



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

LA SEPARACIÓN MATERNA Y EL AISLAMIENTO SOCIAL MODIFICAN A LOS SISTEMAS
DOPAMINÉRGICO Y ENDOCANNABINOIDE Y FACILITAN EL CONSUMO DE ALCOHOL EN
RATAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

OCTAVIO AMANCIO BELMONT

DIRECTOR DE TESIS

DR. ÓSCAR PROSPÉRO GARCÍA

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DRA. MILAGROS MÉNDEZ UBACH

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA

DR. JOSÉ ALONSO FERNÁNDEZ-GUASTI

CINVESTAV

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 mis padres y abuelos, por ser ejemplos de vida

Reconocimiento a los apoyos otorgados

Esta tesis se realizó gracias a los proyectos IN218316, IN215218, IN218620 otorgados al Dr. Óscar Próspero García por PAPIIT DGAPA-UNAM.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que se me otorgó para realizar la presente investigación.

Agradecimientos

Esta tesis doctoral refleja el trabajo de los últimos años. Muchas personas participaron directa o indirectamente para culminar este trabajo. Agradezco a todas aquellas personas que me han apoyado a lo largo de este camino.

Agradezco en especial a mis padres y hermano por el apoyo incondicional, consejos y sabiduría. A mis abuelos, que aunque ya no están físicamente conmigo, son ejemplos de vida.

A mi tutor, el Dr. Óscar Prospéro por el apoyo, la orientación, asesoría y retroalimentación. Y por permitir trabajar con él en el laboratorio de Canabinoides. A la Dra. Mónica Méndez y a los integrantes del laboratorio de Canabinoides.

También quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM por darme las herramientas y conocimientos. Al CONACyT que me otorgó la beca sin la cual gran parte de este trabajo no habría sido posible.

Asimismo, agradezco al comité tutorial y a los miembros del jurado de mi examen de grado, por el apoyo, los comentarios y sugerencias que enriquecieron el trabajo y el manuscrito de la Tesis. Y al bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM por la crianza de todos los animales de experimentación que se utilizaron para desarrollar este proyecto.

¡Gracias!

Índice General

	Pág.
Índice General	i
Índice de Figuras	iv
Listado de Abreviaturas	vi
Resumen	ix
Abstract	x
Introducción	1
Capítulo 1: Neurobiología del consumo de alcohol	1
1.1 Consumo de alcohol y trastorno por consumo de alcohol	1
1.2 Neurobiología del consumo del alcohol	3
1.2.1 El sistema de motivación-recompensa (Sistema del placer)	3
1.2.2 Sistema dopaminérgico	6
1.2.3 La función de la dopamina y sus receptores en el reforzamiento y consumo de alcohol	11
1.3 Regulación del sistema de motivación y recompensa	16
1.4 Corteza prefrontal, el reforzamiento y adicción	21
Capítulo 2: Sistema endocannabinoide	23
2.1 Receptores cannabinoides	23
2.2 Endocannabinoides	26
2.3 Funciones fisiológicas del sistema endocannabinoide	31
2.3.1 Participación del sistema endocannabinoide en el consumo de alcohol y el sistema de motivación recompensa	32
Capítulo 3: Estrés temprano y su relación con las adicciones	36
3.1 Privación de cuidado materno, como modelo animal para el estudio del estrés temprano	37
3.2.1 Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)	39

3.2.2 Sistema dopaminérgico	40
3.2.3 Sistema endocannabinoide	41
3.3 Cambios conductuales asociados al cuidado negligente	42
3.3.1 Conducta tipo ansiedad	42
3.3.2 Conductas reforzadas y Adicción	42
3.4 Aislamiento social, como modelo animal para el estudio del estrés temprano	44
3.5 Cambios Neuroquímicos asociados al aislamiento social (AS)	45
3.5.1 Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA).	45
3.5.2 Sistema dopaminérgico	45
3.5.3 Sistema endocannabinoide	46
3.6 Cambios conductuales asociados al aislamiento social	47
3.6.1 Conducta tipo ansiedad	47
3.5.2 Conductas reforzadas y Adicción	48
Capítulo 4: Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos	50
4.1 Planteamiento del problema y pregunta experimental	50
4.2 Hipótesis	51
4.3 Objetivos	51
4.3.1 Objetivo General	51
4.3.2 Objetivos particulares	52
Capítulo 5: Metodología General	53
5.1 Experimento 1	53
5.1.1 Animales	53
5.1.2 Privación de cuidado materno	54
5.1.3 Laberinto elevado de brazos abiertos	54
5.1.4 Protocolo de autoadministración de alimento	55
5.1.5 Protocolo de consumo voluntario de alcohol	56
5.1.6 Western blot	57

5.1.7 Análisis estadístico	59
5.2 Experimento 2	60
5.2.1 Animales	60
5.2.2 Privación de cuidado materno	61
5.2.3 Laberinto elevado de brazos abiertos	62
5.2.4 Protocolo de consumo voluntario de alcohol	62
5.2.5 Western blot	62
5.2.6 Análisis estadístico	63
Capítulo 6: Resultados	64
6.1 Experimento 1	64
6.1.1 Datos conductuales	64
6.1.2 Expresión del receptor CB1	67
6.2 Experimento 2	70
6.2.1 Datos conductuales	70
6.2.2 Expresión del receptor CB1 y CB2	76
6.2.3 Expresión del receptor D2 y D3	77
Capítulo 7: Discusión	79
7.1 Experimento 1	79
7.2 Experimento 2	83
Capítulo 8: Conclusiones	88
Referencias	89

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1.1: Descubrimiento del sistema de motivación-recompensa (Experimento de Olds).	4
Figura 1.2: Sistema de motivación-recompensa.	6
Figura 1.3: Neurotransmisión dopaminérgica.	8
Figura 1.4: Regulación del área tegmental ventral.	17
Figura 2.1: Distribución y expresión del receptor CB1 en el cerebro de rata.	25
Figura 2.2: Vías de síntesis y degradación de endocannabinoides y mecanismo de transducción de señales de los receptores CB1 y CB2.	27
Figura 2.3: Estructura química de los principales endocannabinoides.	28
Figura 2.4: Biosíntesis de anandamida	30
Figura 2.5: Biosíntesis del 2-araquidonil glicerol (2-AG).	31
Figura 5.1: Línea del tiempo del experimento 1.	54
Figura 5.2: Línea del tiempo del experimento 2	61
Figura 6.1: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) en la conducta tipo ansiedad.	65
Figura 6.2: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) en el consumo de alcohol.	67
Figura 6.3: Receptor CB1 en la CPF.	68
Figura 6.4: Receptor CB1 en el NAcc.	69
Figura 6.5: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) y el aislamiento social (AS) en las conductas tipo ansiedad.	71
Figura 6.6: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) y el aislamiento social (AS) en el consumo y preferencia por el alcohol	74

Figura 6.7: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) y el aislamiento social (AS) en el consumo total de líquido y en el consumo total de calorías.	75
Figura 6.8: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) y el aislamiento social (AS) en el consumo diario de alcohol.	76
Figura 6.9: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) y el aislamiento social (AS) en la expresión de receptores a cannabinoides CB1 y CB2 en el NAcc	77
Figura 6.10: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) y el aislamiento social (AS) en la expresión dopaminérgicos D2 y D3.	78

Listado de abreviaturas

2-AG	2-araquidonil glicerol
3-MT	3-metoxitiramina
AC	adenilato ciclase
ACTH	corticotropina
AEA	anandamida
AMPC	adenosina-5-aminofosfato cíclico
ANOVA	análisis de varianza
ARN m	ARN mensajero
AS	Aislamiento social
BLA	amígdala basolateral
BNST	núcleo cama de la estría terminalis
BP	<i>breakpoint</i>
CB1	receptor canabinoide 1
CB2	receptor canabinoide 2
CBs	cannabinoides
CeA	núcleo central de la amígdala
Cl ⁻	cloro
COMT	catecol-O-metiltransferasa
CPA	condicionamiento aversivo de lugar
CPF	corteza prefrontal
CPP	condicionamiento de preferencia de lugar
CRF	factor liberador de corticotropina
CxF	corteza frontal
D1	receptor dopaminérgico 1
D2	receptor dopaminérgico 2
D3	receptor dopaminérgico 3
DA	dopamina
DAG	diacilglicerol
DAGL	diacil-glicerol lipasa

