidumbre sobre los procesos fisiológicos involucrados. La validez de un modelo de estrés agudo se rige en parte por la relevancia ecológica del estresor utilizado. La exposición a un depredador (como un gato, zorro o serpiente) o una señal olfativa vinculada con este (como el olor proveniente de su orina o collares usados) han sido propuestas como estresores con relevancia filogenética para roedores y son capaz de evocar una respuesta robusta de estrés porque implica una amenaza contra la vida (Daskalakis, Yehuda, & Diamond, 2013; M. A. Matar, Zohar, & Cohen, 2013).

La exposición a señales olfativas de depredadores en roedores induce un incremento en la frecuencia y duración de conductas tipo-ansiedad que se obtuvieron en la prueba de laberinto en cruz elevado y medidas de hiperalertamiento en la prueba de sobresalto acústico (vease Tabla 1). Otros estudios observaron menor interacción y preferencia por animales del sexo opuesto, menor interacción social, mayor agresión y anhedonia (Cohen et al., 2012; Neumann et al., 2011). Los efectos conductuales son acompañados por una desregulación en la liberación de corticosterona y una mayor presencia de mediadores inflamatorios en el cerebro (Cohen et al., 2011; Fenchel et al., 2015; Neumann et al., 2011).

Una exposición a la orina de lince induce una respuesta robusta e inmediata de CRF en PVN que se complementa con un incremento de ACTH y corticosterona en plasma (Kondoh et al., 2016; Whitaker & Gilpin, 2015). Un estudio reporta que la vía bulbo olfatorio-corteza-amígdala-hipotálamo participa en la respuesta de estrés a la exposición de orina de lince. El uso de trazadores virales retrógrados inyectados en las neuronas que secretan CRF en el núcleo PVN del hipotálamo demostró que esta área recibe proyecciones monosinápticas de la amígdala medial (MA, por sus siglas en inglés). En turno, se encontró que la MA esta inervada por proyecciones del área de transición amigdalopiriforme (AmPir) de la corteza olfativa. La exposición a la orina de

lince induce un incremento significativo en marcadores de actividad en neuronas con el rastreador viral del área AmPir y no en otras áreas de la corteza olfatoria. Este efecto no se demostró en animales expuestos a la orina de conejo. La activación quimiogénica de MA o AmPir induce un incremento en c-Fos en las neuronas liberadoras de CRF en el núcleo PVN. A nivel sistémico, la inhibición viral del área AmPir en animales expuestos a la orina de lince drásticamente reduce la respuesta hormonal al estresor (Kondoh et al., 2016). Es importante indicar que la inhibición del área AmPir no reduce la duración de la conducta de congelamiento, la cual indica que las vías que afectan el eje HPA son distintas. La participación del área periacueductual en la conducta de congelamiento inducidas por vías alternas podría explicar esta observación (Staples, 2010).

Prueba	Medición conductual	Efecto	Ref.
Laberinto en Cruz Elevado	Entradas al brazo abierto	(↓)	A, B, C, F
	Duración de permanencia en el brazo abierto	(↓)	A, B, C, E, F, G, I
Campo abierto	Duración de congelamiento	(↑)	H
	Erguimiento	(↓)	D, J, K
Mediadores del estrés	CRF	(↑)	I, L
	ACTH	(↑)	C, I, L
	CORT	(↑)	B, C, E, I, J, L

*Tabla 1. Efectos de la exposición a olor de depredador en paradigmas conductuales y mediciones de fisiológicas en roedores. (A) Hacquemand, Choffat, Jacquot, & Brand, 2013; (B) Matar, Cohen, Kaplan, & Zohar, 2006; (C) Cohen & Zohar, 2004; (D) Masini et al., 2010; (E) Cohen et al., 2012; (F) Zohar, Matar, Ifergane, Kaplan, & Cohen, 2008; (G) Goswami, Samuel, Sierra, Cascardi, & Paré, 2012; (H) Xu et al., 2012; (I) Whitaker & Gilpin, 2015; (J) Wang et al., 2012; (K) (Clark et al., 2014); (L) (Kondoh et al., 2016).*

#### IV. El sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide se conforma por un grupo de ligandos endógenos (endocannabinoides), sus receptores respectivos y las enzimas involucradas en su síntesis y degradación (Battista, Di Tommaso, Bari, & Maccarrone, 2012; De Petrocellis & Di Marzo, 2009). En neuronas, el sistema endocannabinoide está asociado a la modulación de varios sistemas de neurotransmisión en circuitos involucrados en memoria; ansiedad; control del apetito; sueño; comportamiento motor y las respuestas neuroendocrinas (De Bitencourt, Pamplona, & Takahashi, 2013; E M Marco et al., 2011; Prospéro-García, Amancio-Belmont, Becerril-Meléndez, Ruiz-Contreras, & Méndez-

Díaz, 2016; Svíženská, Dubový, & Šulcová, 2008). En células de origen mieloide, la señalización endocannabinoide está vinculado con efectos antiinflamatorios (Stella, 2009; Vázquez et al., 2015).

La anandamida (*N*-araquidonoiletanolamina, AEA) y la oleamida (Cis-9,10-octadecenoamida, OEA) son ligandos endógenos de origen lipídico que comparten similitudes en su estructura química (Farrell & Merkler, 2008; Leggett et al., 2004). La AEA se reconoce ampliamente como el primer endocannabinoide aislado (Devane et al., 1992) y la OEA fue aislada unos años después en el cerebro de gatos privados de sueño (Cravatt et al., 1995). La anadamida pertenece a la familia de *N*-aciletanolaminas (NAEs), que incluyen además a la *N*-oleoiletanolamina y *N*-palmitoiletanolamina por su origen químico (De Petrocellis & Di Marzo, 2009). La vía de biosíntesis más ampliamente aceptada para NAEs implica la escisión de *N*-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) por una fosfolipasa D específica a NAPE (NAPE-PLD). Una de las vías de biosíntesis que ha sido propuesta para oleamida involucra la amidación directa de los tioésteres de Acetil coenzima A por el amoníaco catalizado por el citocromo c. En cuanto a su degradación, se ha determinado que AEA y OEA comparten la misma vía por la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, por sus siglas en inglés) (Farrell & Merkler, 2008).

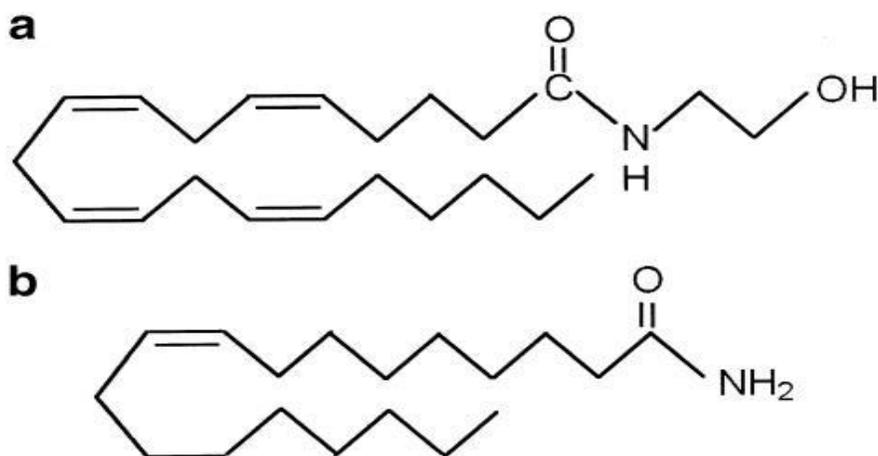


Figura 1. Estructura molecular de (a) anandamida y (b) oleamida. (obtenida de Fowler, 2004).

#### IV. a. Anandamida

La producción de AEA se lleva a cabo en las neuronas postsinápticas y se libera como mensajero retrogrado hacia las neuronas presinápticas. Dos mecanismos de inactivación han sido identificados: hidrolización intracelular por medio del enzima FAAH que puede ser facilitada por recaptura presináptica por un transportador (De Petrocellis & Di Marzo, 2009; Howlett et al., 2002). La AEA se acopla de manera principal al CB1 ( $K_d = \sim 80$  nM) y al receptor a cannabinoides 2 (CB2,  $K_d = 500$  nM) (Palmer, Thakur, & Makriyannis, 2002). Con menor afinidad, la AEA se acopla a los receptores activados por el proliferador de peroxisoma (PPAR $\alpha$ ,  $K_d = 20$   $\mu$ M y PPAR $\gamma$ ,  $K_d = 10$   $\mu$ M) (O'Sullivan, 2009) y al receptor de potencial transitorio vallinoide 1 (TRPV1,  $K_d \sim 2$   $\mu$ M) (Starowicz, Nigam, & Di Marzo, 2007).

#### IV.b. Oleamida

Los estudios sobre la OEA son escasos, por lo que implica que mucho se desconoce sobre sus propiedades farmacológicas y las particularidades de su biosíntesis en vivo. La habilidad de la OEA para acoplarse a los receptores a cannabinoides permanece como tema controversial. En ensayos de acoplamiento, la OEA demostró un valor de  $K_i$  de 44 $\mu$ M al CB1, que es 550 veces menor afinidad que los exhibido por AEA en condiciones de ensayo idénticas (Boring, Berglund, & Howlett, 1996). Otro estudio confirma la menor afinidad de OEA en relación a AEA sobre el receptor CB1 por los valores de  $K_i$  en la inhibición del acoplamiento del agonista [ $^3$ H]CP55,940 (1.14  $\mu$ M y 428 nM respectivamente) (Leggett et al., 2004). El mismo estudio demostró que la OEA tiene una afinidad y actividad selectiva al receptor CB1 sobre el receptor CB2. Los efectos de la OEA también podrían estar mediados por modulación alostérica de los receptores GABA $_A$  (receptor a GABA) y los receptores 5-HT $_{1A}$ , 5-HT $_{2A/2C}$  y 5-HT $_7$  (receptores a serotonina, Fedorova et al., 2001; Hedlund, Carson, Sutcliffe, & Thomas, 1999; Mueller & Driscoll, 2009).

#### IV.c. CB1

El CB1 es el receptor metabotrópico más abundante del cerebro en mamíferos y expresado en su mayoría en las neuronas presinápticas y astrocitos (Iannotti, Di Marzo, & Petrosino, 2016). La activación del receptor CB1 en neuronas presinápticas desencadena una cascada dependiente de una proteína  $G_{i/o}$ , la cual tiene el efecto de inhibir la adenilato ciclasa y canales de calcio dependientes de voltaje (Fratta & Fattore, 2013; Ohno-Shosaku & Kano, 2014). La interrupción de entrada de iones de calcio a la célula presináptica tiene como consecuencia final la inhibición de la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico (Ohno-Shosaku & Kano, 2014). Dependiendo de la neurona presináptica donde se encuentra el receptor CB1, se puede inhibir la liberación de acetilcolina, glutamato, norepinefrina, dopamina o GABA (Mukhopadhyay, Shim, Assi, Norford, & Howlett, 2002; Pertwee et al., 2010; Svíženská et al., 2008).

#### IV.d. TRPV1

Los receptores TRPV1 son canales no-específicos para cationes que pueden ser activados por el acoplamiento de ligandos endógenos (como la AEA) y exógenos (como la capsaicina), y la apertura del canal lleva al ingreso de calcio y una potenciación de la señalización glutamatérgica (Moreira, Aguiar, Terzian, Guimaraes, & Wotjak, 2012). La expresión del TRPV1 en neuronas es mucho menor que el CB1 y se restringe a ciertas áreas del cerebro, como el hipotálamo (Cavanaugh et al., 2011). Un estudio que implemento técnicas de electrofisiología *in vitro* demostró que capsaicina incremento la frecuencia de corrientes postsinápticas excitadoras en neuronas del PVN, mientras que el un fármaco antagonista tuvo el efecto contrario (Li, Chen, & Pan, 2004).

### V. El sistema endocannabinoide y la respuesta de estrés

Al nivel conductual, bajas dosis de agonistas del receptor CB1 en paradigmas que miden conductas tipo-ansiedad provocaron efectos ansiolíticos (Ruehle, Rey, Remmers, & Lutz, 2012). De manera complementaria, altas dosis tuvieron efectos ansiogénicos (Patel & Hillard, 2006). La administración sistémica de anandamida demuestra también

tener un efecto bifásico dependiente de dosis sobre la conducta exploratoria y conducta tipo-ansiedad en campo abierto (Bruijnzeel et al., 2016). Se ha propuesto que el efecto ansiolítico y ansiogénicos de la anandamida podría ser explicado por la afinidad dual al CB1 y al TRPV1 respectivamente (Moreira, Aguiar, Terzian, Guimaraes, & Wotjak, 2012).

Estudios farmacológicos que han evaluado los efectos de cannabinoides exógenos en la actividad del eje HPA reportaron resultados controversiales. La administración sistémica de  $\Delta$ 9-THC (el componente psicoactivo de la marihuana) incrementa los niveles de corticosterona y ACTH (Manzanares, Corchero, & Fuentes, 1999; Schramm-Sapyta et al., 2007; Michel A. Steiner & Wotjak, 2008) en diferentes cepas de roedores. Curiosamente, la administración sistémica del antagonista/agonista inverso del CB1, SR141716 (rimonabant), también ha demostrado incrementar el nivel de corticosterona en plasma (Roberts, Stuhr, Hutz, Raff, & Hillard, 2014; M A Steiner et al., 2008; Wade, Degroot, & Nomikos, 2006; Wenger, Jamali, Juanéda, Léonardelli, & Tramu, 1997) y liberación de ACTH en roedores (Manzanares et al., 1999). Estas discrepancias podrían ser atribuidas a las dosificaciones, régimen de administración, condiciones experimentales y la especie evaluada (Bambico et al., 2010; Zanettini et al., 2011). Es importante destacar que ninguno de los estudios recién mencionados sobre la actividad del eje HPA en relación a la administración de  $\Delta$ 9-THC implementó un protocolo experimental de estrés.

El estudio de Patel et al. (2004) fue uno de los primeros en evidenciar que la administración sistémica de un agonista cannabinoide durante una condición estresante induce un efecto bifásico dependiente de dosis sobre la actividad del eje HPA que se distingue de una administración con un antagonista. La administración de rimonabant inmediatamente anterior a la restricción de movimiento incrementó de manera dosis-dependiente la concentración de corticosterona en plasma. En la misma condición experimental, el tratamiento previo con CP55940 (agonista al receptor CB1), AM404 (inhibidor del transportador de anandamida) y URB597 (inhibidor de la FAAH) demostraron efectos diferenciales dependientes de la dosis. El agonista demostró un efecto bifásico: a dosis bajas se redujo la concentración de corticosterona en plasma y un incremento

con una dosis mayor. El inhibidor del transportador logró inhibir casi por completo el incremento de corticosterona en la dosis baja, pero no demostró una diferencia significativa con la dosis alta. Por último, el inhibidor del enzima degradante logró atenuar significativamente los niveles de corticosterona en plasma en ambas dosis.

Una combinación de estudios farmacológicos y genéticos han permitido elaborar propuestas sobre las estructuras involucradas y los mecanismos subyacentes en la regulación del eje HPA por parte del sistema endocannabinoide (Crosby & Bains, 2012). El haz de retroalimentación negativa sobre la liberación de CRF en el hipotálamo depende la actividad no-genómica de los receptores GR (de Kloet et al., 2008; Di et al., 2003, 2005). Los glucocorticoides promueven la síntesis de endocannabinoides, que a su vez inhibe las inervaciones excitatorias sobre las neuronas parvocelulares secretoras de CRF (Di et al., 2003, 2005). La regulación por endocannabinoides del eje HPA también se ejerce sobre sus componentes periféricos. El receptor CB1 se expresa en la glándula adrenal y su activación modula la producción y secreción de glucocorticoides (Ziegler et al., 2010). La administración de anandamida en células NCI-H295R (provenientes de tejido adrenal humano) redujo de manera significativa niveles basales de aldosterona y secreción de cortisol. Además, la esteroidogénesis y secreción de cortisol inducida por angiotensina II y forskolina fue inhibida de manera significativa por anandamida (Ziegler et al., 2010).

La liberación tónica de endocannabinoides en el complejo basolateral de la amígdala (BLA) se ha propuesto como un mecanismo regulatorio basal sobre la excitabilidad del eje HPA (Gunduz-Cinar, Hill, McEwen, & Holmes, 2013; Hill & Tasker, 2012; Lutz et al., 2015). El receptor CB1 en el complejo BLA se expresa en interneuronas GABAérgicas con colecistoquinina (Katona et al., 2001; Marsicano & Lutz, 1999). La administración local de antagonistas del receptor CB1 en BLA incrementa la liberación de corticosterona en animales no estresados (Hill et al., 2009; Qin et al., 2015).

El tono basal de anandamida que regula la excitabilidad de la amígdala es afectado el estrés. Se ha observado que estresores agudos inducen una reducción en el

contenido de anandamida en muestras de tejido amigdalino asociado con un incremento en la actividad enzimática de FAAH (Matthew N Hill, McLaughlin, et al., 2009; Rademacher et al., 2008). En un estudio con ratones de la cepa ICR, se observó que la reducción en anandamida por estrés en el cerebro esta correlacionada con la manifestación de conductas tipo-ansiedad en la prueba de luz-oscuridad y este efecto es revertido por la inhibición farmacológica de FAAH (Bluett et al., 2014). El incremento en la función enzimática de FAAH durante a la exposición a estresores es dependiente del receptor CRFR1 (receptor a corticotopina) en neuronas piramidales glutamatérgicas (Gray et al., 2015). Estas líneas de evidencia permiten sugerir que la anandamida puede actuar como un importante amortiguador para la respuesta de estrés (Hill & Tasker, 2012).

# Capítulo 3

**Problemática, Pregunta,  
Justificación, Objetivo e Hipótesis**

## **Planteamiento de Problema**

El sistema endocannabinoide está involucrado en la modulación de la respuesta de estrés, donde la AEA parece jugar un papel de “amortiguación” para disminuir la probabilidad de un desenlace del eje HPA. Se desconoce si los endocannabinoides podrían prevenir las alteraciones conductuales inducidas por un estresor agudo que amenaza contra la vida.

## **Pregunta general**

- ¿Los endocannabinoides pueden prevenir las alteraciones inducidas por estrés?

## **Preguntas específicas**

- ¿La AEA y/o OEA pueden prevenir conductas tipo-ansiedad inducidas por el estresor?
- ¿La AEA y/o OEA pueden prevenir alteraciones en la exploración de objetos novedosos inducidos por el estresor?
- ¿Los efectos de la anandamida y la oleamida son dependientes de dosis?

## **Justificación**

El estrés se ha identificado como un factor de riesgo para el desarrollo de varias psicopatologías (De Quervain et al., 2016; Milliken, Auchterlonie, & Hoge, 2007). La modulación farmacológica de la respuesta de estrés se ha descrito como una estrategia viable para prevenir las consecuencias del estrés (Zohar et al., 2009). Además, discernir si existen diferencias entre anandamida y oleamida en un modelo animal permitirá desglosar la contribución de estos dos endocannabinoides a la regulación de la respuesta de estrés para mejor fundamentar tratamientos farmacológicos en humanos.

## **Objetivo**

### Objetivo general

Evaluar los posibles efectos preventivos en la conducta y en la memoria mediados por una administración aguda de anandamida u oleamida anterior a un protocolo de exposición a olor de depredador.

### Objetivos específicos

- Evaluar los efectos de la anandamida y oleamida en los índices de conductas tipo-ansiedad en campo abierto y laberinto cero elevado.
- Evaluar los efectos de anandamida y oleamida en la memoria de reconocimiento.
- Evaluar si los posibles efectos inducidos por anandamida y oleamida son dependientes de la dosis.

## **Hipótesis**

Se esperó que la administración aguda de anandamida y oleamida produjera un efecto preventivo. La prevención se definió como la reversión de los cambios conductuales inducidos por el estresor. Por lo tanto, se debieron cumplir dos requisitos: 1) el cambio inducido por el estresor debió ser estadísticamente significativo contra el grupo que no fue expuesto al estresor y 2) el tratamiento debió revertir los cambios inducidos de manera significativa.

1. Si anandamida y oleamida tuvieran efectos preventivos, entonces se esperaba una reducción en los índices de ansiedad en la prueba de campo abierto y en el laberinto cero elevado.
2. Si anandamida y oleamida tuvieran efectos preventivos, entonces se esperaba una mejor ejecución en la prueba de reconocimiento de objetos.
3. Si los efectos de anandamida y oleamida fueran dosis-dependiente, entonces se esperaba una ejecución diferencial por cada dosis en las pruebas implementadas.

# Capítulo 4

## Método

## Sujetos

Se utilizaron 64 ratas macho adultas (3 meses, 300-350 gramos) de la cepa Wistar. Todos los sujetos fueron alojados en cajas comunales con capacidad de cinco animales. El ciclo de sueño-vigilia fue de doce horas e invertido. Todos los protocolos implementados en este estudio fueron diseñados con el interés de minimizar el sufrimiento animal y satisfacer todas las necesidades de los sujetos experimentales para garantizar su salud y bienestar. Como consecuencia contemplada, el uso de animales se acopló a todas las normas éticas oficiales sobre el trato animal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y a los artículos 77 a 80 del *Código ético del psicólogo* (Sociedad Mexicana de Psicología, 2007).

## Fármacos

La anandamida (grado de pureza  $\geq 99\%$ , Tocris Bioscience©) y oleamida (grado de pureza  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich©) fueron disueltos en vehículo compuesto por 70% solución salina y 30% de Dimetilsulfóxido (DMSO,  $\geq 99\%$ , Tocris Bioscience©). El volumen de administración para todas las inyecciones fue de 1 ml.

## Procedimiento experimental

Las dosis fueron escogidas de acuerdo a estudios previos basados en los efectos de la administración aguda de anandamida y oleamida sobre conductas tipo-ansiedad y locomoción (Bruijnzeel et al., 2016; Hill & Gorzalka, 2005; Mallet & Beninger, 1998). El volumen de administración para todas las inyecciones fue de 1 ml. Ocho grupos fueron derivados de la población total: control sin estresor (n=10); vehículo (n=9); anandamida 1 mg/kg (n=8); anandamida 2 mg/kg (n=8); anandamida 4 mg/kg (n=7); oleamida 1 mg/kg (n=7); oleamida 2 mg/kg (n=7); y oleamida 4 mg/kg (n=8). Todos los grupos fueron expuestos al olor de depredador (excepto el grupo control negativo) y evaluados con una batería conductual.

Grupo	(n=)
CON	10
VEH	9
AEA 1mg/kg	8
AEA 2mg/kg	8
AEA 4mg/kg	7
OEA 1mg/kg	7
OEA 2mg/kg	7
OEA 4mg/kg	8

Tabla 2. Grupos.

El experimento fue diseñado como un estudio prospectivo para evaluar los efectos preventivos de la intervención farmacológica (Cohen et al., 2012). Se dividió el experimento en dos fases que abarcaron 11 días naturales (Tabla 3). En la primera fase, los animales fueron expuestos al estresor siendo previamente inyectados por vía intraperitoneal (i.p.) con vehículo o fármaco. La batería conductual se implementó en la segunda fase, que comenzó 24 horas después del estresor y tuvo una duración de 10 días. La secuencia de las pruebas conductuales fue contrabalanceada entre grupos para descartar efectos inducidos por la secuencia temporal de las pruebas. Todas las manipulaciones experimentales se hicieron entre 12:00 y 16:00 p.m. para minimizar el impacto de fluctuaciones circadianas del sistema endocannabinoide (Rueda-Orozco, Montes-Rodriguez, Ruiz-Contreras, Mendez-Diaz, & Prospero-Garcia, 2017).

Días	Fase 1	Fase 2									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

*Tabla 3. Procedimiento experimental*

### Exposición a olor de depredador

Los animales fueron expuestos a orina de lince (10 ml. contenida en una pequeña esponja dentro de un recipiente con agujeros) durante 10 minutos en una caja con las dimensiones de 60cm x 30cm x 40cm. La ubicación del recipiente con orina fue alternada por cada animal. El cuarto donde se expusieron los animales fue distinto al que se utilizó para la prueba conductuales.

### Pruebas conductuales

*Laberinto cero elevado.* La prueba se basa en dos tendencias innatas en conflicto: la exploración de un nuevo entorno y la evitación de espacios elevados y abiertos que implican un riesgo para el animal. El laberinto cero elevado es una modificación del laberinto en cruz elevado y tiene la ventaja de carecer de una zona central ambigua característica de este laberinto (Shepherd, Grewal, Fletcher, Bill, & Dourish, 1994). El instrumento consiste en una plataforma anular elevada (64 cm del piso) con dos brazos abiertos y dos brazos cerrados, con diámetro de 120 cm. Los animales fueron colocados en un brazo cerrado y se les permitió permanecer en el laberinto por cinco minutos. Las conductas registradas fueron: 1) duración de permanencia en los brazos abiertos; 2) número de cruces desde brazos cerrados hacia abiertos y 3) conducta de evaluación ambiental desde brazo cerrado al abierto. La última conducta se definió como la exploración del brazo abierto sin haber cruzado con las cuatro patas.

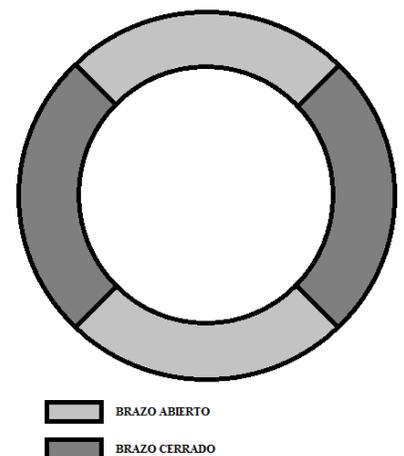


Figura 2. Laberinto cero elevado.

*Campo abierto.* Esta prueba aprovecha la tendencia de los roedores por explorar lugares novedosos y la evitación de lugares abiertos para medir índices de actividad locomotora y conducta tipo-ansiedad. El instrumento consta de una caja de plexiglás con superficie de 100cm x 100cm, dividido en 16 cuadrantes de 25cm x 25cm. Se categorizó la superficie de la caja en dos áreas: centro y periferia. Los animales fueron puestos en el centro de la caja y se les permitió permanecer en el aparato por cinco minutos. Se midieron el total de cruces, cruces hacia el centro, duración en el centro. Además, se midió el número y duración de congelamiento (definido como la ausencia de movimientos excepto por los requeridos para respirar), inmovilidad y acicalamiento. Solo se registraron el número de erguimientos.

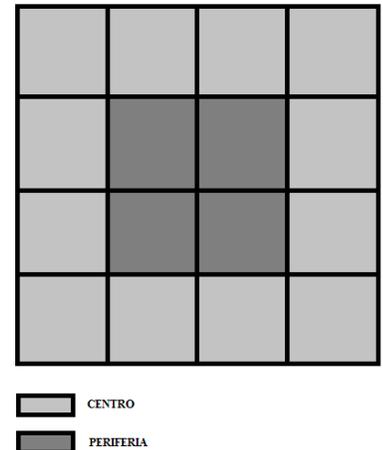


Figura 3. Caja de campo abierto.

*Reconocimiento de objetos.* Esta prueba presenta una medida de memoria por reconocimiento (Leger et al., 2013). En dos días consecutivos, se les presentó a las ratas dos objetos idénticos (en textura, tamaño, forma y color) como ensayos de familiarización. En el tercer día, se cambió uno de los objetos familiares por uno novedoso y se midió 1) la duración de exploración del objeto novedoso y 2) duración de exploración del objeto familiar. Exploración se definió como la orientación del hocico hacia un objeto a una distancia de  $\leq 1$  cm, mientras que sentarse sobre el objeto no se consideró una exploración (Antunes & Biala, 2012). Se utilizó la misma caja que la de campo abierto y para prevenir efectos de habituación al contexto, la evaluación de campo abierto siempre precedió por 24 horas al primer día de reconocimiento de objetos.

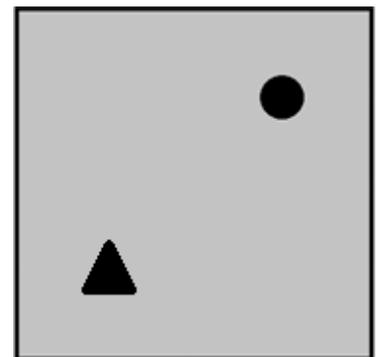


Figura 4. Reconocimiento de objetos y ubicaciones de objetos en el día prueba.

## Análisis conductual

Las conductas que fueron observadas en cada prueba conductual y se interpretaron a partir de los resultados de estudios previos. En la Tabla 4 se reporta las medidas de todas las pruebas conductuales que se utilizaron en el presente estudio para mostrar un punto de referencia para evaluar el impacto del estresor.

Prueba	Medición conductual	Efecto	Ref.
Laberinto Cero Elevado	Entradas al brazo abierto	(↓)	A, C, E
	Duración de permanencia en el brazo abierto	(↓)	A, B, C, D, E
	Evaluación ambiental	(↓)	A, D
Campo abierto	Número total de cruces	(↓)	K
	Cruces al centro	(↓)	F
	Duración de permanencia en el centro	(↓)	B, E, K
	Duración de congelamiento	(↑)	L
	Numero de eventos de congelamiento	(↑)	L
	Erguimiento	(↓)	H, I, K
	Duración de acicalamiento	(↑)	G
	Numero de eventos de acicalamiento	(↑)	G, J
Reconocimiento de objetos	Duración de exploración del objeto novedoso	(↓)	F, M, P
	Preferencia al objeto novedoso	(↓)	M, N, O, P

*Tabla 4. Efectos de estresores y la administración de agentes ansiogénicos en roedores sobre varias mediciones conductuales en las pruebas de laberinto cero elevado, campo abierto y reconocimiento de objetos. El conjunto de estas medidas proporciona el fenotipo tipo-ansiedad inducido por estrés. (A) Braun, Skelton, Vorhees, & Williams, 2011; (B) Whitaker & Gilpin, 2015; (C) Kulkarni, Singh, & Bishnoi, 2007; (D) Shepherd et al., 1994; (E) Yang et al., 2015; (F) Kalueff & Tuohimaa, 2004; (G) Kalueff et al., 2015; (H) Perrot-Sinal, Gregus, Boudreau, & Kalynchuk, 2004; (I) Cassano et al., 2011; (J) Agarwal, Halvorson, & Legradi, 2005; (K) Zhang, Shang, Xiao, Yu, & Zhang, 2017; (L) Roelofs, 2017; (M) Eagle, Fitzpatrick, & Perrine, 2013; (N) (Baker & Kim, 2002); (O) (S. Li, Fan, Wang, & Tang, 2012); (P) (Goswami et al., 2012).*

### **Análisis estadístico**

Todos los datos fueron expresados como medias ( $\pm$  error estándar). Las pruebas estadísticas implementadas para las medidas de laberinto cero elevado y campo abierto fueron las mismas. La comparación entre los grupos control (CON y VEH) se hicieron con pruebas t o con la U de Mann-Whitney sólo si los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad. Se utilizó la ANOVA de una vía (factor GRUPO) acompañada del método *post-hoc* de Dunnett (análisis contra el control) para analizar los datos de los grupos AEA y OEA. Cuatro ANOVAs fueron implementadas para cubrir este análisis, dado que cada grupo experimental fue comparado a cada grupo experimental de manera independiente. Los grupos AEA y OEA fueron comparados entre si con un ANOVA de una vía acompañada por la prueba *post-hoc* de Tukey. Si los datos no cumplían el supuesto de normalidad para la ANOVA, se procedió con un análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis acompañado por el método *post-hoc* de Dunn. Los resultados de reconocimiento de objetos fueron evaluados con un ANOVA de dos vías (factor GRUPO y factor OBJETO) acompañado por la prueba *post-hoc* de Tukey.