DAT	transportador de dopamina
DOPAC	ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DPN	día postnatal
EAN	Experiencias Adversas durante la Niñez
eCB	endocannabinoide
eCBs	endocannabinoides
FAAH	amido hidrolasa de ácidos grasos
FR	Razón fija
GABA	ácido γ -aminobutírico
GR	receptores a glucocorticoides
HbL	habénula lateral
HHA	hipotálamo-hipófisis-adrenal
HL	hipotálamo lateral
HVA	ácido homovanílico
IL	infralímbica
IP3	inositol trifosfato
K ⁺	potasio
KO	<i>knock-out</i>
LC	locus coeruleus
LDT	núcleo laterodorsal tegmental
MGL	lipasa de monoacilglicéridos
MAO	monoamina oxidasa
MOR	Receptor mu opioide
MSN	neuronas espinosas medianas
Na ⁺	sodio
NAAA	N-aciletanolaminas
NAcc	núcleo accumbens
NADA	<i>N</i> -araquidonildopamina
NPB	núcleo parabraquial
NAPE	<i>N</i> -araquidonil-fosfatidiletanolamina
NAPE-PLD	fosfolipasa D selectiva para el <i>N</i> -araquidonil-fosfatidiletanolamina
NAT	N-aciltransferasa

NE	noladin-éter
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCM	privación de cuidado materno
PET	tomografía de emisión de positrones
PIP2	fosfoinositol-bi-fosfato
PKA	proteína quinasa A
PLC	fosfolipasa C
PLCx	Corteza prelímbica
PN	postnatal
PPT	núcleo pedúnculo pontino tegmental
PV	pálido ventral
PVDF	polifluoruro de vinilo
PVN	núcleo paraventricular
RD	raphé dorsal
RMTg	núcleo rostromedial tegmental
SeCB	sistema endocannabinoide
SGP	sustancia gris periacueductal
SNC	sistema nervioso central
TCA	trastorno por consumo de alcohol
TH	tirosina hidroxilasa
THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
VMAT2	transportador vesicular de monoaminas 2
VTA	área tegmental ventral
WT	tipo silvestre

Resumen

El trastorno por consumo de alcohol (TCA) es un problema de salud pública. La vulnerabilidad para desarrollar un TCA está determinada por una combinación de factores genéticos y ambientales. Las experiencias adversas sufridas en los primeros 18 años de vida vulneran a los individuos a desarrollar trastornos psiquiátricos como el TCA y trastornos de ansiedad. Se han empleado diversos modelos animales, p. e., la privación de cuidado materno (PCM) o el aislamiento social en la adolescencia, para estudiar las consecuencias del estrés temprano. Diversos estudios han mostrado que los sistemas dopaminérgico y endocannabinoide median los efectos reforzantes del alcohol. En este estudio evaluamos los efectos de la PCM, el aislamiento social en la adolescencia y la combinación de ambos en el consumo de alcohol, la conducta tipo ansiedad y en la expresión de receptores cannabinoide CB1 y CB2, y dopaminérgicos D2 y D3 en el núcleo accumbens (NAcc). El estudio muestra que la PCM, el aislamiento social y la combinación de ambos aumenta la conducta tipo ansiedad y el consumo de alcohol en ratas macho. Además, hay una sobreexpresión de los receptores D2 y D3 en el NAcc en ratas expuestas a la PCM, aislamiento social y PCM + aislamiento social. En cambio, sólo la PCM aumenta la expresión del receptor CB1. Mientras que no se encontraron cambios en la expresión del receptor CB2.

Abstract

Alcohol use disorder is a public health problem. The vulnerability to developing an alcohol use disorder is determined by a combination of genetic and environmental factors. Early life adversity increases the vulnerability to develop psychiatric disorders such as anxiety disorders and alcohol use disorder. Animal models have been used, e.g., maternal care deprivation or social isolation in adolescence, to study the consequences of early life stress. The dopaminergic and endocannabinoid systems mediate the reinforcing effects of alcohol. In this study we evaluated the effects of maternal care deprivation, social isolation in adolescence and both on alcohol consumption, anxiety-like behavior and on the expression of cannabinoid receptors (CB1 and CB2), and dopaminergic receptors (D2 and D3) in the nucleus accumbens (NAcc). The study shows that maternal care deprivation, social isolation and the combination of both increase anxiety-like behavior and alcohol consumption in male rats. In addition, there is an overexpression of D2 and D3 receptors in the NAcc in rats exposed to maternal care deprivation, social isolation, and the combination of both. In contrast, only maternal care deprivation increases the expression of the CB1 receptor. While there are no changes in the expression of the CB2 receptor.

INTRODUCCIÓN

1. Neurobiología del consumo de alcohol

1.1 Consumo de alcohol y trastorno por consumo de alcohol

El alcohol es la sustancia ubicua en nuestra sociedad, y es la sustancia de abuso más consumida en el mundo en forma de bebidas alcohólicas debido a sus efectos sociales y recreativos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, en promedio, los individuos mayores de 15 años consumen 6.2 litros de alcohol puro per cápita al año (WHO, 2018). En 2014, en Estados Unidos (EE. UU.) el 87.6% de las personas mayores de 18 años reportaron haber consumido alcohol por lo menos una vez en la vida y 54% reportó haber consumido alcohol por lo menos una vez en el último mes (SAMHSA, 2019). En México, 77.3% de la población entre 18 y 65 años ha consumido al menos una vez en su vida alcohol y 39.9% una vez en el último mes (Muñiz, 2017).

El consumo de alcohol es el tercer factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades, accidentes, muerte prematura y discapacidad en el mundo. Casi el 5% de todas las muertes en todo el mundo se atribuyen al consumo de alcohol (Hammer, Parent, Spiker, & World Health Organization, 2018). La OMS estima que anualmente mueren alrededor de 2.5 millones de personas por causas relacionadas al alcohol, y que entre el 20 % de los accidentes automovilísticos son atribuibles al consumo del alcohol (Hammer et al., 2018; WHO, 2009). De igual forma, el consumo

de alcohol ocasiona muchos problemas sociales graves, como la violencia, el abandono y abuso infantil y el ausentismo en el lugar de trabajo (Hammer et al., 2018).

A pesar de que la gran mayoría de la población a nivel mundial ha consumido alcohol y un gran porcentaje son usuarios recurrentes, la proporción de usuarios de bebidas alcohólicas que desarrolla un trastorno por consumo de alcohol o adicción al alcohol solo representa una pequeña parte de esta población. Por ejemplo, en México, solo el 5.4% de los individuos entre 12 y 65 años cumple con el criterio de trastorno por consumo de alcohol (Muñiz, 2017), en EEUU el 5.3% de individuos mayores a 18 años han desarrollado un trastorno por consumo de alcohol (SAMHSA, 2019). El trastorno por consumo de alcohol está caracterizado por el consumo en cantidades o periodos mayores a lo que se pretendía, el sujeto siente un fuerte deseo por ingerir alcohol, el consumo se mantiene a pesar de conocer los problemas físicos y psicológicos causados por el mismo, la tolerancia, el síndrome de abstinencia, el deterioro social, entre otros (DSM-5; APA, 2013).

Los estudios epidemiológicos sugieren que no todos los individuos que consumen alcohol de manera recreativa y recurrente se vuelven adictos. Diversas investigaciones han sugerido que existen factores genéticos y ambientales que predisponen a un individuo a que desarrolle un trastorno por consumo de alcohol (Enoch, 2011; Enoch & Goldman, 2001; Hines et al., 2015). Para interés de este trabajo sólo se abordará el estrés temprano, el cual se abordará en el capítulo 3, como uno de los muchos factores ambientales que predisponen a que un individuo desarrolle trastorno por consumo de alcohol, sin embargo, cabe mencionar que a la

fecha se han detectado diversos genes involucrados en la predisposición al desarrollo del trastorno por consumo de alcohol, por ejemplo, genes que codifican a las diferentes subunidades del receptor GABA_A (*Gabra1, Gabra5, Gabrd, Gabrr1*), que codifican a receptores dopaminérgicos (*Drd1, Drd2, Drd3*), serotoninérgicos (*Htr1b, Htr3a*), a receptores opioides (*Oprm1, Oprd1, Oprk1*) y cannabinoides (*Cnr1, Cnr2*) y genes que codifican a enzimas relacionadas con el metabolismo del alcohol (*Adh2, Adh3, Aldh2*) y de algunos neurotransmisores (*Dbh, Faah, Comt*) (Enoch & Goldman, 2001; Kimura & Higuchi, 2011).

1.2 Neurobiología del consumo del alcohol

El alcohol ha sido utilizado desde la antigüedad para alcanzar un estado eufórico y de bienestar. Sin embargo, fue hasta 1954 cuando se empezaron a descubrir los sustratos neuroanatómicos y los mecanismos neurobiológicos que explicaban los efectos placenteros del alcohol. La historia comienza en la década de los 50 cuando los investigadores James Olds y Peter Milner en la McGill University descubren por serendipia el sistema del placer o sistema de motivación y recompensa (Olds & Milner, 1954).

1.2.1 El sistema de motivación-recompensa (Sistema del placer)

Olds y Milner observaron que los animales repetidamente regresaban a un área del laboratorio en donde los animales habían recibido una leve estimulación eléctrica en estructuras subcorticales, anatómicamente asociadas con el haz medial

del cerebro basal anterior. Modificando una caja operante, lograron que los animales presionaran una palanca para autoestimularse eléctricamente esa zona del cerebro. Las ratas llegaron a presionar la palanca hasta siete mil veces por hora para recibir la estimulación eléctrica (Figura 1) (Olds & Milner, 1954). A raíz de este descubrimiento Olds realizó numerosos estudios para mapear el sistema de motivación-recompensa y determinar su importancia en la modulación de la conducta; mostró que las ratas preferían presionar la palanca en lugar de consumir alimento, aunque estuvieran hambrientas; al agua, aunque estuvieran sedientas; a una hembra en estro, o incluso eran capaces de cruzar una rejilla electrificada con el fin de autoestimularse en el “sistema del placer” (Olds, 1956). De esta forma mostró que existía un sistema cerebral encargado del reforzamiento y de la sensación subjetiva de placer.

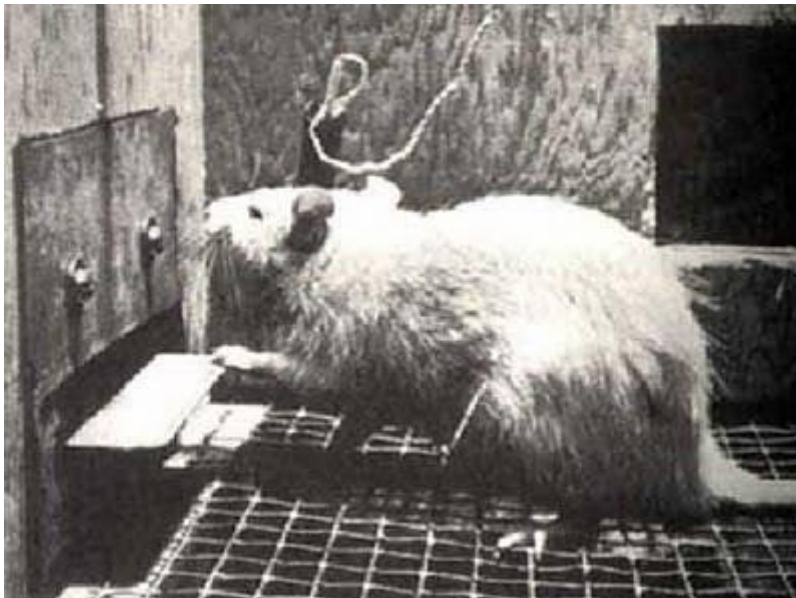


Figura 1.1: Descubrimiento del sistema de motivación-recompensa (Experimento de Olds). Tomada de Olds, 1956. Ilustra el experimento de Olds, donde una rata implantada presiona de forma repetida una palanca para recibir un pulso eléctrico (Olds, 1956).

Más tarde, en primates no humanos y utilizando la estimulación eléctrica intracraneal se confirmó que existía una correlación entre los sustratos anatómicos en el cerebro de primates con los de los roedores (Routtenberg, Gardner, & Huang, 1971). Posteriormente, se determinó que las fibras mielinizadas descendentes del haz medial del cerebro anterior eran el sustrato neural de la recompensa por estimulación eléctrica (Gallistel, Shizgal, & Yeomans, 1981). Este sistema tiene origen en los núcleos cama del haz medial del prosencéfalo, las fibras descienden al área tegmental ventral (VTA, por sus siglas en inglés) del mesencéfalo a través del fascículo prosencefálico medial, y ascienden a través de este mismo fascículo a varias estructuras que incluyen el NAcc, el tubérculo olfatorio, la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal (CPF) (Gardner, 2011); esta vía también es conocida como la vía dopaminérgica mesocorticolímbica (Figura 1.2). Este sistema media las propiedades reforzantes de reforzadores naturales y necesarios como el alimento, el sexo y la crianza (Hansen, Harthorn, Wallin, Löfberg, & Svensson, 1991; Schultz, 1997). De igual forma, en humanos, se activa con otro tipo de estímulos placenteros como reforzadores monetarios, escuchar música, mirar fotos de amigos o la pareja (Kampe, Frith, Dolan, & Frith, 2001; Koeppe et al., 1998; Menon & Levitin, 2005; Pappata et al., 2002). Además, las sustancias de abuso, incluido el alcohol, activan al sistema de motivación-recompensa (Volkow & Morales, 2015). Adicionalmente, diversos estudios han demostrado que la liberación de dopamina en el NAcc está involucrada en la sensación placentera generada por estos reforzadores (Hajnal & Norgren, 2001; Pappata et al., 2002).

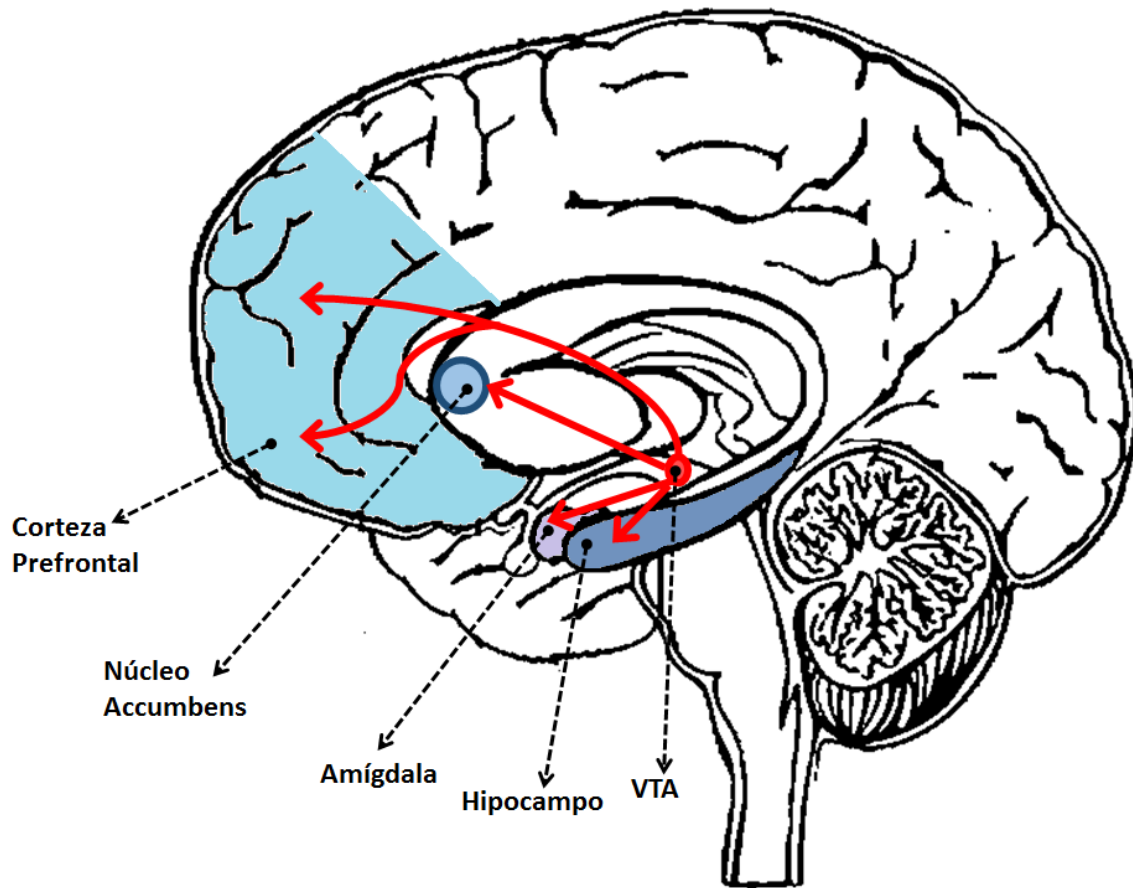


Figura 1.2: Sistema de motivación-recompensa. Ilustra en un corte sagital de cerebro humano la vía dopaminérgica mesocorticolímbica que proyecta del VTA al NAcc, el hipocampo, la amígdala y a la CPF.