# Capítulo 5

## Resultados

### Laberinto cero elevado

Permanencia en brazo abierto. La prueba U de Mann-Whitney no demostró diferencias significativas entre los grupos CON y VEH. Además, las tres dosis de AEA no se distinguieron de los grupos control. Ninguna de las dosis de OEA demostró diferencias contra el grupo CON. A pesar de esto, el análisis de varianza del grupo VEH y las tres dosis de OEA si reportó un efecto del factor GRUPO ( $F_{[3,31]}= 4.833$ ,  $p<0.008$ ). OEA 1 mg/kg incremento ( $p<0.05$ ) el tiempo de permanencia en el brazo abierto en relación al grupo VEH. El análisis de varianza que incluye las curvas de AEA y OEA mostró un efecto del factor GRUPO ( $F_{[5,44]}= 2.508$ ,  $P = 0.047$ ). OEA 1 mg/kg tuvo una mayor permanencia ( $p<0.05$ ) en comparación a las tres dosis de AEA.

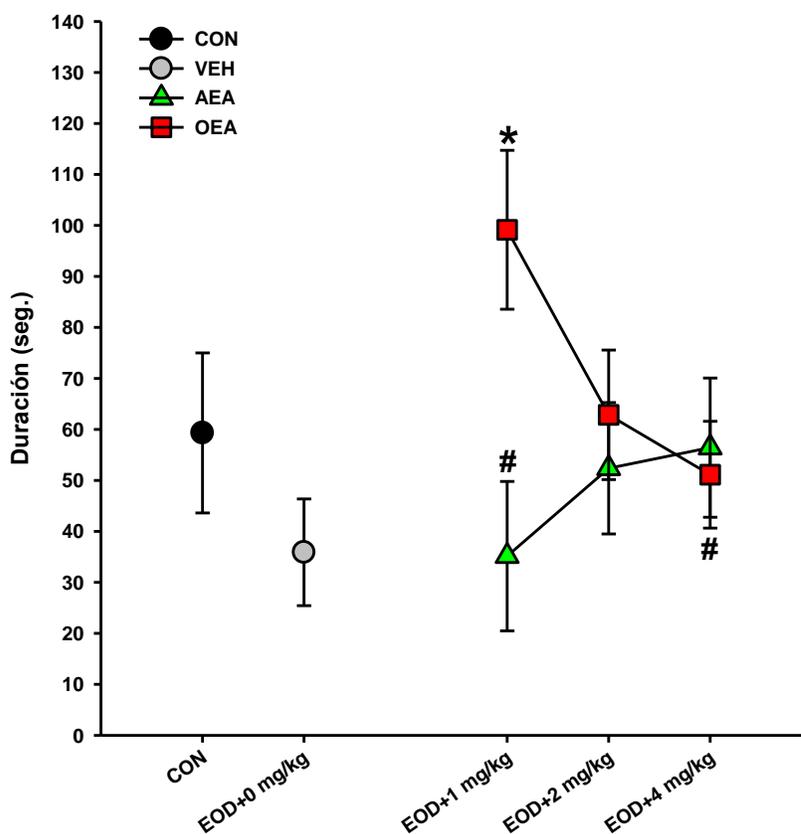


Figura 5. Tiempo de permanencia en el brazo abierto del laberinto cero. Todos los símbolos señalan una diferencia significativa ( $p<0.05$ ): (\*) vs. VEH y (#) vs. AEA 1 mg/kg.

Cruces al brazo abierto. La prueba t de muestras independientes no reportó diferencias significativas entre los grupos CON y VEH, a pesar de que la media parece disminuir a causa del estresor. Las tres dosis de AEA no demostraron diferencias con ambos grupos control, mientras que ninguna dosis de OEA tuvieron diferencias significativas con el grupo CON. Complementando a los resultados de la permanencia en el brazo abierto, el análisis de varianza por rangos que incluye a la curva de OEA y el grupo VEH si reportó un efecto del factor GRUPO ( $H_{[3,31]} = 8.092$ ,  $P = 0.044$ ). OEA 1 mg/kg demostró un mayor número de cruces en relación al grupo VEH. El análisis de varianza que incluye las curvas de AEA y OEA reportó un efecto del factor GRUPO ( $F_{[5,44]} = 3.605$ ,  $P = 0.009$ ). El grupo OEA 1 mg/kg demostró un mayor número de cruces ( $p < 0.05$ ) en comparación todas las dosis de AEA.

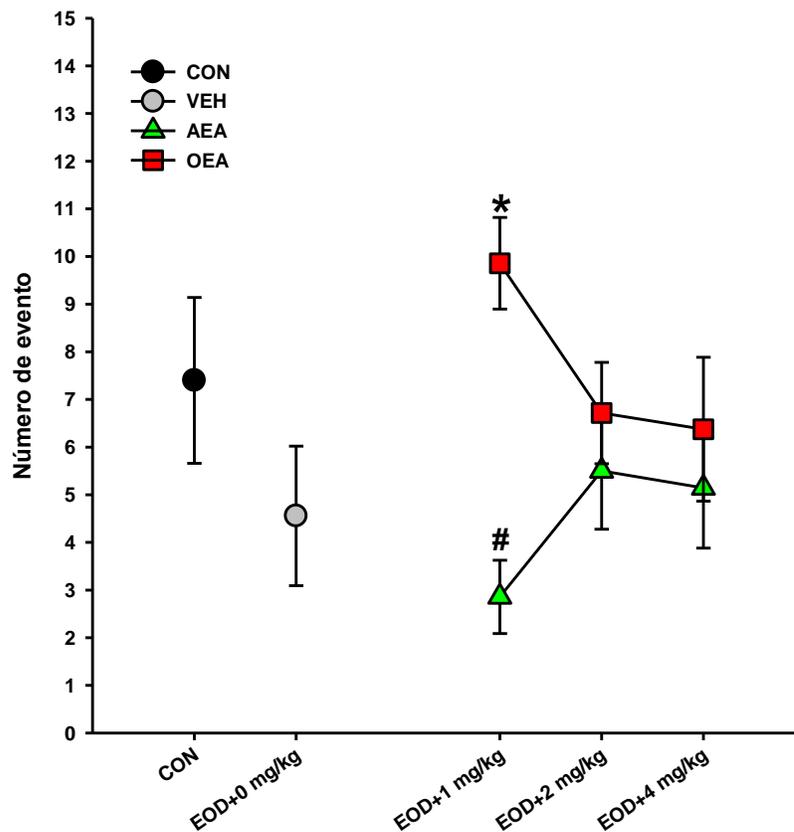


Figura 6. Cruces al brazo abierto en laberinto cero. Todos los símbolos señalan una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ): (\*) vs. VEH y (#) vs. AEA 1 mg.

Evaluación ambiental. Esta conducta exploratoria estereotipada en roedores se presenta desde el brazo cerrado hacia el abierto (sin cruzar con las cuatro patas) y ha sido interpretada como una evaluación de riesgo (Walf & Frye, 2007). El estresor no indujo cambios en esta medida. Ninguna de las dosis de AEA se distinguieron de los grupos CON y VEH, mientras que ninguna de las dosis de OEA se diferenció del grupo VEH. En análisis de varianza que incluyó a la curva de OEA y el grupo CON se demostró un efecto significativo del factor GRUPO ( $F_{[3,31]} = 3.072$ ,  $P = 0.044$ ). El grupo OEA 2 mg/kg fue el único que incrementó ( $p < 0.05$ ) la duración de la conducta contra el grupo CON. No hubo ninguna diferencia entre las curvas de AEA y OEA.

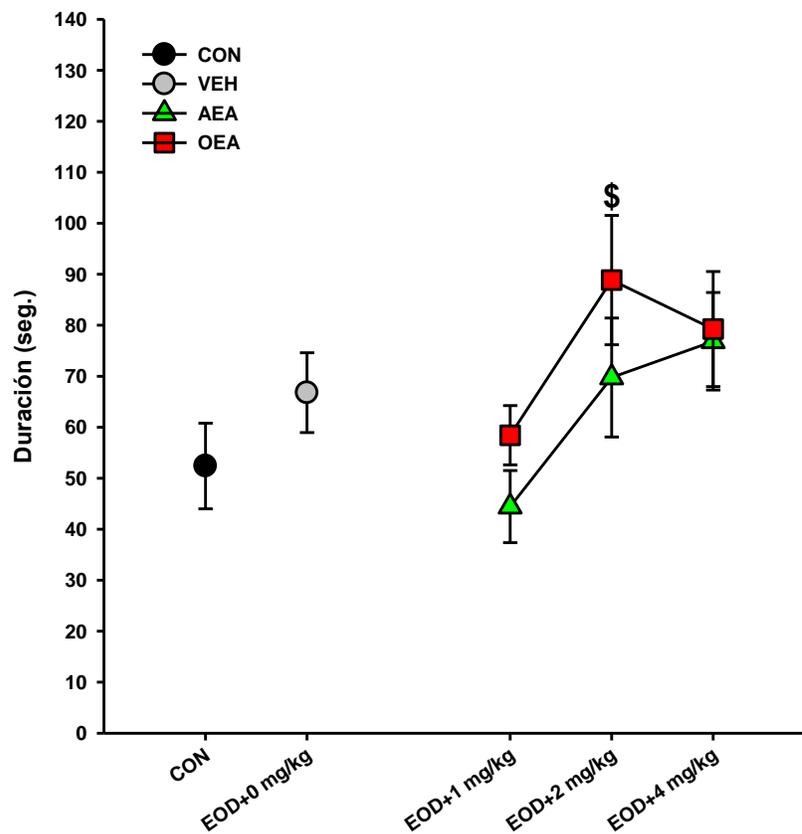


Figura 7. Duración de evaluación ambiental en el laberinto cero. (\$) indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) vs. CON.

## Campo Abierto

Cruces totales. El estresor indujo una disminución significativa ( $t = 2.998$ ,  $p < 0.05$ ) en el número de cruces. Un análisis de varianza que incluye a las dosis de AEA y CON no reportó diferencias significativas, mientras tanto el análisis que incluye las dosis de AEA y VEH si demostró un impacto del factor GRUPO ( $F_{[3,31]} = 3.519$ ,  $P = 0.028$ ). La prueba post-hoc reveló que las dosis 2 mg/kg y 4 mg/kg, pero no 1 mg/kg, incrementaron de manera significativa ( $p < 0.05$ ) el número de cruces en relación al grupo VEH. Ninguna dosis OEA se distinguió de los grupos CON y VEH y la curva de AEA.

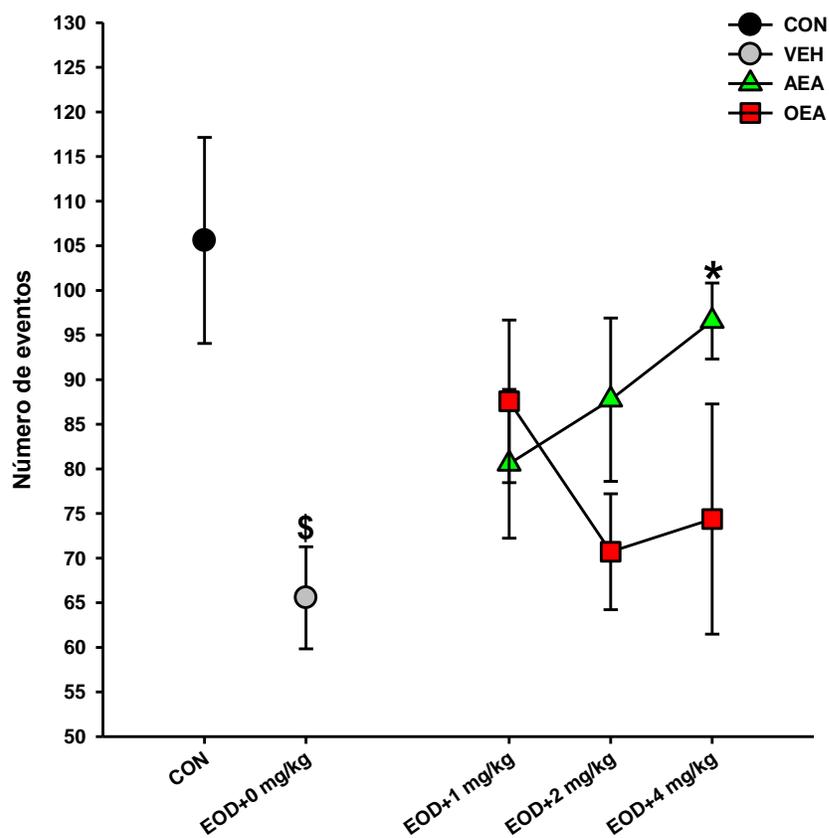


Figura 8. Número de cruces totales en campo abierto. Todos los símbolos señalan una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ): (\$) vs. CON y (\*) vs. VEH.

Cruces al centro. La exposición al estresor parece haber inducido una disminución en el número de cruces hacia el centro, pero esta diferencia no fue significativa ( $t = 1.922$ ,  $P = 0.072$ ). Todas las dosis de AEA no demostraron diferencias significativas contra el grupo CON, mientras que el análisis de varianza de la curva de AEA y VEH si reportaron un impacto del factor GRUPO ( $F_{[3,31]} = 5.193$ ,  $P = 0.006$ ). Los grupos AEA 2 y 4 mg/kg demostraron un mayor número de cruces al centro en comparación al grupo VEH ( $p < 0.05$ ). La curva de OEA no manifestó diferencias con el grupo CON, pero si se reportó un impacto del factor GRUPO en el análisis con el grupo VEH ( $F_{[3,31]} = 3.094$ ,  $P = 0.044$ ). Solamente la dosis menor de OEA mostró un incremento ( $p < 0.05$ ) en el número de cruces en comparación al grupo VEH. Las curvas de AEA y OEA no demostraron diferencias significativas.

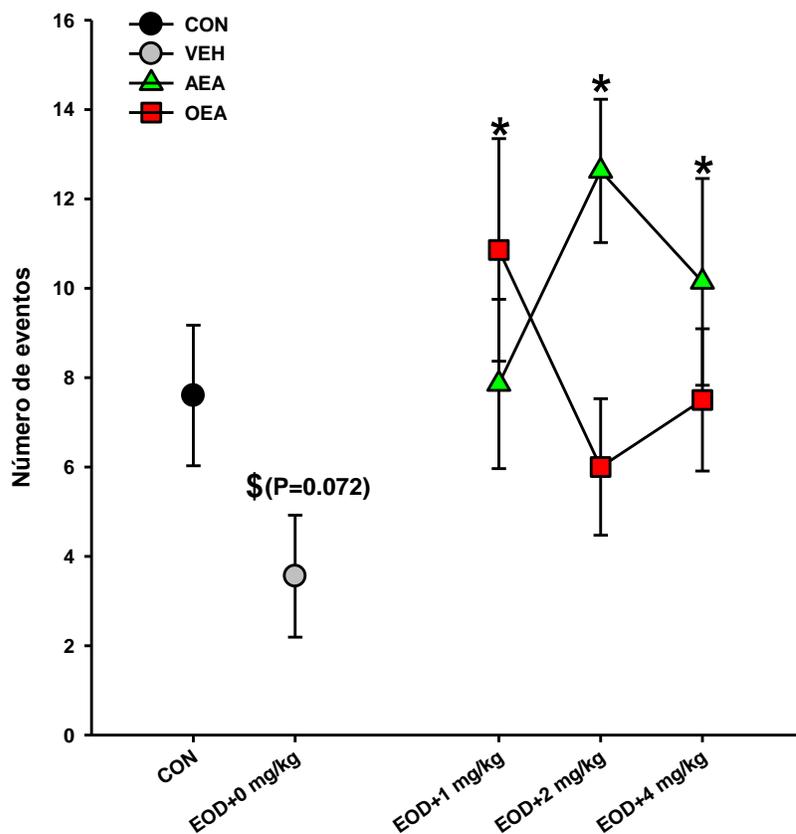


Figura 9. Número de cruces al centro en campo abierto. (\$) indica una diferencia no significativa contra CON y (\*) señala una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) vs. VEH.

Permanencia en el centro. La exposición al estresor indujo una reducción en el tiempo de permanencia en el centro ( $t = 2.517$ ,  $p < 0.05$ ). Las tres dosis de AEA no se diferenciaron del grupo CON, pero el análisis de varianza en rangos de la curva de AEA y el grupo VEH reportó un efecto del factor GRUPO ( $H_{[3,31]} = 14.278$ ,  $P = 0.003$ ). Las dosis 2 y 4 mg/kg, pero no 1 mg/kg, demostraron un incremento ( $p < 0.05$ ) en la permanencia en el centro en relación al grupo VEH. No se presentaron diferencias en la curva de OEA cuando se comparó contra CON, VEH y las tres dosis de AEA.