1.2.2 Sistema dopaminérgico

La dopamina (DA) se descubrió en 1957 en el cerebro de diferentes especies animales, incluido en el cerebro humano por Kathleen Montagu y Arvid Carlsson; aunque fue Carlsson el primero en mostrar que se trataba de un nuevo neurotransmisor y no sólo un precursor de la noradrenalina (Carlsson, Lindqvist, & Magnusson, 1957; Montagu, 1957). La DA es biosintetizada a partir de la L-tirosina a través de la tirosina hidroxilasa (TH) para transformarla en L-dopa, la cual a su

vez es sustrato de la DOPA-descarboxilasa, que finalmente la transforma en DA (Christenson, Dairman, & Udenfriend, 1970). Una vez sintetizada la DA en las neuronas dopaminérgicas es vesiculada a través del transportador vesicular de monoaminas 2 o VMAT2 para protegerla de ser degradada por acción enzimática (Figura 1.3). La concentración dentro de las vesículas es 10 a 1000 veces mayor que en el citosol (Eiden & Weihe, 2011).

Una vez liberada la DA ejerce sus efectos a través de 5 receptores metabotrópicos (D1 - D5) (Figura 1.3). Basados en sus propiedades farmacológicas y estructurales estos receptores se pueden clasificar en dos familias: los receptores tipo D1 y los receptores tipo D2. Los receptores tipo D1 comprenden a los receptores D1 y D5, los cuales están acoplados a una proteína Gs. La activación de estos receptores facilita la actividad de la adenilato ciclasa (AC), lo que produce un incremento en las concentraciones intracelulares de adenosina-5-aminofosfato cíclico (AMPC) (Sunahara et al., 1991; Zhou et al., 1990). Esto induce la activación de la proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés) dando como resultado la fosforilación de diversas proteínas y la inducción en la expresión de genes (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). La familia de receptores tipo D2 comprenden a los receptores D2, D3 y D4 y están acoplados a una proteína Gi, la cual inhibe la formación intracelular de AMPC (Dal Toso et al., 1989; Sokoloff, Giros, Martres, Bouthenet, & Schwartz, 1990; Van Tol et al., 1991), reduciendo la actividad de la PKA, activando canales de K⁺ y modulando otros canales iónicos (Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

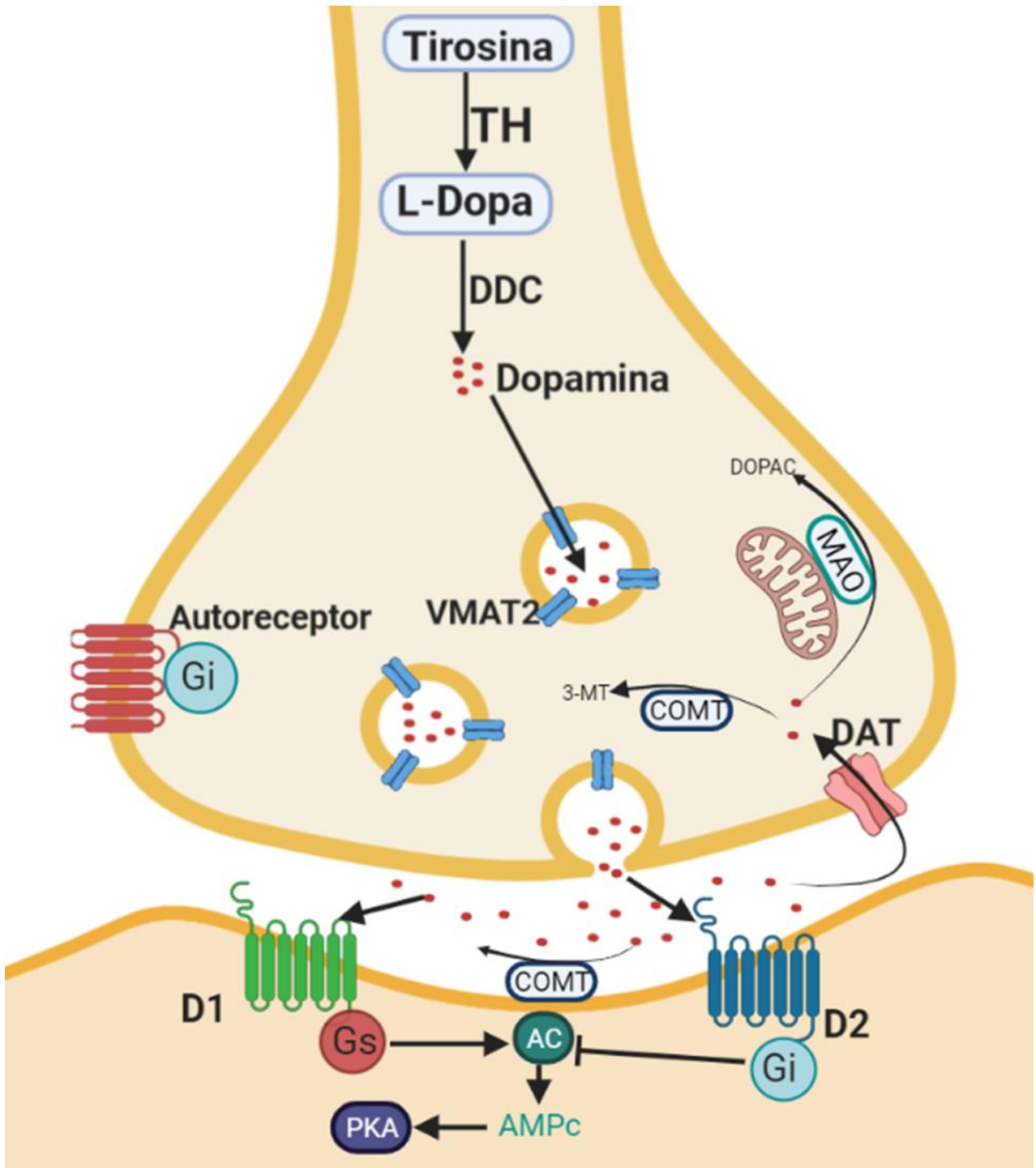


Figura 1.3: Neurotransmisión dopaminérgica. Ilustra la síntesis de dopamina (DA) a partir de tirosina. La DA es vesiculada por el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2) para que pueda ser liberada en el espacio sináptico. Después de ser liberada puede activar a los receptores tipo D1 o D2 o a los autoreceptores, o ser transportada al interior de la neurona presináptica a través del transportador de dopamina (DAT) para que pueda ser degradada por la monoamino oxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT). Creado con BioRender.com.

El receptor D1 está expresado principalmente en el caudado-putamen, NAcc, bulbo olfatorio, sustancia nigra, amígdala y en la corteza frontal (CxF), y en menor cantidad en el cerebelo, hipocampo, tálamo e hipotálamo (Mengod et al., 1991; Missale, Russel Nash, Robinson, Jaber, & Caron, 1998). En contraste, el receptor D5 tiene una menor expresión en comparación con el receptor D1. Y se encuentra expresado principalmente en la corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo, caudado-putamen, NAcc y sustancia nigra (Missale et al., 1998). En cambio, el receptor D2 se encuentra expresado principalmente en el estriado, NAcc y bulbo olfatorio y en menor concentración en el VTA, sustancia nigra, septum, amígdala, hipocampo, hipotálamo y en la corteza cerebral (Bouthenet et al., 1991; Jackson & Westlind-Danielsson, 1994). Mientras que el patrón de distribución del receptor D3 está más limitado y sólo ha mostrado su expresión en el NAcc, bulbo olfatorio, estriado dorsal, VTA y en el cerebelo (Bouthenet et al., 1991; Diaz et al., 1995; Jackson & Westlind-Danielsson, 1994), mientras el D4 se encuentra principalmente expresado en la corteza frontal, amígdala, hipotálamo, mesencéfalo e hipocampo (Missale et al., 1998; Van Tol et al., 1991).

La DA es recapturada por la neurona presináptica a través de un transportador dependiente de Na^+ y Cl^- , mejor conocido como DAT (Harrington, Augood, Kingsbury, Foster, & Emson, 1996). La DA puede ser metabolizada en el cerebro por diversas reacciones enzimáticas (Figura 1.3). La monoamina oxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT) son las dos principales enzimas que degradan a la DA. La MAO se localiza en la parte exterior de la membrana de las

mitocondrias y está presente tanto en las terminales sinápticas como en la glía. Se han descrito dos isoformas de la MAO: la isoforma A y B, las cuales están codificadas en dos genes distintos. La MAO-A se expresa preferentemente en las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas, mientras que la MAO-B se expresa preferentemente en glía y en neuronas serotoninérgicas. La MAO se encarga de biotransformar a las catecolaminas a sus respectivos aldehídos, y estos a su vez son oxidados rápidamente por una aldehídoeshidrogenasa, produciendo ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC por sus siglas en inglés). Por otro lado, la COMT cataliza la metilación del catecol gracias a una S-adenosilmetionina para generar 3-metoxitiramina (3-MT) (Eisenhofer, Kopin, & Goldstein, 2004). Se han descrito dos isoformas de la enzima, una soluble y otra que se encuentra acoplada a las membranas. Esta última se encuentra expresada principalmente en el SNC, sobre todo en neuronas y tiene alta afinidad por las catecolaminas. En cambio, la isoforma soluble se encuentra expresada principalmente en la periferia, pero también en la glía, y tiene baja afinidad por las catecolaminas. La expresión y la actividad de la COMT dependen de la estructura; por ejemplo, la expresión y actividad de la enzima es mayor en la corteza frontal que en el estriado y otras partes del cerebro (Eisenhofer et al., 2004). Los principales metabolitos de la DA son el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC por sus siglas en inglés), el ácido homovanílico (HVA por sus siglas en inglés) y en menor medida la 3-MT. El HVA se produce del metabolismo del DOPAC por la COMT y del metabolismo del 3-MT por la MAO (Eisenhofer et al., 2004).

Los niveles extracelulares de DA son modulados a través de dos mecanismos, uno fásico y uno tónico (Floresco, West, Ash, Moorel, & Grace, 2003). La transmisión tónica produce una liberación basal de DA, y está regulada por la actividad de otras neuronas. En contraste, la liberación fásica de DA es generada directamente por potenciales de acción en las neuronas dopaminérgicas que resultan en un aumento rápido y transitorio de las concentraciones de DA extracelulares (Floresco et al., 2003; Venton et al., 2003). La liberación tónica de DA es “baja” en comparación con la liberación fásica. Sin embargo, esta concentración es suficiente para activar a los receptores D2 y D3 presinápticos, debido a la alta afinidad de los receptores tipo D2 por la DA en relación con los receptores tipo D1 (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Tritsch & Sabatini, 2012). En cambio, la liberación fásica de DA puede alcanzar concentraciones de 1.6 mM y saturar a los receptores D2, y activar a los receptores D1 (Dreyer, Herrik, Berg, & Hounsgaard, 2010).

1.2.3 La función de la dopamina y sus receptores en el reforzamiento y consumo de alcohol

Una de las primeras evidencias que relacionaban al sistema dopaminérgico con los efectos farmacológicos del alcohol es un estudio realizado por el grupo del doctor Arvid Carlsson donde mostraba que la α -metiltirosina, un inhibidor de la síntesis de catecolaminas, reducía los efectos eufóricos y hedónicos inducidos por el alcohol (Ahlenius, Arvid Carlsson, Engel, Svensson, & Per Sodersten, 1973). Posteriormente, se mostró que la administración de alcohol en animales de experimentación aumentaba la liberación de DA en el NAcc de manera dosis

dependiente (Di Chiara & Imperato, 1986; Weiss et al., 1993), similar a lo que también se ha mostrado para otras sustancias de abuso (Di Chiara & Imperato, 1988). Adicionalmente, se ha mostrado que la autoadministración de alcohol en ratas con alta preferencia por alcohol muestran una mayor liberación de DA en el NAcc en comparación con ratas con baja preferencia por alcohol (Weiss et al., 1993). También se ha reportado que el consumo de alcohol en humanos promueve la liberación de DA en el estriado ventral (Boileau et al., 2003). Adicionalmente, se ha observado que la administración de alcohol incrementa la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan al NAcc de manera dosis dependiente (Brodie, Shefner, & Dunwiddie, 1990).

Como se mencionó previamente, la DA ejerce sus efectos a través de 5 tipos de receptores dopaminérgicos. Diversos estudios han mostrado la función de estos receptores en el consumo de alcohol (Tabla 1 y 2). Por ejemplo, la administración crónica de un agonista al receptor D1 aumenta la autoadministración de alcohol (D'Souza, Ikegami, Olsen, & Duvauchelle, 2003). Por otro lado, la administración sistémica de un antagonista al receptor D1 reduce el consumo de alcohol (El-Ghundi et al., 1998). De igual forma, la administración en el NAcc de un antagonista D1 reduce la autoadministración de alcohol, mientras la administración intra-NAcc de un agonista D1 no modifica la autoadministración (Hodge, Samson, & Chappelle, 1997). Asimismo, la administración de un antagonista del receptor D1 previene el condicionamiento de preferencia de lugar (CPP) por alcohol cuando se administra de manera sistémica o en el NAcc (Bahi & Dreyer, 2012; Pina & Cunningham, 2014; Young, Dreumont, & Cunningham, 2014). Adicionalmente, ratones *KO* para el

receptor D1 consumen una menor cantidad de alcohol (El-Ghundi et al., 1998) en comparación con los ratones de tipo silvestre (WT, por sus siglas en inglés); mientras que la reducción de la expresión del receptor D1 en el NAcc reduce el consumo de alcohol y el CPP por alcohol (Bahi & Dreyer, 2012).

Tabla 1: Efectos farmacológicos de los receptores dopaminérgicos sobre el consumo y preferencia de alcohol

Mecanismo farmacológico	Administración	Resultado	Referencia
Agonismo D1	Sistémica	↑ Autoadministración	D'Souza et al. 2003
Agonismo D1	Intra-NAcc	Sin efecto	Hodge et al., 1997
Antagonismo D1	Sistémica	↓ Autoadministración ↓ CPP	El-Ghundi et al., 1998; Bahi et al., 2012; Pina & Cunningham, 2014
Antagonismo D1	Intra-NAcc	↓ Autoadministración ↓ CPP	Hodge et al., 1997; Young et al., 2014
Agonismo D2	Intra-VTA	↓ Autoadministración	Nowak et al., 2000
Antagonismo D2	Sistémico	↓ Autoadministración	Czachowski, Chappell, & Samson, 2001; Czachowski, Santini, Legg, & Samson, 2002; Hodge et al., 1997
Antagonismo D2	Intra-NAcc	↓ Autoadministración	Hodge et al., 1997
Antagonismo D2	Intra-VTA	Sin efecto	Nowak et al., 2000
Antagonismo D2	Intra-CPF	↓ Autoadministración	Engleman et al., 2020
Agonismo D3	Sistémico	↑ Autoadministración	Bahi & Dreyer, 2014; Silvestre, O'Neill, Fernández, & Palacios, 1996
Antagonismo D3	Sistémico	↓ Autoadministración	Heidbreder et al., 2007; Leggio et al., 2014; Rice et al., 2015

También se ha mostrado la importancia del receptor D2 en el consumo de alcohol, por ejemplo, la administración sistémica e intra-NAcc de antagonistas D2 reducen la autoadministración de alcohol en animales de experimentación (Czachowski, Chappell, & Samson, 2001; Czachowski, Santini, Legg, & Samson, 2002; Hodge et al., 1997). De igual forma, la administración de un agonista D2 en el VTA reduce el consumo de alcohol; sin embargo, la administración del

antagonista D2 intra-VTA no produce ningún efecto (Nowak, McBride, Lumeng, Li, & Murphy, 2000); en cambio, la administración de un antagonista del receptor D2 en la CPF infralímbica reduce el consumo y la autoadministración de alcohol (Engleman et al., 2020).

Tabla 2: Efectos de la manipulación genética de los receptores dopaminérgicos sobre el consumo y preferencia de alcohol

Receptor	Manipulación genética	Resultado	Referencia
D1	KO	↓ Autoadministración	El-Ghundi et al., 1998
D1	↓Expresión en NAcc	↓ Autoadministración ↓ CPP	Bahi & Dreyer, 2012
D2	KO	↓ Autoadministración	Rising et al., 2000; Phillips et al., 1998
D2	↑Expresión en NAcc	↓ Autoadministración	Thanos et al., 2011, 2004, 2005
D3	KO	↓ Autoadministración	Leggio et al., 2014
D3	↓Expresión en NAcc	↓ Autoadministración ↓ CPP	Bahi & Dreyer, 2014
D3	↑Expresión en NAcc	↑ Autoadministración ↑ CPP	Bahi & Dreyer, 2014

Por otro lado, ratones *KO* del receptor D2 se autoadministran una menor cantidad de alcohol (Risinger, Freeman, Rubinstein, Low, & Grandy, 2000) y consumen una menor cantidad de alcohol en una tarea de elección libre entre una botella de agua y una de alcohol al 10% (Phillips et al., 1998). Por otro lado, la sobreexpresión del receptor D2 en el NAcc reduce el consumo de alcohol, incluso en roedores genéticamente seleccionados para consumir altas cantidades de alcohol (Thanos, Rivera, et al., 2005; Thanos et al., 2004, 2001). Además, cepas de roedores genéticamente seleccionadas para consumir altas cantidades de alcohol tienen menor expresión del D2 en el NAcc en comparación con animales control (Bice, Liang, Zhang, Strother, & Carr, 2008; McBride, Chernet, Dyr, Lumeng, & Li,

1993; Stefanini et al., 1992); hallazgo que también se ha observado en humanos. Utilizando el PET, se ha mostrado que los individuos con trastorno por consumo de alcohol tienen baja expresión del receptor D2 en el estriado (Heinz et al., 2004; Volkow et al., 1996). En contraste, individuos sanos con familiares alcohólicos tienen una alta expresión del D2 en el estriado, sugiriendo un efecto protector del D2 (Volkow et al., 2006). Estas evidencias sugieren que la baja expresión del D2 en el NAcc aumenta la vulnerabilidad a consumir altas cantidades de alcohol.