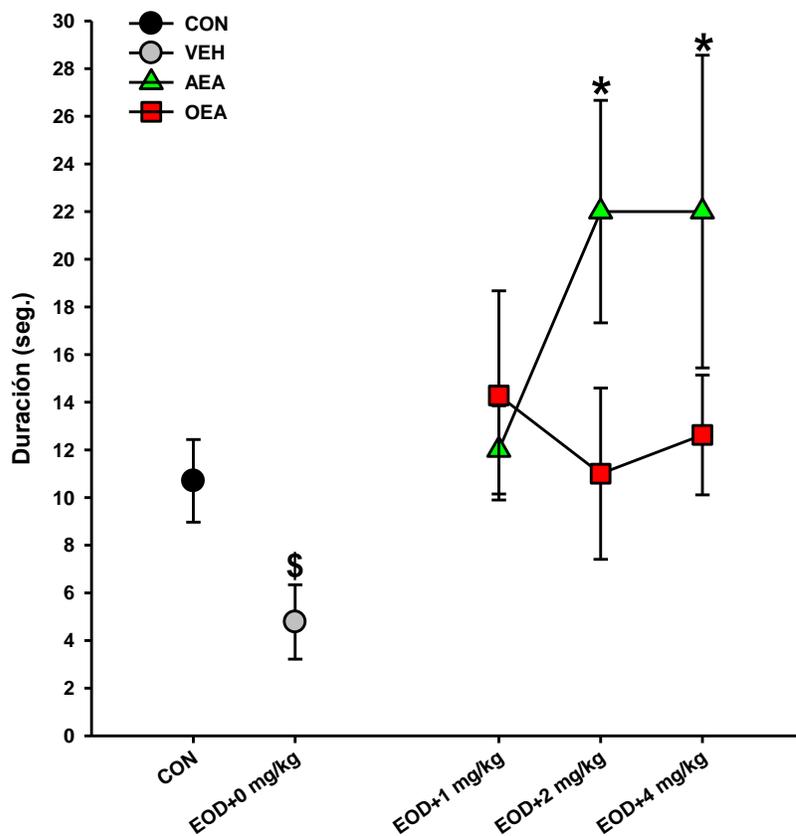


Figura 10. Permanencia en centro en campo abierto. Todos los símbolos señalan una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ): (\$) vs. CON y (\*) vs. VEH.

Duración de Inmovilidad. El estresor parece haber reducido la duración de inmovilidad, aunque esta diferencia no es significativa ( $t = 2.059$ ,  $P = 0.055$ ). La comparación entre el grupo CON y las tres dosis de AEA reveló un impacto del factor GRUPO ( $H_{[3,31]} = 14.278$ ,  $P = 0.003$ ), en el cual las dosis 1 y 2 mg/kg demostraron una menor duración de inmovilidad ( $p < 0.05$ ). No se reportaron diferencias entre las dosis de AEA y el grupo VEH. De manera similar, la comparación de entre el grupo CON y las dosis de OEA mostraron un impacto del factor grupo ( $H_{[3,31]} = 9.718$ ,  $P = 0.021$ ). El análisis post-hoc indicó una menor duración ( $p < 0.05$ ) de inmovilidad en los grupos OEA 1 mg/kg y 4 mg/kg contra el grupo CON, pero ninguna diferencia se manifestó contra el grupo VEH.

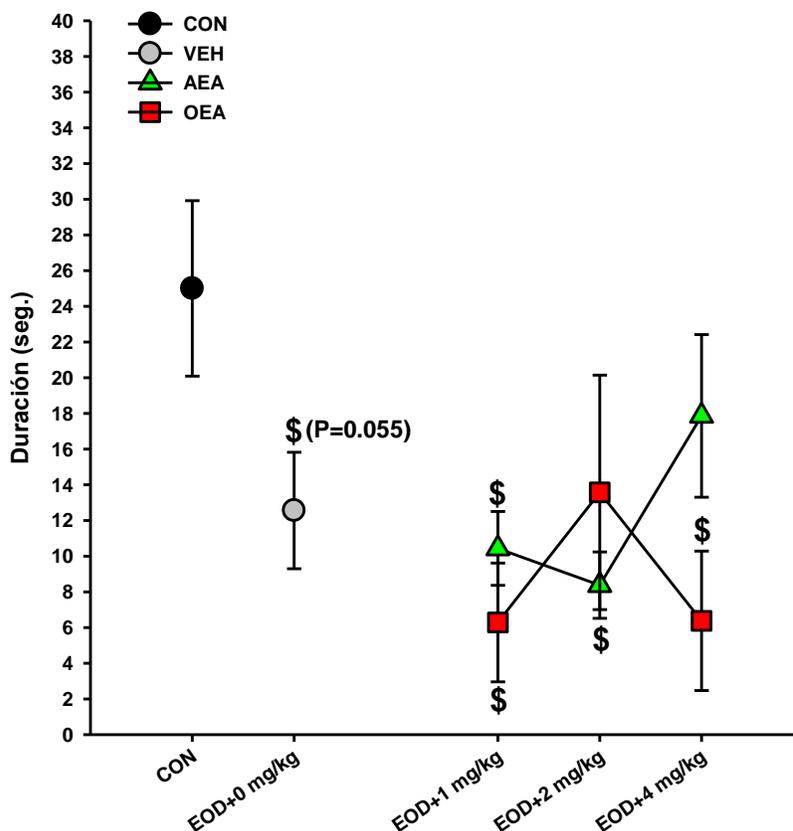


Figura 11. Duración de inmovilidad en campo abierto. (\$) indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) vs. CON, excepto en la comparación CON vs. VEH.

Número de eventos de inmovilidad. El estresor redujo de manera significativa el número de eventos de inmovilidad ( $t = 2.750$ ,  $p < 0.05$ ). El análisis de varianza indicó un impacto del factor en GRUPO en la comparación del grupo CON contra las dosis de AEA ( $F_{[3,31]} = 5.356$ ,  $P = 0.005$ ) y de OEA ( $F_{[3,31]} = 6.253$ ,  $P = 0.002$ ). Los análisis post-hoc reportaron un menor número de eventos de inmovilidad de AEA 1 y 2 mg/kg y todas las dosis de OEA contra el grupo CON. Ningunas de las curvas farmacológicas mostraron diferencias contra el grupo VEH.

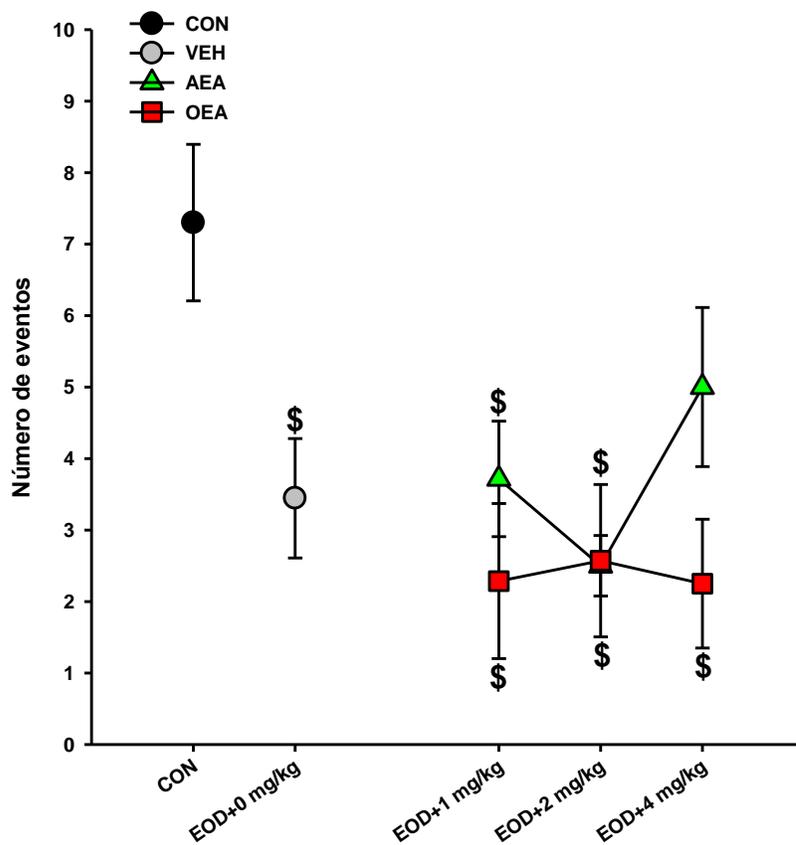


Figura 12. Número de eventos de inmovilidad en campo abierto. (\$) indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) vs. CON.

Duración de congelamiento. El estresor parece haber incrementado la duración de congelamiento, pero esta diferencia no es significativa ( $U= 23.500$ ,  $P=0.084$ ). El análisis de varianza en rangos del grupo CON y la curva de AEA demostró un impacto significativo del factor GRUPO ( $H_{[3,31]}= 9.352$ ,  $P = 0.025$ ), en el cual solo el grupo AEA 1 mg/kg incrementó ( $p<0.05$ ) la duración de congelamiento. Comparaciones de las dosis de AEA contra el grupo VEH no presentaron ninguna diferencia significativa. Las tres dosis de OEA no demostraron diferencias contra los grupos CON, VEH y las tres dosis de AEA.

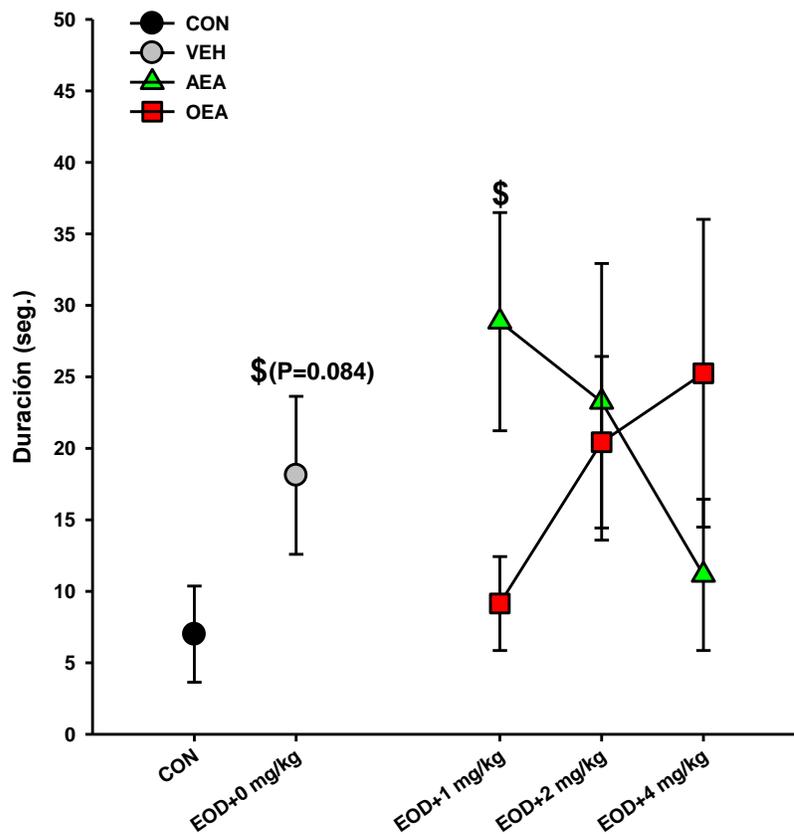


Figura 13. Duración de congelamiento en campo abierto. (\$) indica una diferencia significativa ( $p<0.05$ ) vs. CON, excepto en la comparación CON vs. VEH.

Número de eventos de congelamiento. Los resultados de esta medida reflejan los datos de duración de congelamiento. La exposición al estresor parece haber inducido un incremento en el número de eventos de congelamiento, pero esta diferencia tampoco fue significativa ( $t = -1.853$ ,  $P = 0.081$ ). El análisis de varianza en rangos del grupo CON y la curva de AEA demostró un impacto significativo del factor GRUPO ( $F_{[3,31]} = 3.631$ ,  $P = 0.025$ ), en donde solo el grupo AEA 1 mg/kg incrementó ( $p < 0.05$ ) el número de eventos de congelamiento. Las tres dosis de OEA no demostraron diferencias contra los grupos CON, VEH y las tres dosis de AEA.

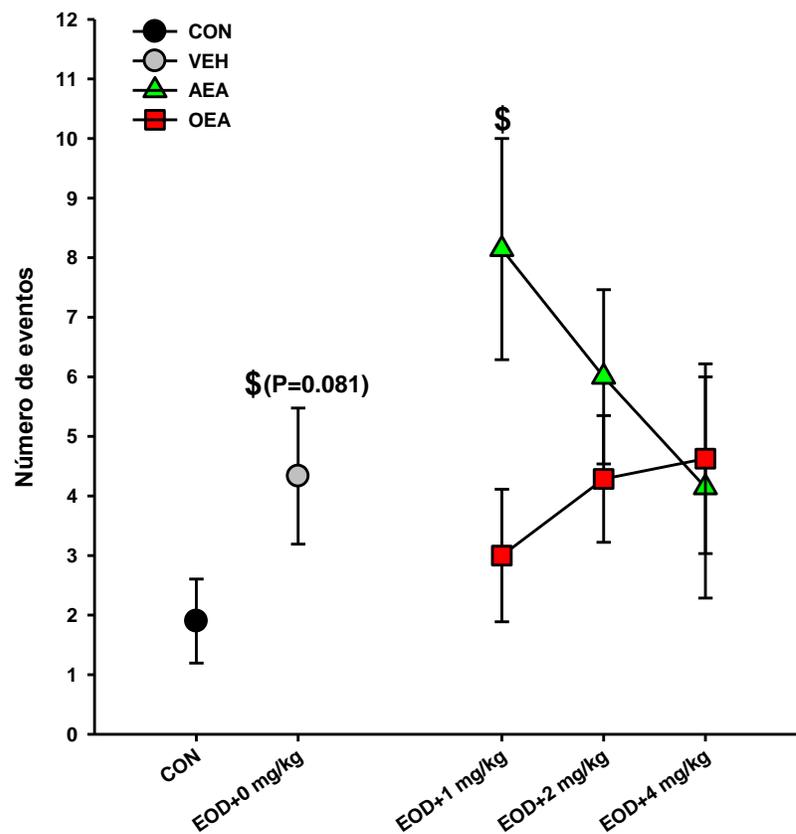


Figura 14. Número de eventos de congelamiento en campo abierto. (\$) indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) vs. CON, excepto en la comparación CON vs. VEH.

Duración de acicalamiento. El estresor indujo un incremento significativo en la duración de acicalamiento. Ninguna de las dosis de AEA y OEA se distinguieron del grupo CON, pero si se demostró un impacto del factor GRUPO en los análisis de VEH contra los grupos AEA ( $H_{[3,31]} = 15.282$ ,  $P = 0.002$ ) y los grupos OEA ( $H_{[3,31]} = 11.661$ ,  $P = 0.009$ ). Los grupos AEA 2 y 4 mg/kg y OEA 1 y 2 mg/kg demostraron una menor duración ( $p < 0.05$ ) de acicalamiento en relación al grupo VEH. No se presentaron diferencias significativas entre las curvas de AEA y OEA.