Asimismo, se ha descrito la participación del receptor D3 en el reforzamiento y consumo de alcohol. Se ha mostrado que la administración de un antagonista al receptor D3 reduce la búsqueda y el consumo de alcohol (Heidbreder et al., 2007; Leggio et al., 2014; Rice et al., 2015), incluso en animales con alto consumo de alcohol (Thanos, Katana, et al., 2005); mientras la administración de un agonista D3 aumenta el consumo de alcohol (Bahi & Dreyer, 2014; Silvestre, O'Neill, Fernández, & Palacios, 1996). Por otro lado, ratones *KO* del receptor D3 consumen una menor cantidad de alcohol que los ratones control (Leggio et al., 2014). En cambio, la sobreexpresión del receptor D3 en el NAcc aumenta el consumo y el CPP por alcohol; mientras que reducción de la expresión del receptor D3 en el NAcc previene el CPP por alcohol y reduce el consumo del mismo (Bahi & Dreyer, 2014). También se ha descrito que el consumo crónico de alcohol aumenta la expresión del ARNm del receptor D3 en el estriado (Leggio et al., 2014).

1.3 Regulación del sistema de motivación y recompensa

El sistema de recompensa está regulado por diversas estructuras. Las neuronas dopaminérgicas del VTA reciben proyecciones glutamatérgicas del núcleo pedúnculo pontino tegmental (PPT), del núcleo laterodorsal tegmental (LDT), de la habénula lateral, (HbL), de la CPF medial, de núcleo cama de la estría terminalis (BNST, por sus siglas en inglés), de la sustancia gris periacueductal (SGP) y del raphé dorsal (RD) (Carr & Sesack, 2000; Charara, Smith, & Parent, 1996; Georges & Aston-Jones, 2001; Omelchenico & Sesack, 2005; Omelchenko & Sesack, 2006, 2010; Qi et al., 2014). También recibe proyecciones GABAérgicas del NAcc, SGP, RD, del hipotálamo lateral (HL), del pálido ventral (VP) y del núcleo rostromedial tegmental (RMTg) (Hjelmstad, Xia, Margolis, & Fields, 2013; Jhou, Fields, Baxter, Saper, & Holland, 2009; Nieh et al., 2016; Omelchenko & Sesack, 2010; Hongbin Yang et al., 2018). Todas estas estructuras (Figura 1.4) regulan la actividad del sistema de motivación y recompensa y por ende el reforzamiento al alcohol. Se ha mostrado las proyecciones glutamatérgicas del LDT que proyectan a las neuronas dopaminérgicas del VTA inervan al NAcc, y su activación optogenética produce CPP (Lammel et al., 2012). Por otro lado, la activación de las neuronas glutamatérgicas del RD libera glutamato en el VTA e incrementan la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas del VTA que a su vez promueven la liberación de DA en el NAcc y el reforzamiento (Qi et al., 2016). En contraste, la activación optogenética de las neuronas glutamatérgicas de la HbL que proyectan a las dopaminérgicas del VTA que proyectan a la CPFm producen condicionamiento aversivo de lugar (CPA, por sus siglas en inglés); y este efecto se ve revertido por la administración de un

antagonista al receptor D1 en la CPFm (Lammel et al., 2012). También se ha mostrado que las neuronas glutamatérgicas de la HbL proyectan al RMTg, la activación optogenética del RMTg también produce aversión al inhibir la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA y previene el consumo de reforzadores (Tan et al., 2012; Van Zessen, Phillips, Budygin, & Stuber, 2012).

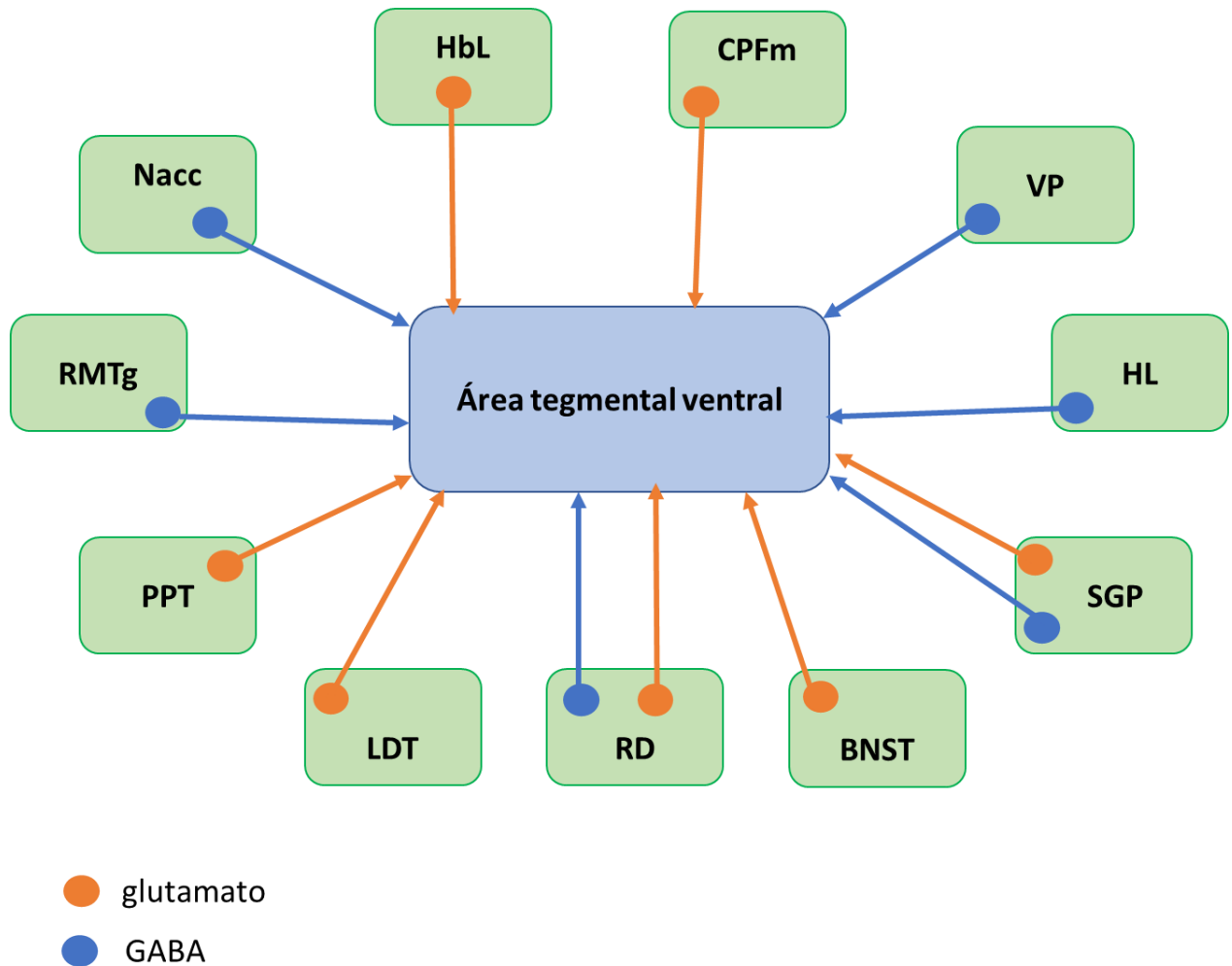


Figura 1.4: Regulación del área tegmental ventral (VTA). Ilustra las estructuras que proyectan al VTA y regulan al sistema de motivación y recompensa. PPT: núcleo pedúnculo pontino tegmental, LDT: núcleo laterodorsal tegmental, HbL: habénula lateral, corteza prefrontal medial: CPFm, BNST: núcleo cama de la estría terminales, SGP: sustancia gris periacueductal, RD: raphé dorsal, NAcc: núcleo accumbens, HL: hipotálamo lateral (HL), VP: pálido ventral y RMTg: núcleo rostromedial tegmental.

Como ya se mencionó, otro componente importante del sistema de motivación y recompensa es el NAcc, el cual se puede subdividir en una parte central o core rodeada por una corteza o shell. La comisura anterior está rodeada por el NAcc core; mientras que este está rodeado a su vez por el NAcc shell (Neto, Oliveira, Correia, & Ferreira, 2008). Las diferencias entre el core y el shell del NAcc se han definido por criterios histoquímicos, electrofisiológicos, celulares y conectivos (Heimer, Zahm, Churchill, Kalivas, & Wohltmann, 1991).

El principal tipo neuronal del NAcc son las neuronas espinosas medianas (MSN, por sus siglas en inglés) que conforman entre el 90-95% del total de las neuronas del NAcc. Las MSN son neuronas GABAérgicas, y se pueden dividir en dos subpoblaciones basados en el tipo de receptor dopaminérgico que expresan (D1 o D2) y del perfil de expresión de neuropéptidos (Gerfen & Surmeier, 2011). El otro 5 – 10% de neuronas del NAcc son interneuronas colinérgicas o interneuronas GABAérgicas (Kawaguchi, Wilson, Augood, & Emson, 1995).

Las MSN que expresan el receptor D1 (D1-MSN) coexpresan dinorfina, sustancia P y el receptor muscarínico M4; mientras que las que expresan el D2 (D2-MSN) coexpresan encefalina, neurotensina y el receptor a adenosina (A2a) (Le Moine & Bloch, 1995). Dado que la cascada de señalización de los receptores D1 y D2 es completamente diferente, la activación de estos receptores por la dopamina produce diferentes respuestas. Ambos tipos neuronales contribuyen de manera diferencial en las conductas hedónicas. El grupo de Eric Nestler estudiando la respuesta a diferentes sustancias de abuso, describieron diferentes patrones de inducción de Δ FosB, por ejemplo, la cocaína, alcohol y el Δ^9 -tetrahidrocannabinol

(THC) inducen la expresión de Δ FosB únicamente en las D1-MSN, mientras que heroína y morfina induce Δ FosB en ambas subpoblaciones (Lobo et al., 2013). Otras investigaciones han mostrado que la sobreexpresión de Δ FosB en las D1 incrementa la sensibilización a la cocaína y aumento del CPP; mientras que la sobreexpresión de Δ FosB en las D2-MSN no produce consecuencias conductuales (Grueter, Robison, Neve, Nestler, & Malenka, 2013). De igual forma, la activación optogenética de las D1-MSN o D2-MSN produce efectos opuestos en el reforzamiento a cocaína, la activación de las D1-MSN facilita la preferencia y la búsqueda de la sustancia de abuso, mientras que la activación de las D2-MSN reduce la preferencia y la búsqueda de la sustancia de abuso (Lobo et al., 2010). Por lo tanto, la activación de las D1-MSN está regulando positivamente el reforzamiento, mientras que las D2-MSN lo regulan de manera negativa. Un estudio más reciente ha mostrado que la activación optogenética de las terminales D1-MSN del NAcc lateral en el VTA produce CPP. Las D1-MSN están proyectando a interneuronas GABAérgicas, por lo tanto, su activación estaría inhibiendo la inhibición tónica de las interneuronas GABAérgicas y por lo tanto facilitando la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Yang et al., 2018).

El NAcc no sólo recibe proyecciones dopaminérgicas de la vía mesolímbica del VTA. También recibe proyecciones dopaminérgicas de la sustancia nigra (Deutch & Cameron, 1992; Phillipson & Griffiths, 1985). Mientras las proyecciones dopaminérgicas del VTA inervan principalmente la región shell del NAcc; el NAcc core recibe proyecciones principalmente de la sustancia nigra (Deutch & Cameron, 1992).

El NAcc también recibe proyecciones glutamatérgicas que regulan el reforzamiento, por ejemplo, de la amígdala basolateral (BLA, por sus siglas en inglés), hipocampo, tálamo, LDT y de la CPF (Coimbra et al., 2019; da Silva Lopes, Arnolds, & Neijt, 1984; Kelley & Domesick, 1982; McDonald, 1991; Montaron, Deniau, Menetrey, Glowinski, & Thierry, 1996; Turner, Rook, Lindsley, Conn, & Grueter, 2018). También recibe proyecciones orexinérgicas del HL (Stratford & Kelley, 1999); y colinérgicas y GABAérgicas del LDT (Coimbra et al., 2019). Las proyecciones dopaminérgicas del VTA inervan principalmente la región shell del NAcc, mientras el NAcc core recibe proyecciones principalmente de la sustancia nigra (Deutch & Cameron, 1992). A través de la manipulación optogenética se ha mostrado que la activación de las terminales glutamatérgicas de la CPF medial en el NAcc shell produce reforzamiento (Britt et al., 2012). También se ha mostrado que la activación de las terminales colinérgicas y glutamatérgicas que viene del LDT promueven el reforzamiento, mientras que la activación de las terminales GABAérgicas reduce el reforzamiento (Coimbra et al., 2019). Por otro lado, diversos estudios han mostrado la función de las proyecciones glutamatérgicas de la CPF medial en la conducta de búsqueda de sustancias de abuso en la recaída (Bossert et al., 2011, 2012). Por otro lado, la inhibición optogenética de las terminales glutamatérgicas de la CPF en el NAcc también está asociada a la búsqueda de reforzadores (Christoffel et al., 2021).

1.4 Corteza prefrontal, el reforzamiento y adicción.

La corteza prefrontal es el área de la corteza cerebral implicada en las funciones ejecutivas como la planeación, la toma de decisiones, el autocontrol, la atención y la memoria de trabajo (Dalley, Cardinal, & Robbins, 2004; Euston, Gruber, & McNaughton, 2012). Está conformada principalmente por neuronas piramidales (80-90%) y en diferentes subtipos de interneuronas (10-20%), las cuales regulan la actividad de las neuronas piramidales (Kvitsiani et al., 2013). En humanos se puede subdividir en la CPF ventromedial, dorsolateral y orbitofrontal; mientras que en roedores se puede dividir en prelímbica (PLCx, por sus siglas en inglés) e infralímbica (ILC, por sus siglas en inglés) (Heidbreder & Groenewegen, 2003).

Como se mencionó previamente, la CPF envía proyecciones al VTA y al NAcc, y de esta forma regula el funcionamiento del sistema de motivación y recompensa. Diversos estudios han mostrado que la CPF juega un papel importante en el desarrollo y la persistencia de la conducta adictiva. Se ha mostrado que la CPF media los efectos reforzantes de los estímulos, incluidos los de las sustancias de abuso (Tzschentke, 2000); por ejemplo, en ratas se ha mostrado que se pueden autoestimular con corriente eléctrica la CPF medial (Phillips & Fibiger, 1978; Routtenberg & Sloan, 1972), o se pueden autoadministrar sustancias de abuso directamente en la CPF medial, incluido el alcohol (Engleman et al., 2020; Goeders & Smith, 1983). Se ha mostrado que la DA en la CPF medial juega un papel importante en los efectos reforzantes de las sustancias de abuso; por ejemplo, la administración de un antagonista del receptor D2 en la CPF medial reduce la

conducta de autoadministración y/o el consumo de reforzadores (Engleman et al., 2020; Goeders & Smith, 1983).

También se ha mostrado que la CPF está asociada con la búsqueda compulsiva de las sustancias de abuso, la expresión de memorias asociadas a las sustancias de abuso, a la búsqueda del reforzador durante la recaída (Peters, Pattij, & De Vries, 2013; Van den Oever, Spijker, Smit, & De Vries, 2010). Por ejemplo, la inhibición farmacológica u optogenética de la CPF medial reduce la reinstalación de la conducta de búsqueda por reforzadores (Calu et al., 2013; Stefanik et al., 2013). Por otro lado, la reinstalación de la conducta de búsqueda de reforzadores está asociada a un incremento de c-Fos en la ILC (Hamlin, Clemens, & McNally, 2008).

Estudios de imagen en humanos han mostrado que pacientes que sufren de una adicción tienen mayor actividad metabólica o flujo sanguíneo en la CPF dorsolateral cuando se les expone a estímulos asociados al consumo de sustancias de abuso (Goldstein & Volkow, 2002; Grant et al., 1996; Langleben et al., 2008); en contraste, se ha observado una reducción de la actividad de la CPF ventromedial (Bonson, 2002). Además, la hipoactividad de la CPF se ha asociado a una búsqueda compulsiva de reforzadores, incluyendo sustancias de abuso (Chen et al., 2013) y a un mayor consumo de sustancias de abuso. Específicamente, se ha mostrado que la CPF medial tiene un papel importante en la transición del consumo bajo al consumo excesivo, por ejemplo, del alcohol (George et al., 2012).

2. Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SeCB) es un sistema de neuromodulación, que consiste en receptores, ligandos endógenos, enzimas de síntesis y degradación y un potencial transportador transmembranal. Su nombre deriva de la marihuana o *Cannabis sativa*.