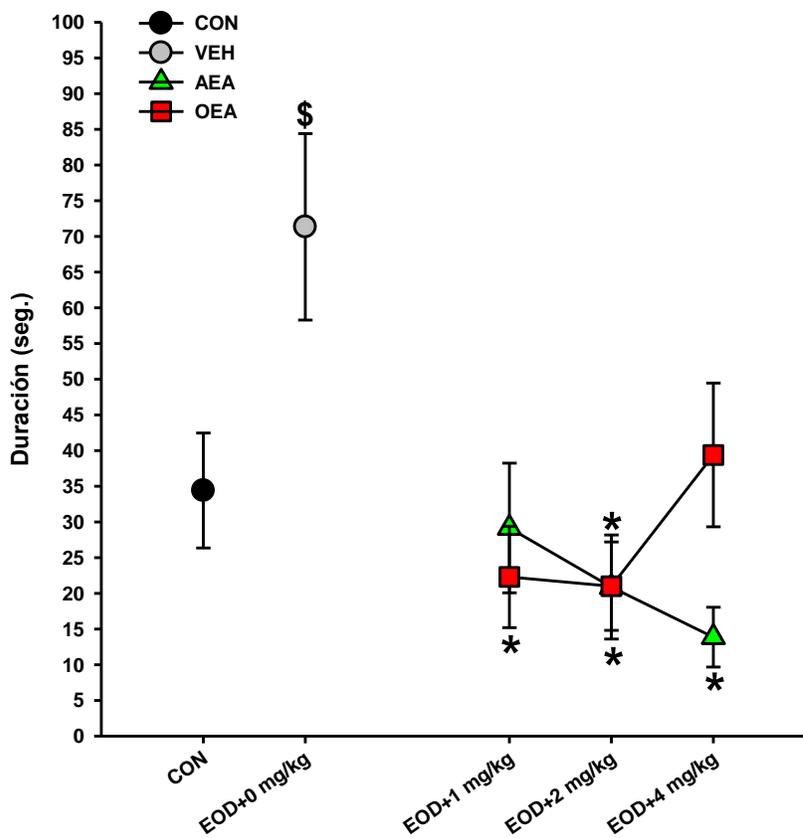


Figura 15. Duración de acicalamiento en campo abierto. Todos los símbolos señalan una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ): (\$) vs. CON y (\*) vs. VEH.

Número de eventos de acicalamiento. En contraste a la duración de acicalamiento, el estresor no impactó en el número de eventos. El análisis del grupo CON contra los grupos de AEA demostró un impacto en la variable GRUPO ( $F_{[3,31]}= 4.285$ ,  $P=0.013$ ), en el que 2 y 4 mg/kg demostraron una reducción significativa ( $p<0.05$ ). Además, se observó un impacto del factor GRUPO en los análisis de VEH contra los grupos de AEA ( $F_{[3,31]}=6.955$ ,  $P=0.001$ ) y OEA ( $F_{[3,31]}=3.525$ ,  $P=0.028$ ). De todos los grupos de AEA y OEA, solo el grupo OEA 4 mg/kg no demostró diferencias significativas contra VEH. Los grupos de OEA no demostraron diferencias en relación al grupo CON y las tres dosis de AEA.

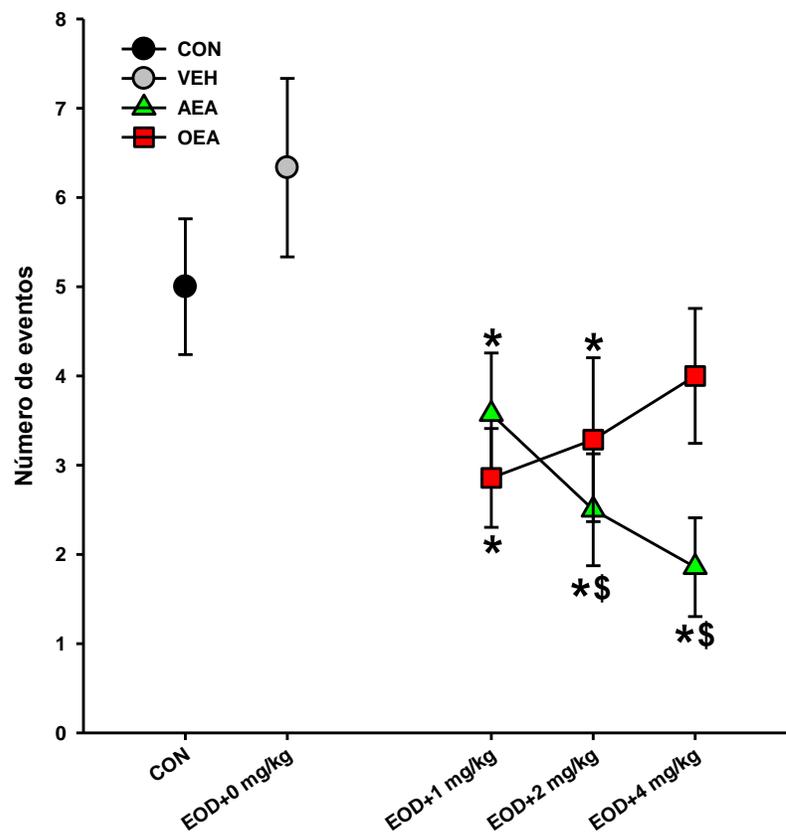


Figura 16. Numero de eventos de acicalamiento en campo abierto. Todos los símbolos señalan una diferencia significativa ( $p<0.05$ ): (\$) vs. CON y (\*) vs. VEH.

Número de eventos de erguimiento. El estresor redujo de manera significativa el número de erguimientos ( $U=8.000$ ,  $p<0.05$ ). Ninguna de las dosis de AEA ni de OEA demostraron diferencias contra el grupo CON, pero si se observó un impacto del factor GRUPO en los análisis de VEH contra los grupos de AEA ( $F_{[3,31]}= 5.105$ ,  $P=0.006$ ) y OEA ( $F_{[3,31]}= 3.832$ ,  $P=0.021$ ). Los grupos AEA 2 y 4 mg/kg y OEA 1 mg/kg incrementaron ( $p<0.05$ ) el número de erguimientos en relación al grupo VEH. No se presentaron diferencias entre los grupos de AEA y OEA.

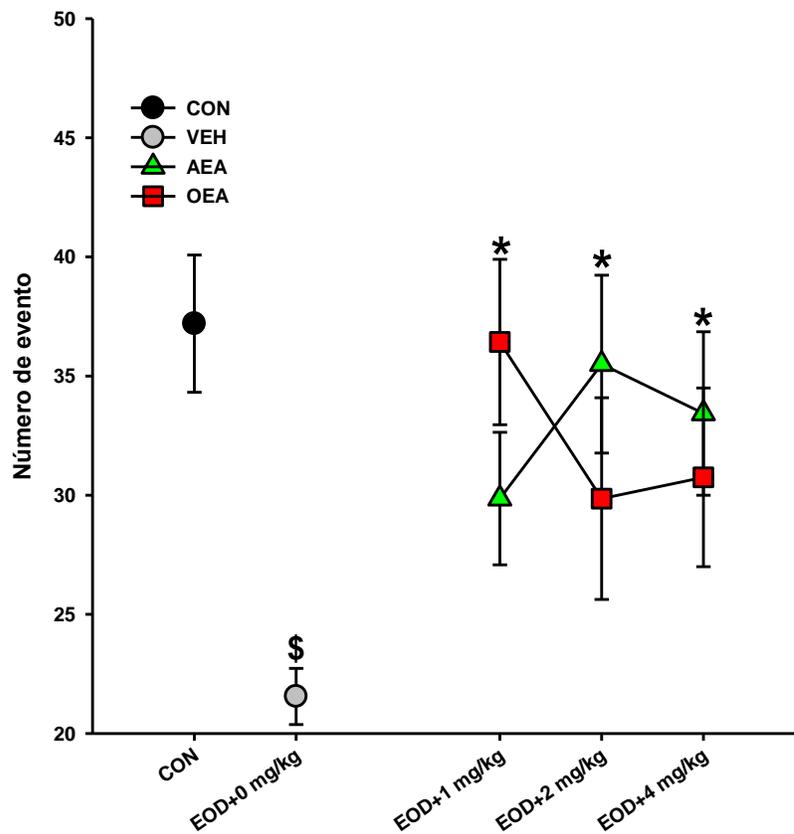


Figura 17. Número de eventos de erguimiento en campo abierto. Todos los símbolos señalan una diferencia significativa ( $p<0.05$ ): (\$) vs. CON y (\*) vs. VEH.

## Reconocimiento de Objetos

Interacción con objetos. El análisis de varianza de dos vías reportó un impacto significativo del factor GRUPO ( $F_{[8,75]}= 8.136$ ,  $p<0.001$ ) y OBJETO ( $F_{[1,75]}= 21.889$ ,  $p<0.001$ ) sobre la duración de exploración a los objetos. Una preferencia por el objeto novedoso se demuestra con una mayor duración de exploración con este en relación con el objeto familiar, lo cuál debe ser estadísticamente significativo ( $p<0.05$ ). El grupo CON mostró una preferencia hacia el objeto novedoso y el estresor anula esta preferencia, considerando la ausencia de diferencias significativas entre en los objetos. Dentro de la curva de AEA, las dosis 2 mg/kg y 4 mg/kg demostraron preferencia hacia el objeto novedoso. Ninguna de las dosis de OEA demuestra una diferencia significativa, lo cual indica una ausencia de preferencia.

En el plano de objetos novedosos, no se presentaron diferencias entre los grupos CON y VEH. El grupo AEA 2 mg/kg incrementó de manera significativa ( $p<0.05$ ) la exploración al objeto novedoso con respecto a todos los grupos control y OEA. El grupo AEA 4 mg/kg demostró diferencias significativas contra el grupo VEH y contra OEA 2 y 4 mg/kg. Dentro de la curva de AEA, la dosis 2 mg/kg mostró un incremento significativo ( $p<0.05$ ) contra la dosis 1 mg/kg, pero no contra la dosis 4 mg/kg. Peculiarmente, ninguna de las dosis de OEA reportó diferencias contra los grupos controles. Dentro de la curva de OEA, no se manifestaron diferencias significativas entre las dosis. En el plano de objetos familiares, ninguno de los grupos (controles y experimentales) mostraron diferencias significativas. Es decir, la duración de exploración con el objeto familiar no fue alterada por las manipulaciones experimentales. No todas las comparaciones que demostraron diferencias significativas fueron incluidas en la gráfica para simplificar la presentación y facilitar su comprensión.

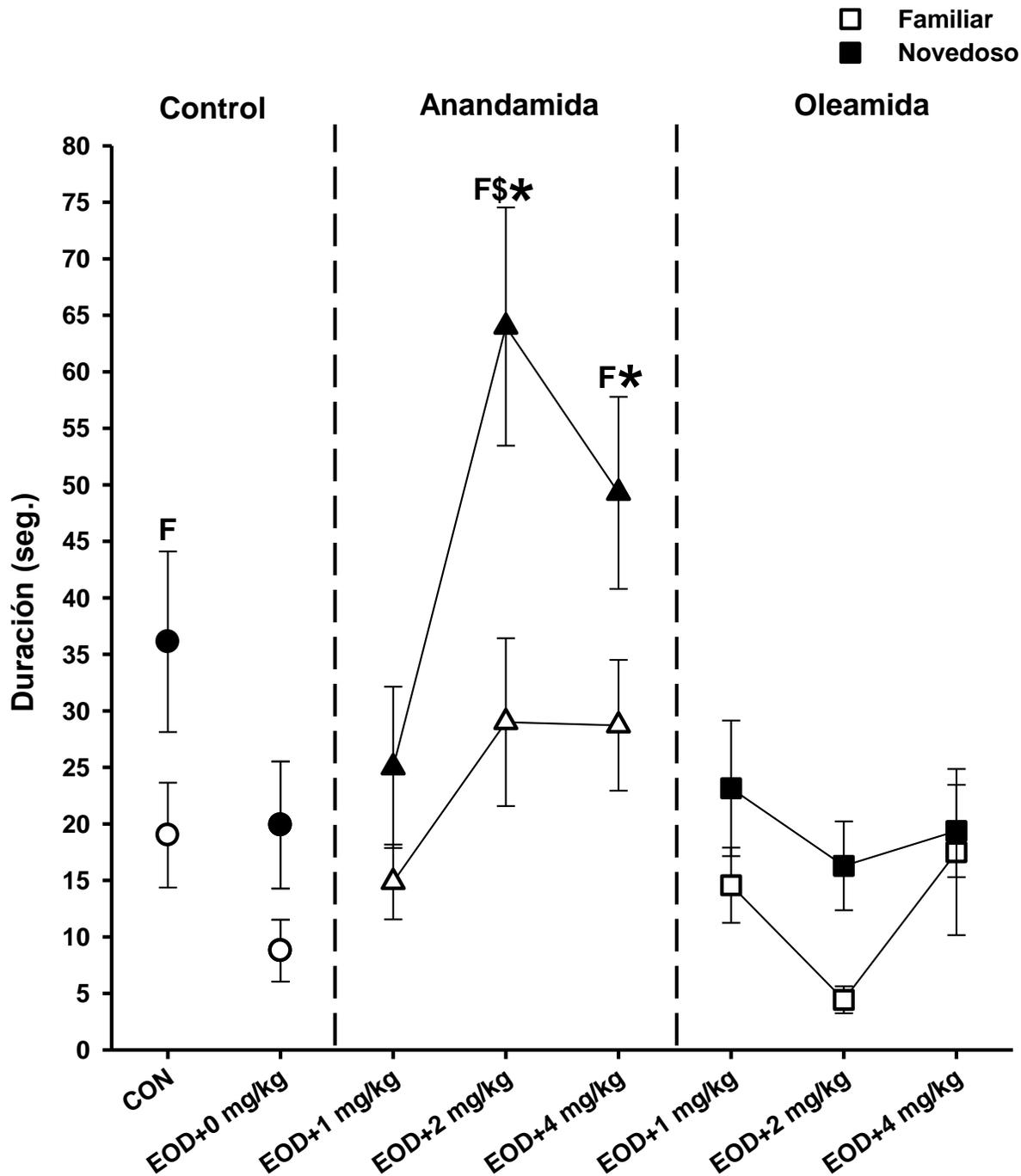


Figura 18. Duración de interacción con objetos en la prueba de reconocimiento de objetos. Todos los símbolos señalan una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ): (F) vs. objeto familiar, (\$) vs. CON y (\*) vs. VEH.

# Capítulo 6

## Discusión y conclusión

*Then King Pasenadi of Kosala asked the Blessed One:*

*"Venerable sir, what is this bhikkhu's name?"*

*"His name is Ananda, great king."*

*"Ananda [joy] he is indeed, venerable sir, and Ananda he appears. What the venerable Ananda has said appears reasonable, what he has said appears to be supported by reason..."*

*(Kannakatthala Sutta, Majjhima Nikaya 90  
traducido del pali por Nanamoli, 1995)*

### Efectos preventivos de la anandamida sobre conducta tipo-ansiedad es dosis-dependiente

Los resultados obtenidos permiten argumentar que la administración de anandamida previa a la exposición a la orina de lince previene el desarrollo de conductas tipo-ansiedad. La reducción en el tiempo de permanecía en el centro del campo abierto a causa del estresor es indicativo de un estado de ansiedad (Tabla 5). Este dato es consistente con otros estudios que observaron el mismo efecto con la exposición a olor de depredador (Tabla 1). Anandamida en las dosis 2 y 4 mg/kg logro revertir el efecto inducido por el estresor de manera significativa, aunque la distribución no normal de los datos proporciona una limitación. El incremento en acicalamiento y la disminución en el número de erguimientos también han sido reportados como efectos dependientes de estresores agudos. Estas dos medidas también fueron revertidas por las administraciones de anandamida en las dosis 2 y 4 mg/kg. El estresor además redujo la locomoción medida por el número de cruces totales y anandamida logro revertir el efecto solo en la dosis mayor. La dosis 1 mg/kg no logro prevenir las consecuencias del estresor en todas las medidas de campo abierto. Tomando esto en cuenta y retomando que la dosis 4 mg/kg mostro efectividad con mayor frecuencia, se sugiere la anandamida actúa de manera dosis-dependiente.

Pruebas conductuales	Medidas	AEA			OEA		
		1 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg	1 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg
CA	Cruces totales			SI			
	Permanencia en centro		SI	SI			
	Duración de acicalamiento		SI	SI	SI	SI	
	Erguimiento		SI	SI	SI		
RdO	Preferencia al objeto novedoso		SI	SI			

Tabla 5. Resumen de efectos preventivos de AEA y OEA en las pruebas de campo abierto (CA) y reconocimiento de objetos (RdO).

El grupo de investigación de Hagit Cohen basados en la Universidad de Ben-Gurion de Neveg reportaron en su publicación del 2014 que la administración sistémica de  $\Delta^9$ -THC (1, 5 o 10 mg/kg) en ratas adultas una hora después a exposición a olor de depredador no consiguió prevenir afectaciones del estresor sobre índices de ansiedad

siete días después. El índice de ansiedad utilizado en este estudio fue derivado de un logaritmo que incorpora los resultados del laberinto en cruz elevado y la prueba de sobresalto acústico inducido para categorizar los fenotipos ansiosos. La administración sistémica del antagonista al receptor CB1, AM251, si indujo un efecto protector en los animales expuestos al estresor siete días antes. Es importante notar que el AM251 induce un efecto ansiogénico inmediatamente posterior a la administración en animales que no son sometidos a estrés, lo cual indica que la regulación del sistema endocannabinoide es dependiente de estado. Los autores también reportaron el efecto de  $\Delta$ 9-THC en tres ventanas temporales (1, 6 y 24 horas) después del estresor y se demostró que el compuesto induce un efecto protector a los efectos ansiogénicos del estresor en las primeras dos medidas temporales y no 24 horas después. Otra aportación importante de este estudio fue establecer la relación entre corticosterona y cada manipulación farmacológica. En mediciones tomadas media hora después de la exposición a olor de depredador, el tratamiento con  $\Delta$ 9-THC induce una reducción en el nivel de corticosterona en plasma, mientras AM251 incrementa estos niveles. Los autores concluyen que el embotamiento del eje HPA poco tiempo después del estresor por la actividad del receptor CB1 induce la expresión de conductas tipo-ansiedad a partir de 24 horas y perdura hasta siete días. En sentido inverso, el antagonismo del receptor CB1 favorece una mayor secreción de corticosterona que previene la manifestación del fenotipo ansioso.

El efecto preventivo de anandamida podría estar relacionado a su afinidad a otros receptores que el CB1. La anandamida en concentraciones relativamente altas puede inducir la activación del receptor TRPV1 (Pertwee et al., 2010). Poblaciones de neuronas en el núcleo paraventricular del hipotálamo que expresan CB1 disminuyen la actividad presináptica en inervaciones excitatorias sobre las neuronas secretoras de CRF (Di et al., 2003, 2005). Por otro lado, una población distintas de células que expresan al receptor TRPV1 en el mismo núcleo demuestran incrementar corrientes excitatorias (Boychuk, Zsombok, Tasker, & Smith, 2013), de modo que podría incrementar la actividad neuroendocrina. Estudios en modelos animales y clínicos confirman que el incremento en glucocorticoides durante la exposición a un estresor tiene un efecto protector (De

Quervain et al., 2016). Tomando un estudio como ejemplo, la administración de cortisol a una concentración similar a la respuesta de estrés en pacientes que sufrieron de un choque séptico redujo la incidencia de TEPT (Schelling et al., 2001).

Integrando los resultados de este presente estudio y las investigaciones recién presentadas, se sugiere que la anandamida 1 mg/kg falla en prevenir las consecuencias del estrés por una regulación a la baja del eje HPA mediado por la activación del receptor CB1, mientras que las dosis mayores logran activar al receptor TRPV1 que en turno podrían evitar una respuesta endocrina embotada durante la presentación al estresor agudo. La verificación de esta explicación hipotética requiere de una extensión del presente proyecto que incorpore mediciones de corticosterona y manipulaciones farmacológicas con antagonistas de los receptores CB1 y TRPV1. Además, resulta inesperado la incapacidad del estresor de inducir un incremento robusto en las medidas de congelamiento, dado que esta conducta ha sido considerada como un índice de ansiedad importante por su relevancia ecológica. Por lo tanto, vale la pena evaluar si estos resultados pueden ser replicados con diferentes tipos de estresores agudos.

### **Prevención de alteraciones inducidas por estrés sobre la memoria**

El paradigma de reconocimiento de objetos se basa en la tendencia de roedores en explorar objetos novedosos (Vargas-López, Torres-Berrio, González-Martínez, Múnera, & Lamprea, 2015). La novedad es una incongruencia entre la apariencia de un evento y la expectativa basada en información previa y las estimaciones probabilísticas internas. El reconocimiento de objetos novedosos posterior a un entrenamiento con objetos familiares es ampliamente considerado como una medida de memoria (Antunes & Biala, 2012; Ennaceur, 2010). La recuperación de una memoria en la presencia de novedad implica un proceso de reconsolidación, lo que involucra la reorganización de los recuerdos ya formados para la incorporación de nueva información (Clarke, Cammarota, Gruart, Izquierdo, & Delgado-García, 2010). La recuperación de memoria es la fase de memoria episódica en la que se recopila información después de pasar por los procesos de codificación y consolidación (Smith & Thomas, 2017). De manera conductual, el reconocimiento de la novedad se manifiesta como un mayor tiempo explorando el objeto

novedoso (Antunes & Biala, 2012).

La exposición a estresores perjudica la ejecución de los animales en la prueba de reconocimiento de objetos (Tabla 4). En el presente estudio, la preferencia por el objeto novedoso no se manifiesta en animales expuestos al estresor, que es el resultado esperado según la literatura. Este efecto se presenta por una disminución notable en la duración de interacción con el objeto. El análisis estadístico no indicó diferencias entre los grupos CON y VEH en la interacción con el objeto familiar.

Schwabe y colegas (Schwabe, Joëls, Roozendaal, Wolf, & Oitzl, 2012) han planteado la hipótesis de que los glucocorticoides interactúan en el complejo BLA para inducir un "modo de formación de memoria". Cuando se está en este estado, se priorizan los procesos neuronales relacionados con la codificación y la consolidación de la información a expensas de la recuperación. Por lo tanto, se ha propuesto que la reducción de la respuesta fisiológica al estrés tiene el potencial de mejorar los efectos del estrés en la memoria (Smith & Thomas, 2017). Anandamida en las dosis 2 y 4 mg/kg previno el desarrollo de déficits en la memoria, que se manifestó con un robusto incremento en la duración de exploración con el objeto novedoso. El efecto por anandamida a 2 mg/kg incluso demostró diferencias contra el grupo CON, cual sugiere que el efecto va más allá de una prevención y podría estar mejorando la ejecución.

### **Oleamida muestra poca capacidad preventiva**

Los resultados obtenidos indicaron que la oleamida tuvo poca efectividad preventiva (Tabla 5). OEA 1 mg/kg logró prevenir el incremento en la duración de acicalamiento y la disminución en el número de erguimiento inducido por estrés. El único otro efecto preventivo observado fue sobre acicalamiento a la dosis 2 mg/kg. La oleamida falló en revertir el resto de las medidas en campo abierto que demostraron ser afectadas por el estresor. Además, la abolición de la preferencia por el objeto novedoso y la duración de interacción con el objeto novedoso por el estresor no fueron afectadas por ninguna de las dosis de oleamida. La falta de efectividad de la oleamida en relación a la anandamida podría ser interpretada por diferencias en la farmacodinamia. Es posible que

el acoplamiento a diferentes receptores o a los mismos con diferentes afinidades induce efectos divergentes cuando son evaluados posteriormente.

Lo observado en el laberinto cero elevado se contrasta con previos estudios, dado que este paradigma es sensible a diversos estresores y no se refleja esto en los resultados. Como consecuencia, no se pudo adjudicar con certeza un efecto preventivo a OEA 1 mg/kg en las medidas de permanencia en el brazo abierto y cruces al brazo abierto. El grupo OEA 1 mg/kg mostró un incremento significativo en ambas medidas cuando se comparó contra el grupo VEH, pero no contra el grupo CON. A pesar de esto, tampoco resulta apropiado eliminar por completo la posibilidad de un efecto preventivo. Un incremento en el número de sujetos por grupo podría reducir la variabilidad de los datos para demostrar significancias estadísticas.

### **Implicaciones para tratamientos farmacológicos**

La quinta versión del Manual Estadístico de Diagnóstico (DSM V) describe que El trastorno por estrés postraumático (TEPT) es una patología prevalente, crónica e incapacitante que puede desarrollarse después de una exposición traumática (American Psychiatric Association, 2013). Esta categoría psiquiátrica se estableció de manera formal en el DSM-III (1980) y hasta la fecha no existe una comprensión clara sobre los mecanismos fisiológicos que participan en su etiología y mantenimiento. Como consecuencia directa de esta laguna en el conocimiento científico, no existen tratamientos farmacológicos efectivos basados en los mecanismos subyacentes de la patología (Bukalo, Pinard, & Holmes, 2014; Hauger et al., 2012; Alexander Neumeister et al., 2015).

La estrategia principal para el tratamiento de esta psicopatología ha sido la curativa. Es decir, después de la estabilización de un cuadro clínico que causa malestar en el individuo se procede con técnicas farmacológicas y/o psicoterapéuticas para “curarlo” o por lo menos reducir el impacto de síntomas en la vida cotidiana. La lógica de estas estrategias es correctiva, dado que el malestar se debe presentar antes de la acción terapéutica. La efectividad del tratamiento farmacológico para TEPT ha sido un

tema de controversia. Los fármacos certificados para el tratamiento de TEPT se consideran como oportunistas en el sentido que derivan del tratamiento dirigido a otros cuadros clínicos (como trastornos de ansiedad, depresión e incluso esquizofrenia) y su efectividad es baja (Bukalo et al., 2014; De Quervain et al., 2016; Alexander Neumeister et al., 2015).

Colectivamente, alteraciones en el sistema endocannabinoide se han descrito como consecuencias de eventos traumáticos y como factores de riesgo para el desarrollo de TEPT. Pacientes diagnosticados muestran bajos niveles de anandamida (Hill & Patel, 2013; Neumeister et al., 2013) y la severidad de síntomas tiene una relación inversa con la concentración de endocannabinoides en muestras de cabello (Wilker et al., 2016). Estudios con tomografía por la emisión de positrones han reportado un alto nivel de receptores CB1 en la amígdala que se correlaciona con un aumento del sesgo atencional a la amenaza (Neumeister et al., 2013; Pietrzak et al., 2014). Complementado estos hallazgos, un polimorfismo de un solo nucleótido (rs2295633) del gen que codifica el enzima FAAH modula el riesgo de desarrollar el TEPT en veteranos de guerra (Pardini et al., 2012). La modulación del sistema endocannabinoide como tratamiento curativo para TEPT resulta una válida extensión de la evidencia presentada (Gunduz-Cinar et al., 2013), aunque los resultados del presente estudio indican que la modulación farmacológica podría ser implementada de manera preventiva.

La intervención peritraumática se ha propuesto como una alternativa para prevenir el desarrollo de la patología o reducir sus síntomas (Zohar et al., 2009). La idea central es que un tratamiento psicológico y/o farmacológico temprano puede parar el desarrollo de secuelas que llegan a estabilizarse en una patología. El grupo de Hagit Cohen ha materializado la idea con el análisis del desarrollo de fenotipos tipo-TEPT en roedores expuestos a olor de depredador tratados con diversos agentes farmacológicos. La evidencia recopilada en este estudio permite sugerir que la modulación del sistema endocannabinoide, probablemente por la inhibición del enzima FAAH, podría ser una estrategia preventiva viable. No existen hasta la fecha estudios que hayan evaluado esta propuesta.

## Conclusión

Los resultados obtenidos permiten confirmar la hipótesis, dado que la administración de endocannabinoides previno las alteraciones conductuales inducidas por la exposición a olor de depredador. La anandamida resultó ser más efectiva que la oleamida en revertir el efecto del estresor, el cual se adjudica a los diferentes blancos proteicos de cada ligando. Además, la capacidad preventiva de la anandamida estuvo sujeta a la dosificación, siendo la dosis más alta la que indujo un efecto más consistente. Una explicación posible se basa en la actividad de la anandamida sobre los receptores CB1 y TRPV1 que tienen efectos opuestos sobre la liberación de glucocorticoides. Es prudente aclarar que este proyecto no puede elucidar con certidumbre los mecanismos de acción específicos que están involucrados en los resultados observados. Considerando que los endocannabinoides pueden actuar sobre glía y células del sistema inmunológico (Oliveira da Cruz, Robin, Drago, Marsicano, & Metna-Laurent, 2016; Witkamp, 2015), el modo de administración sistémico utilizado en este estudio deja abierta la posibilidad que el efecto preventivo podría estar mediado o influenciado por mecanismos no-neurales.

La expansión de los resultados de este estudio podría tener aplicación para problemáticas de salud pública de nuestra región. Según el *Informe sobre la situación de la prevención de la violencia en la Región de las Américas (2014)*, publicado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el conjunto de países Latinoamericanos demostraron tener la tasa promedio de homicidios más alta del mundo (28.5 por 100,000 habitantes). La tasa de homicidios en toda la región de las Américas ha incrementado un 20%, siendo los países de un ingreso bajo o mediano los principales contribuyentes a este porcentaje. Hombres jóvenes y adultos (15-44 años) resultan ser la población con mayor riesgo de ser víctima de homicidio (72%), mientras que mujeres, niños y adultos mayores están en mayor riesgo de padecer violencia no letal. Un tercio de las mujeres reportan ser víctimas de violencia sexual por sus parejas y/o cualquier perpetrador durante su vida, pero estos datos podrían no ser totalmente representativos por una carencia sistémica en el reporte de estos eventos. En un estudio epidemiológico publicado recientemente, la violencia interpersonal es el evento traumático más

prevalente en México (Benjet et al., 2015).

Frente a estas desgracias características de nuestra región, es imperativo para el científico en el área de investigación básica proporcionar conocimiento traducible (*translational*) para la práctica clínica. La comprensión de las consecuencias del estrés en modelos animales se presenta como una avenida prometedora hacia descubrimientos con relevancia terapéutica. La propiedad protectora de los endocannabinoides evidenciada en este estudio podría servir como base para embarcar futuras investigaciones enfocadas a discernir los mecanismos específicos que podrían estar involucrados. La esperanza por un mundo que sea capaz de evitar la propagación del sufrimiento innecesario parece ser una realidad alcanzable.

## Referencias

- Agarwal, A., Halvorson, L. M., & Legradi, G. (2005). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Molecular Brain Research*, *138*(1), 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.03.016>
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, *13*(2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Baker, K. B., & Kim, J. J. (2002). Effects of Stress and Hippocampal NMDA Receptor Antagonism on Recognition Memory in Rats. *Learning & Memory*, *9*(2), 58–65. <https://doi.org/10.1101/lm.46102>
- Bambico, F. R., Cassano, T., Dominguez-Lopez, S., Katz, N., Walker, C. D., Piomelli, D., & Gobbi, G. (2010). Genetic deletion of fatty acid amide hydrolase alters emotional behavior and serotonergic transmission in the dorsal raphe, prefrontal cortex, and hippocampus. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *35*(10), 2083–100. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.80>
- Battista, N., Di Tommaso, M., Bari, M., & Maccarrone, M. (2012). The endocannabinoid system: an overview. *Front Behav Neurosci*, *6*(March), 9. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00009>
- Benjet, C., Bromet, E., Karam, E. G., Kessler, R. C., McLaughlin, K. A., Ruscio, A. M., ... Koenen, K. C. (2015). The epidemiology of traumatic event exposure worldwide: results from the World Mental Health Survey Consortium. *Psychological Medicine*, *46*(2), 1–17. <https://doi.org/10.1017/S0033291715001981>
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2008). Chapter 2.4 Defensive behaviors, fear, and anxiety. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, *17*(7), 63–79. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(07\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(07)00005-7)
- Bluett, R. J., Gamble-George, J. C., Hermanson, D. J., Hartley, N. D., Marnett, L. J., & Patel, S. (2014). Central anandamide deficiency predicts stress-induced anxiety: behavioral reversal through endocannabinoid augmentation. *Translational Psychiatry*, *4*(7), e408. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.53>
- Boring, D. L., Berglund, B. A., & Howlett, A. C. (1996). Cerebrodiene, arachidonyl-ethanolamide, and hybrid structures: Potential for interaction with brain cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *55*(3), 207–210. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(96\)90100-3](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(96)90100-3)
- Boychuk, C. R., Zsombok, A., Tasker, J. G., & Smith, B. N. (2013). Rapid glucocorticoid-induced activation of TRP and CB1 receptors causes biphasic modulation of glutamate release in gastric-related hypothalamic preautonomic neurons. *Frontiers in Neuroscience*, *7*(7 JAN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00003>
- Braun, A. A., Skelton, M. R., Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2011). Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: Effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *97*(3), 406–415. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.09.013>
- Brujinzeel, A. W., Qi, X., Guzhva, L. V., Wall, S., Deng, J. V., Gold, M. S., ... Setlow, B. (2016). Behavioral characterization of the effects of cannabis smoke and anandamide in rats. *PLoS ONE*, *11*(4), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153327>
- Bukalo, O., Pinard, C. R., & Holmes, A. (2014). Mechanisms to medicines: elucidating neural and molecular substrates of fear extinction to identify novel treatments for anxiety disorders. *British Journal of Pharmacology*, *171*(20), 4690–4718. <https://doi.org/10.1111/bph.12779>
- Cannon, W. B. (1929). Organization for Physiological Homeostasis. *Physiological Reviews*, *IX*(3), 399–431.
- Carpenter, R. H. S. (2004). Homeostasis: a plea for a unified approach. *Advances in Physiology Education*, *28*(4), 180–187. <https://doi.org/10.1152/advan.00012.2004>
- Cassano, T., Gaetani, S., MacHeda, T., Laconca, L., Romano, A., Morgese, M. G., ... Piomelli, D. (2011). Evaluation of the emotional phenotype and serotonergic neurotransmission of fatty acid amide hydrolase-deficient mice. *Psychopharmacology*, *214*(2), 465–476. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2051-0>
- Cavanaugh, D. J., Chesler, A. T., Jackson, A. C., Sigal, Y. M., Yamanaka, H., Grant, R., ... Basbaum, A. I.

- (2011). Trpv1 Reporter Mice Reveal Highly Restricted Brain Distribution and Functional Expression in Arteriolar Smooth Muscle Cells. *Journal of Neuroscience*, 31(13), 5067–5077. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6451-10.2011>
- Clark, S. M., Sand, J., Francis, T. C., Nagaraju, A., Michael, K. C., Keegan, A. D., ... Tonelli, L. H. (2014). Immune status influences fear and anxiety responses in mice after acute stress exposure. *Brain, Behavior, and Immunity*, 38, 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.02.001>
- Clarke, J. R., Cammarota, M., Gruart, A., Izquierdo, I., & Delgado-Garcia, J. M. (2010). Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(6), 2652–2657. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915059107>
- Cohen, H., Kozlovsky, N., Alona, C., Matar, M. A., & Joseph, Z. (2012). Animal model for PTSD: From clinical concept to translational research. *Neuropharmacology*, 62(2), 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.04.023>
- Cohen, H., Kozlovsky, N., Matar, M. A., Zohar, J., & Kaplan, Z. (2011). The Characteristic Long-Term Upregulation of Hippocampal NF- $\kappa$ B Complex in PTSD-Like Behavioral Stress Response Is Normalized by High-Dose Corticosterone and Pyrrolidine Dithiocarbamate Administered Immediately after Exposure. *Neuropsychopharmacology*, 36(11), 2286–2302. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.118>
- Cohen, H., & Yehuda, R. (2011). Gender differences in animal models of posttraumatic stress disorder. *Disease Markers*, 30(2–3), 141–150. <https://doi.org/10.3233/DMA-2011-0778>
- Cohen, H., & Zohar, J. (2004). An animal model of posttraumatic stress disorder: The use of cut-off behavioral criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1032, 167–178. <https://doi.org/10.1196/annals.1314.014>
- Cravatt, B. F., Prospéro-Garcia, O., Siuzdak, G., Gilula, N. B., Henriksen, S. J., Boger, D. L., & Lerner, R. A. (1995). Chemical characterization of a Family of Brain Lipids That Induce Sleep. *Science*, 268(5216), 1506–1509. <https://doi.org/10.1007/BF00322863>
- Crosby, K. M., & Bains, J. S. (2012). The intricate link between glucocorticoids and endocannabinoids at stress-relevant synapses in the hypothalamus. *Neuroscience*, 204, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.049>
- Crowe, M. S., Nass, S. R., Gabella, K. M., & Kinsey, S. G. (2014). The endocannabinoid system modulates stress, emotionality, and inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 42, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.007>
- Daskalakis, N. P., Yehuda, R., & Diamond, D. M. (2013). Animal models in translational studies of PTSD. *Psychoneuroendocrinology*, 38(9), 1895–1911. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.06.006>
- Day, T. A. (2005). Defining stress as a prelude to mapping its neurocircuitry: No help from allostasis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(8), 1195–1200. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.08.005>
- De Bitencourt, R. M., Pamplona, F. A., & Takahashi, R. N. (2013). A current overview of cannabinoids and glucocorticoids in facilitating extinction of aversive memories: Potential extinction enhancers. *Neuropharmacology*, 64, 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.05.039>
- de Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(6), 463–475. <https://doi.org/10.1038/nrn1683>
- de Kloet, E. R., Karst, H., & Joëls, M. (2008). Corticosteroid hormones in the central stress response: Quick-and-slow. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(2), 268–272. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.10.002>
- De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2009). An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 23(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2008.10.013>
- De Quervain, D., Schwabe, L., & Roozendaal, B. (2016). Stress, glucocorticoids and memory: Implications for treating fear-related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(1), 7–19. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.155>
- Devane, W. A., Hanus, L., Breur, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., ... Mechoulam, R. (1992). Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science*, 258, 1942–1949.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K. C., & Tasker, J. G. (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(12), 4850–4857.

- <https://doi.org/23/12/4850> [pii]
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Marcheselli, V. L., Bazan, N. G., & Tasker, J. G. (2005). Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology*, *146*(10), 4292–4301. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0610>
- Doczy, E. J., Seroogy, K., Harrison, C. R., & Herman, J. P. (2009). Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis, Glucocorticoids, and Neurologic Disease. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, *29*(2), 265–284. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2009.02.003>
- Eagle, A. L., Fitzpatrick, C. J., & Perrine, S. A. (2013). Single prolonged stress impairs social and object novelty recognition in rats. *Behavioural Brain Research*, *256*, 591–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.014>
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, *215*(2), 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>
- Evanson, N. K., Tasker, J. G., Hill, M. N., Hillard, C. J., & Herman, J. P. (2010). Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology*, *151*(10), 4811–4819. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0285>
- Farrell, E. K., & Merkler, D. J. (2008). Biosynthesis, degradation and pharmacological importance of the fatty acid amides. *Drug Discovery Today*, *13*(13–14), 558–568. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.02.006>
- Fedorova, I., Hashimoto, A., Fecik, R. A., Hedrick, M. P., Hanus, L. O., Boger, D. L., ... Basile, A. S. (2001). Behavioral evidence for the interaction of oleamide with multiple neurotransmitter systems. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *299*(1), 332–342. Retrieved from <http://www.jpet.org/cgi/content/full/299/1/332> [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11561096](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11561096) <http://jpet.aspetjournals.org/content/299/1/33>
- Fenchel, D., Levkovitz, Y., Vainer, E., Kaplan, Z., Zohar, J., & Cohen, H. (2015). Beyond the HPA-axis: The role of the gonadal steroid hormone receptors in modulating stress-related responses in an animal model of PTSD. *European Neuropsychopharmacology*, *25*(6), 944–957. <https://doi.org/10.3402/ejpt.v3i0.19363>
- Fink, G. (2010). Stress: Definition and history. *Encyclopedia of Neuroscience*, 549–555. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00076-0>
- Fink, G. (2016). Stress: Concepts, Definition and History☆. In G. Fink (Ed.), *Handbook of Stress Series Volume 1* (1st Editio, pp. 3–11). Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.02208-2>
- Fowler, C. J. (2015). The potential of inhibitors of endocannabinoid metabolism as anxiolytic and antidepressive drugs-A practical view. *European Neuropsychopharmacology*, *25*(6), 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.02.005>
- Fratta, W., & Fattore, L. (2013). Molecular mechanisms of cannabinoid addiction. *Current Opinion in Neurobiology*, *23*(4), 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.02.002>
- Furay, A. R., Bruestle, A. E., & Herman, J. P. (2008). The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress. *Endocrinology*, *149*(11), 5482–5490. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0642>
- Ganon-Elazar, E., & Akirav, I. (2012). Cannabinoids Prevent the Development of Behavioral and Endocrine Alterations in a Rat Model of Intense Stress. *Neuropsychopharmacology*, *37*(2), 456–466. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.204>
- Goldstein, D. S., & Kopin, I. J. (2017). Homeostatic systems, biocybernetics, and autonomic neuroscience. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, (March), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2017.09.001>
- Goswami, S., Samuel, S., Sierra, O. R., Cascardi, M., & Paré, D. (2012). A rat model of post-traumatic stress disorder reproduces the hippocampal deficits seen in the human syndrome. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *6*(June), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00026>
- Gray, J. M., Vecchiarelli, H. A., Morena, M., Lee, T. T., Hermanson, D. J., Kim, A. B., ... Hill, M. N. (2015). Corticotropin-releasing hormone drives anandamide hydrolysis in the amygdala to promote anxiety. *Journal of Neuroscience*, *35*(9), 3879–3892. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2737-14.2015>
- Gunduz-Cinar, O., Hill, M. N., McEwen, B. S., & Holmes, A. (2013). Amygdala FAAH and anandamide: Mediating protection and recovery from stress. *Trends in Pharmacological Sciences*, *34*(11), 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.08.008>

- Hacquemand, R., Choffat, N., Jacquot, L., & Brand, G. (2013). Comparison between low doses of TMT and cat odor exposure in anxiety- and fear-related behaviors in mice. *Behavioural Brain Research*, *238*(1), 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.014>
- Hauger, R. L., Olivares-Reyes, J. A., Dautzenberg, F. M., Lohr, J. B., Braun, S., & Oakley, R. H. (2012). Molecular and cell signaling targets for PTSD pathophysiology and pharmacotherapy. *Neuropharmacology*, *62*(2), 705–714. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.11.007>
- Hedlund, P. B., Carson, M. J., Sutcliffe, J. G., & Thomas, E. A. (1999). Allosteric regulation by oleamide of the binding properties of 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> receptors. *Biochem. Pharmacol.*, *58*(11), 1807–1813. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00274-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00274-9)
- Herman, J. P., Mcklveen, J. M., Solomon, M. B., Carvalho-Netto, E., & Myers, B. (2012). Neural regulation of the stress response: Glucocorticoid feedback mechanisms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *45*(4), 292–298. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500041>
- Hill, M. N., & Gorzalka, B. B. (2005). Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *European Neuropsychopharmacology*, *15*(6), 593–599. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2005.03.003>
- Hill, M. N., McLaughlin, R. J., Morrish, A. C., Viau, V., Floresco, S. B., Hillard, C. J., & Gorzalka, B. B. (2009). Suppression of amygdalar endocannabinoid signaling by stress contributes to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *34*(13), 2733–45. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.114>
- Hill, M. N., McLaughlin, R. J., Morrish, A. C., Viau, V., Stan, B., Hillard, C. J., & Gorzalka, B. B. (2009). Suppression of Amygdalar Endocannabinoid Signaling by Stress Contributes to Activation of the Hypothalamic-Pituitary- Adrenal Axis, *34*(13), 2733–2745. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.114>. Suppression
- Hill, M. N., McLaughlin, R. J., Pan, B., Fitzgerald, M. L., Roberts, C. J., Lee, T. T.-Y., ... Hillard, C. J. (2011). Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(29), 10506–15. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0496-11.2011>
- Hill, M. N., & Patel, S. (2013). Translational evidence for the involvement of the endocannabinoid system in stress-related psychiatric illnesses. *Biology of Mood & Anxiety Disorders*, *3*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/2045-5380-3-19>
- Hill, M. N., & Tasker, J. G. (2012). Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience*, *204*, 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.030>
- Hodes, G. E., Kana, V., Menard, C., Merad, M., & Russo, S. J. (2015). Neuroimmune mechanisms of depression. *Nature Neuroscience*, *18*(10), 1386–93. <https://doi.org/10.1038/nn.4113>
- Holmes, A., & Singewald, N. (2013). Individual differences in recovery from traumatic fear. *Trends in Neurosciences*, *36*(1), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.003>
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. a, ... Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*, *54*(2), 161–202. <https://doi.org/10.1124/pr.54.2.161>
- Iannotti, F. A., Di Marzo, V., & Petrosino, S. (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Progress in Lipid Research*, *62*, 107–128. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.02.002>
- Joëls, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Neuroscience*, *10*(juNE), 459–466. <https://doi.org/10.1038/nrn2632>
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., & Fentress, J. C. (2015). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(1), 45–59. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *64*(4), 439–48. Retrieved from <http://ane.pl/pdf/6440.pdf>
- Karatsoreos, I. N., & McEwen, B. S. (2011). Psychobiological allostasis: Resistance, resilience and vulnerability. *Trends in Cognitive Sciences*, *15*(12), 576–584. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.10.005>
- Karst, H., Berger, S., Erdmann, G., Schütz, G., & Joëls, M. (2010). Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 107(32), 14449–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914381107>
- Katona, I., Rancz, E. a, Acsády, L., Ledent, C., Mackie, K., Hajos, N., & Freund, T. F. (2001). Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(23), 9506–9518. <https://doi.org/21/23/9506> [pii]
- Kinsey, S. G., O'Neal, S. T., Long, J. Z., Cravatt, B. F., & Lichtman, A. H. (2011). Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 98(1), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.12.002>
- Kondoh, K., Lu, Z., Ye, X., Olson, D. P., Lowell, B. B., & Buck, L. B. (2016). A specific area of olfactory cortex involved in stress hormone responses to predator odours. *Nature*, 532(7597), 103–106. <https://doi.org/10.1038/nature17156>
- Lazarus, R. S. (2000). Toward better research on stress and coping. *The American Psychologist*, 55(6), 665–673. <https://doi.org/10.1037/0003-066X.55.6.665>
- Leger, M., Quideville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, 8(12), 2531–2537. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>
- Leggett, J. D., Aspley, S., Beckett, S. R. G., D'Antona, A. M., Kendall, D. A., & Kendall, D. A. (2004). Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology*, 141(2), 253–262. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705607>
- Li, D.-P., Chen, S.-R., & Pan, H.-L. (2004). VR 1 Receptor Activation Induces Glutamate Release and Postsynaptic Firing in the Paraventricular Nucleus. *Journal of Neurophysiology*, 92(3), 1807–1816. <https://doi.org/10.1152/jn.00171.2004>
- Li, S., Fan, Y. X., Wang, W., & Tang, Y. Y. (2012). Effects of acute restraint stress on different components of memory as assessed by object-recognition and object-location tasks in mice. *Behavioural Brain Research*, 227(1), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.10.007>
- Lomazzo, E., Bindila, L., Remmers, F., Lerner, R., Schwitter, C., Hoheisel, U., & Lutz, B. (2015). Therapeutic potential of inhibitors of endocannabinoid degradation for the treatment of stress-related hyperalgesia in an animal model of chronic pain. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 40(2), 488–501. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.198>
- Lutz, B., Marsicano, G., Maldonado, R., & Hillard, C. J. (2015). The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(12), 705–718. <https://doi.org/10.1038/nrn4036>
- Maldonado-Bouchard, S., Peters, K., Woller, S. A., Madahian, B., Faghihi, U., Patel, S., ... Hook, M. A. (2015). Inflammation is increased with anxiety- and depression-like signs in a rat model of spinal cord injury. *Brain, Behavior, and Immunity*, 51, 176–195. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.009>
- Mallet, P. E., & Beninger, R. J. (1998). Delta-9-tetrahydrocannabinol, but not the endogenous cannabinoid receptor ligand anandamide, produces conditioned place avoidance. *Life Sciences*, 62(26), 2431–2439. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00226-4](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00226-4)
- Manzanas, J., Corchero, J., & Fuentes, J. A. (1999). Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Research*, 839(1), 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01756-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01756-4)
- Marco, E. M., Garcia-Gutierrez, M. S., Bermudez-Silva, F. J., Moreira, F. A., Guimaraes, F., Manzanas, J., & Viveros, M. P. (2011). Endocannabinoid system and psychiatry: in search of a neurobiological basis for detrimental and potential therapeutic effects. *Front Behav Neurosci*, 5(October), 63. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00063>
- Marco, E. M., Rapino, C., Caprioli, A., Borsini, F., Laviola, G., Maccarrone, M., & Lodola, A. (2015). Potential therapeutic value of a novel FAAH inhibitor for the treatment of anxiety. *PLoS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137034>
- Marsicano, G., & Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *European Journal of Neuroscience*, 11(12), 4213–4225. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00847.x>
- Masini, C. V., Garcia, R. J., Sasse, S. K., Nyhuis, T. J., Day, H. E. W., & Campeau, S. (2010). Accessory and main olfactory systems influences on predator odor-induced behavioral and endocrine stress responses in rats. *Behavioural Brain Research*, 207(1), 70–77.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.09.038>
- Matar, M. A., Zohar, J., & Cohen, H. (2013). Translationally relevant modeling of PTSD in rodents. *Cell and Tissue Research*, *354*(1), 127–139. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1687-6>
- Matar, M. a, Cohen, H., Kaplan, Z., & Zohar, J. (2006). The effect of early poststressor intervention with sertraline on behavioral responses in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *31*(12), 2610–2618. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301132>
- Mayer, T. A., Matar, M. A., Kaplan, Z., Zohar, J., & Cohen, H. (2014). Blunting of the HPA-axis underlies the lack of preventive efficacy of early post-stressor single-dose Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *122*, 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.04.014>
- McEwen, B. S. (2009). The brain is the central organ of stress and adaptation. *NeuroImage*, *47*(3), 911–913. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.05.071>
- McEwen, B. S., Bowles, N. P., Gray, J. D., Hill, M. N., Hunter, R. G., Karatsoreos, I. N., & Nasca, C. (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nature Neuroscience*, *18*(10), 1353–63. <https://doi.org/10.1038/nn.4086>
- McLaughlin, R. J., Hill, M. N., Bambico, F. R., Stuhr, K. L., Gobbi, G., Hillard, C. J., & Gorzalka, B. B. (2012). Prefrontal cortical anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. *European Neuropsychopharmacology*, *22*(9), 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.01.004>
- Milliken, C. S., Auchterlonie, J. L., & Hoge, C. W. (2007). Longitudinal assessment of mental health problems among active and reserve component soldiers returning from the Iraq war. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, *298*(18), 2141–2148. <https://doi.org/10.1001/jama.298.18.2141>
- Mora, F., Segovia, G., Del Arco, A., De Blas, M., & Garrido, P. (2012). Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Research*, *1476*, 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.049>
- Moreira, F. A., Aguiar, D. C., Terzian, A. L. B., Guimaraes, F. S., & Wotjak, C. T. (2012). Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety—two sides of one coin? *Neuroscience*, *204*, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.046>
- Moreira, F. A., Kaiser, N., Monory, K., & Lutz, B. (2008). Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology*, *54*(1), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.07.005>
- Morena, M., Patel, S., Bains, J. S., & Hill, M. N. (2016). Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System. *Neuropsychopharmacology*, *41*(1), 80–102. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.166>
- Mueller, G. P., & Driscoll, W. J. (2009). *Chapter 3: Biosynthesis of Oleamide. Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 81). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(09\)81003-0](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(09)81003-0)
- Mukhopadhyay, S., Shim, J. Y., Assi, A. A., Norford, D., & Howlett, A. C. (2002). CB1 cannabinoid receptor-G protein association: A possible mechanism for differential signaling. *Chemistry and Physics of Lipids*, *121*(1–2), 91–109. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(02\)00153-6](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(02)00153-6)
- Nahar, J., Haam, J., Chen, C., Jiang, Z., Glatzer, N. R., Muglia, L. J., ... Tasker, J. G. (2015). Rapid nongenomic glucocorticoid actions in male mouse hypothalamic neuroendocrine cells are dependent on the nuclear glucocorticoid receptor. *Endocrinology*, *156*(8), 2831–2842. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1273>
- Nanamoli, B. (1995). *The Middle Length Discourses of the Buddha: A Translation of the Majjhima Nikaya*. (B. Bodhi, Ed.). Boston: Wisdom Publications.
- Neumann, I. D., Wegener, G., Homberg, J. R., Cohen, H., Slattery, D. A., Zohar, J., ... Math??, A. (2011). Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *35*(6), 1357–1375. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.028>
- Neumeister, A., Normandin, M. D., Pietrzak, R. H., Piomelli, D., Zheng, M. Q., Gujarro-Anton, A., ... Huang, Y. (2013). Elevated brain cannabinoid CB1 receptor availability in post-traumatic stress disorder: a positron emission tomography study. *Molecular Psychiatry*, *18*(9), 1034–1040. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.61>

- Neumeister, A., Seidel, J., Ragen, B. J., & Pietrzak, R. H. (2015). Translational evidence for a role of endocannabinoids in the etiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology*, *51*, 577–584. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.10.012>
- Nietzsche, F. W. (1907). *Also sprach Zarathustra: Ein Buch für alle und keinen*. Leipzig: C. G. Naumann.
- O'Sullivan, S. E. (2009). Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *British Journal of Pharmacology*, *152*(5), 576–582. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707423>
- Ohno-Shosaku, T., & Kano, M. (2014). Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Current Opinion in Neurobiology*, *29*, 1–898. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.03.017>
- Oliveira da Cruz, J. F., Robin, L. M., Drago, F., Marsicano, G., & Metna-Laurent, M. (2016). Astroglial type-1 cannabinoid receptor (CB1): A new player in the tripartite synapse. *Neuroscience*, *323*, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.002>
- Palmer, S. L., Thakur, G. A., & Makriyannis, A. (2002). Cannabinergic ligands. *Chemistry and Physics of Lipids*, *121*(1–2), 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(02\)00143-3](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(02)00143-3)
- Pang, E. W., Sedge, P., Grodecki, R., Robertson, a, MacDonald, M. J., Jetly, R., ... Taylor, M. J. (2014). Colour or shape: examination of neural processes underlying mental flexibility in posttraumatic stress disorder. *Translational Psychiatry*, *4*(8), e421. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.63>
- Pardini, M., Krueger, F., Koenigs, M., Raymont, V., Hodgkinson, C., Zoubak, S., ... Grafman, J. (2012). Fatty-acid amide hydrolase polymorphisms and post-traumatic stress disorder after penetrating brain injury. *Transl Psychiatry*, *2*(1), e75. <https://doi.org/http://www.nature.com/tp/journal/v2/n1/supinfo/tp20121s1.html>
- Patel, S., & Hillard, C. J. (2006). Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid. *Journal of Pharmacology and Experimental ...*, *318*(1), 304–311. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.101287.pronounced>
- Perrot-Sinal, T. S., Gregus, A., Boudreau, D., & Kalynchuk, L. E. (2004). Sex and repeated restraint stress interact to affect cat odor-induced defensive behavior in adult rats. *Brain Research*, *1027*(1–2), 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.08.056>
- Pertwee, R. G., Howlett, a C., Abood, M. E., Alexander, S. P. H., Marzo, V. Di, Elphick, M. R., ... Kunos, G. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology . LXXIX . Cannabinoid Receptors and Their Ligands : Beyond CB 1 and CB 2. *Pharmacological Reviews*, *62*(4), 588–631. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003004.588>
- Pietrzak, R. H., Huang, Y., Corsi-Travali, S., Zheng, M.-Q., Lin, S., Henry, S., ... Neumeister, A. (2014). Cannabinoid type 1 receptor availability in the amygdala mediates threat processing in trauma survivors. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *39*(11), 2519–28. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.110>
- Prospéro-García, O., Amancio-Belmont, O., Becerril-Meléndez, A. L., Ruiz-Contreras, A. E., & Méndez-Díaz, M. (2016). Endocannabinoids and sleep. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *71*, 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.10.005>
- Qin, Z., Zhou, X., Pandey, N. R., Vecchiarelli, H. A., Stewart, C. A., Zhang, X., ... Chen, H. H. (2015). Chronic Stress Induces Anxiety via an Amygdalar Intracellular Cascade that Impairs Endocannabinoid Signaling. *Neuron*, *85*(6), 1319–1331. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.015>
- Rademacher, D. J., Meier, S. E., Shi, L., Vanessa Ho, W. S., Jarrahan, A., & Hillard, C. J. (2008). Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. *Neuropharmacology*, *54*(1), 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.06.012>
- Ramsay, D. S., & Woods, S. C. (2014). Clarifying the roles of homeostasis and allostasis in physiological regulation. *Psychological Review*, *121*(2), 225–247. <https://doi.org/10.1037/a0035942>
- Ravindran, L. N., & Stein, M. B. (2009). Pharmacotherapy of PTSD: Premises, principles, and priorities. *Brain Research*, *1293*, 24–39. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.03.037>
- Roberts, C. J., Stuhr, K. L., Hutz, M. J., Raff, H., & Hillard, C. J. (2014). Endocannabinoid signaling in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis recovery following stress: Effects of indirect agonists and comparison of male and female mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *117*, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.026>

- Roelofs, K. (2017). Freeze for action: neurobiological mechanisms in animal and human freezing. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1718), 20160206. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0206>
- Rueda-Orozco, P. E., Montes-Rodriguez, C. J., Ruiz-Contreras, A. E., Mendez-Diaz, M., & Prospero-Garcia, O. (2017). The effects of anandamide and oleamide on cognition depend on diurnal variations. *Brain Research*, 1672, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.08.002>
- Ruehle, S., Rey, A. A., Remmers, F., & Lutz, B. (2012). The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 26(1), 23–39. <https://doi.org/10.1177/0269881111408958>
- Sánchez Castillo, H., Paz-Trejo, D., Vazquez Ramírez, J., Zarate González, P., & Migliaro, M. (2014). Neurobiology of Posttraumatic Stress Disorder (PTSD) and its Frontostriatal Implications: a short review. *Actualidades En Psicología*, 28(117), 13. <https://doi.org/10.15517/ap.v28i117.14131>
- Schelling, G., Briegel, J., Roozendaal, B., Stoll, C., Rothenhäusler, H. B., & Kapfhammer, H. P. (2001). The effect of stress doses of hydrocortisone during septic shock on posttraumatic stress disorder in survivors. *Biological Psychiatry*, 50(12), 978–985. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01270-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01270-7)
- Schramm-Sapota, N. L., Cha, Y. M., Chaudhry, S., Wilson, W. A., Swartzwelder, H. S., & Kuhn, C. M. (2007). Differential anxiogenic, aversive, and locomotor effects of THC in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology*, 191(4), 867–877. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0676-9>
- Schwabe, L., Joëls, M., Roozendaal, B., Wolf, O. T., & Oitzl, M. S. (2012). Stress effects on memory: An update and integration. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1740–1749. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.002>
- Shepherd, J. K., Grewal, S. S., Fletcher, A., Bill, D. J., & Dourish, C. T. (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, 116(1), 56–64. <https://doi.org/10.1007/BF02244871>
- Shin, L. M., & Liberzon, I. (2010). The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), 169–191. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.83>
- Smith, A. M., & Thomas, A. K. (2017). Reducing the Consequences of Acute Stress on Memory Retrieval. *Journal of Applied Research in Memory and Cognition*. <https://doi.org/10.1016/j.jarmac.2017.09.007>
- Sociedad Mexicana de Psicología. (2007). *Código Ético del Psicólogo*. *Revista Internacional de Seguridad Social*. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1734.2010.01367.x>
- Staples, L. G. (2010). Predator odor avoidance as a rodent model of anxiety: Learning-mediated consequences beyond the initial exposure. *Neurobiology of Learning and Memory*, 94(4), 435–445. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.09.009>
- Starowicz, K., Nigam, S., & Di Marzo, V. (2007). Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacology and Therapeutics*, 114(1), 13–33. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.01.005>
- Steiner, M. A., Wanisch, K., Monory, K., Marsicano, G., Borroni, E., Bachli, H., ... Wotjak, C. T. (2008). Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice. *Pharmacogenomics Journal*, 8(3), 196–208. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500466>
- Steiner, M. A., & Wotjak, C. T. (2008). Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Brain Research*, 170(8), 397–432. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00433-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00433-0)
- Stella, N. (2009). Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology*, 56(SUPPL. 1), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.037>
- Svíženská, I., Dubový, P., & Šulcová, A. (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures - A short review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 90(4), 501–511. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.05.010>
- Tasker, J. G., & Herman, J. P. (2011). Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Stress*, 14(4), 398–406. <https://doi.org/10.3109/10253890.2011.586446>
- Tovote, P., Fadok, J. P., & Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 317–331. <https://doi.org/10.1038/nrn3945>
- Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 397–409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>
- Vargas-López, V., Torres-Berrio, A., González-Martínez, L., Múnera, A., & Lamprea, M. R. (2015). Acute

- restraint stress and corticosterone transiently disrupts novelty preference in an object recognition task. *Behavioural Brain Research*, 291(45), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.05.006>
- Vázquez, C., Tolón, R. M., Grande, M. T., Caraza, M., Moreno, M., Koester, E. C., ... Romero, J. (2015). Endocannabinoid regulation of amyloid-induced neuroinflammation. *Neurobiology of Aging*, 36(11), 3008–3019. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.003>
- Wade, M. R., Degroot, A., & Nomikos, G. G. (2006). Cannabinoid CB1 receptor antagonism modulates plasma corticosterone in rodents. *European Journal of Pharmacology*, 551(1–3), 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.08.083>
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Wang, M., Hill, M. N., Zhang, L., Gorzalka, B. B., Hillard, C. J., & Alger, B. E. (2012). Acute restraint stress enhances hippocampal endocannabinoid function via glucocorticoid receptor activation. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 26(1), 56–70. <https://doi.org/10.1177/0269881111409606>
- Wang, Q., Yu, K., Wang, J., Lin, H., Wu, Y., & Wang, W. (2012). Predator stress-induced persistent emotional arousal is associated with alterations of plasma corticosterone and hippocampal steroid receptors in rat. *Behavioural Brain Research*, 230(1), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.01.051>
- Wenger, T., Jamali, K. a, Juanéda, C., Léonardelli, J., & Tramu, G. (1997). Arachidonyl ethanolamide (anandamide) activates the parvocellular part of hypothalamic paraventricular nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(3), 724–728. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7222>
- Whitaker, A. M., & Gilpin, N. W. (2015). Blunted Hypothalamo-pituitary Adrenal Axis Response to Predator Odor Predicts High Stress Reactivity. *Physiology & Behavior*, 147, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.03.033>
- Wiedemann, K. (2015). *Anxiety and Anxiety Disorders. International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences* (Second Edi, Vol. 1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097086-8.27006-2>
- Wilker, S., Pfeiffer, A., Elbert, T., Ovuga, E., Karabatsiakos, A., Krumbholz, A., ... Kolassa, I. T. (2016). Endocannabinoid concentrations in hair are associated with PTSD symptom severity. *Psychoneuroendocrinology*, 67, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.02.010>
- Witkamp, R. (2015). Fatty acids, endocannabinoids and inflammation. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.051>
- Xu, H. Y., Liu, Y. J., Xu, M. Y., Zhang, Y. H., Zhang, J. X., & Wu, Y. J. (2012). Inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis suppresses the innate fear responses of rats induced by the odor of cat urine. *Neuroscience*, 221, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.056>
- Yang, L., Wang, M., Guo, Y. Y., Sun, T., Li, Y. J., Yang, Q., ... Wu, Y. M. (2015). Systemic inflammation induces anxiety disorder through CXCL12/CXCR4 pathway. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.001>
- Zanettini, C., Panlilio, L. V, Alicki, M., Goldberg, S. R., Haller, J., & Yasar, S. (2011). Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5(September), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00057>
- Zhang, H., Shang, Y., Xiao, X., Yu, M., & Zhang, T. (2017). Prenatal stress-induced impairments of cognitive flexibility and bidirectional synaptic plasticity are possibly associated with autophagy in adolescent male-offspring. *Experimental Neurology*, 298(March), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.09.001>
- Ziegler, C. G., Mohn, C., Lamounier-Zepter, V., Rettori, V., Bornstein, S. R., Krug, a W., & Ehrhart-Bornstein, M. (2010). Expression and function of endocannabinoid receptors in the human adrenal cortex. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Metabolisme*, 42(2), 88–92.
- Zohar, J., Matar, M. A., Ifergane, G., Kaplan, Z., & Cohen, H. (2008). Brief post-stressor treatment with pregabalin in an animal model for PTSD: Short-term anxiolytic effects without long-term anxiogenic effect. *European Neuropsychopharmacology*, 18(9), 653–666. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.04.009>
- Zohar, J., Sonnino, R., Juven-Wetzler, A., & Cohen, H. (2009). Can posttraumatic stress disorder be prevented? *CNS Spectrums*, 14(1 Suppl 1), 44–51.