2.1 Receptores cannabinoides

La primera hipótesis que se planteó para explicar de qué manera los cannabinoides (CBs) producían sus efectos farmacológicos se basó en su naturaleza química. Hillard y colaboradores propusieron que los endocannabinoides (eCBs) se disolvían en la membrana celular por ser compuestos lipofílicos alterando así su función de manera inespecífica (Hillard, Harris, & Bloom, 1985). Gracias al desarrollo de CBs sintéticos, por ejemplo, el CP-55,940, se mostró que existían receptores específicos para estas moléculas (Devane, Dysarz, Johnson, Melvin, & Howlett, 1988). En 1990 se clonó el primer receptor cannabinoide, el receptor cannabinoide 1 o CB1 (Matsuda, Lolait, Brownstein, Young, & Bonner, 1990) y tres años más tarde, el grupo de Munro clonó el receptor cannabinoide 2 o CB2 (Munro, Thomas, & Abu-Shaar, 1993). Inicialmente se propuso que el receptor CB1 se expresaba únicamente en el cerebro, mientras que el receptor CB2 se expresaba en la periferia, principalmente en corazón, pulmones, testículos, ovarios, próstata y en células del sistema inmune (Galiègue et al., 1995; Munro et al., 1993). Sin embargo, nuevos estudios han descrito la presencia de ambos receptores en SNC como en tejidos periféricos (Gong et al., 2006).

Los receptores CB1 y CB2 pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales, con un dominio C-terminal que puede asociarse con proteínas G (Howlett et al., 2002; R G Pertwee et al., 2010). En humanos, los receptores CB1 y CB2 comparten aproximadamente un 44% de homología en su secuencia de aminoácidos, porcentaje que aumenta hasta el 68% cuando se comparan únicamente los segmentos transmembranales (Pertwee et al., 2010).

El receptor CB1 es el receptor metabotrópico más abundante en el cerebro de mamíferos y se expresa en áreas del SNC (Figura 2.1) que contribuyen al control del movimiento (caudado-putamen, globo pálido, núcleo entopeduncular, sustancia negra y cerebelo), cognición y memoria (formación hipocampal, corteza cingulada, corteza prefrontal (CPF)), procesamiento de emociones y respuestas motivacionales (complejo amigdalino, núcleo accumbens, corteza olfatoria), percepción del dolor (sustancia gris periacueductal), e integración neuroendocrina (núcleos del hipotálamo como el paraventricular, arcuato, supraóptico y ventromedial) (Herkenham et al., 1991). Se localiza en su mayoría en terminales GABAérgicas (%56%), terminales glutamatérgicas (~12%); confiriéndole al receptor CB1 un papel muy importante como modulador de la neurotransmisión (Domenici et al., 2006; Katona et al., 1999; Marsicano & Lutz, 1999). De igual forma, se ha mostrado su expresión en astrocitos (~6%) y mitocondrias (~15%) (Bénard et al., 2012). En contraste, el CB2 se expresa en los cuerpos neuronales y en la microglía (Maresz, Carrier, Ponomarev, Hillard, & Dittel, 2005) y se ha descrito su presencia en receptor en la corteza cerebral, hipocampo, tálamo, bulbo olfatorio, cerebelo y en el tallo cerebral (Gong et al., 2006).

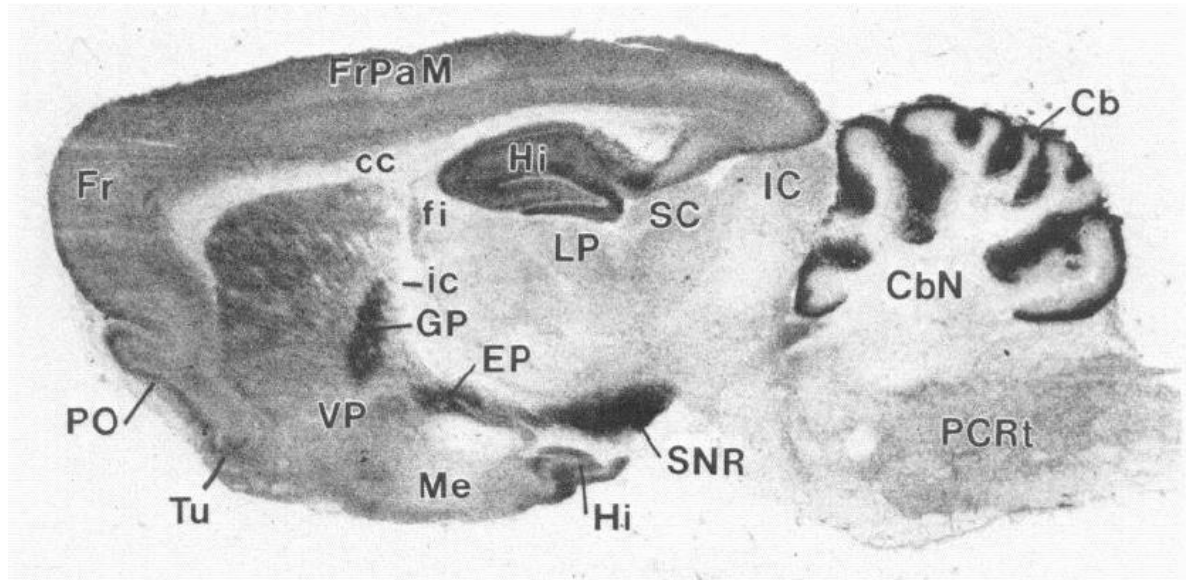


Figura 2.1: Distribución y expresión del receptor CB1 en el cerebro de rata. Estudio de fijación del receptor CB1 con el radioligando [3H]CP-55,940 en un corte sagital de cerebro de rata. Cb: cerebelo, CbN: núcleo cerebelar profundo, cc: cuerpo caloso, EP: núcleo entopeduncular, fi: fimbria del hipocampo, Fr: corteza frontal, FrPaM: corteza frontoparietal-área motora, GP: globo pálido; Hi: hipocampo, Hy: hipotálamo, IC: colículo inferior, LP: núcleo talámico lateral posterior, Me: núcleo amigdalóide medial, PCRt: núcleo reiclar parvocelular, PO: corteza olfatoria primaria, SC: colículo superior, SNR: sustancia negra pars reticulata, Tu: tubérculo olfatorio, VP: núcleo talámico ventroposterior. Las zonas más oscuras indican mayor presencia del receptor CB1 (Tomado de Herkenham y cols., 1991).

Los receptores cannabinoides (CB1 y CB2) pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales y están acoplados principalmente a una proteína G del tipo inhibidor ($G_{i/o}$), aunque en algunas ocasiones se ha visto que se acoplan a una proteína del tipo G_s (Pertwee, 1997). Estos receptores al ser activados, la subunidad α de la proteína $G_{i/o}$ inhibe a la adenilato ciclasa (AC), por lo tanto, disminuye la concentración de AMPc al interior de la célula. De esta manera afecta la fosforilación de proteína cinasas dependientes de AMPc, por ejemplo, la proteína cinasa A (PKA) involucradas en procesos metabólicos y de expresión génica (Howlett & Fleming, 1984; Pertwee, 1997) (Figura 2.2). Por otro lado, también se ha descrito que el receptor CB1 a través de las subunidades $\beta\gamma$ promueve la

apertura de canales rectificadores de potasio y en el cierre de canales de calcio dependientes de voltaje (Mackie, Lai, Westenbroek, & Mitchell, 1995). La modulación de los canales iónicos es exclusiva de la activación del receptor CB1, esta característica no la comparte con el receptor CB2 (Figura 2.2). A través de la inhibición de la AC y de la modulación de los canales iónicos, los receptores CB1 y CB2 reducen la liberación de neurotransmisores de las terminales sinápticas y de esta forma regulan diversos sistemas de neurotransmisión (Pertwee, 1997).

2.2 Endocannabinoides

Los endocannabinoides son compuestos de naturaleza lipídica derivados de la degradación de fosfolípidos de la membrana celular (Piomelli, 2003). A la fecha se han identificados seis endocannabinoides (Figura 2.3) y otras moléculas con actividad cannabimética, derivados de amidas, éteres o ésteres de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente del ácido araquidónico. El primer ligando endógeno descubierto se aisló de un extracto de cerebro del cerdo y se nombró anandamida basado en el término sánscrito “ananda” que significa felicidad y amida por la naturaleza del compuesto (Devane et al., 1992). La anandamida o araquidoniletanolamida (AEA), es una amida formada a partir del ácido araquidónico y la etanolamina, y es agonista de los receptores CB1 y CB2.

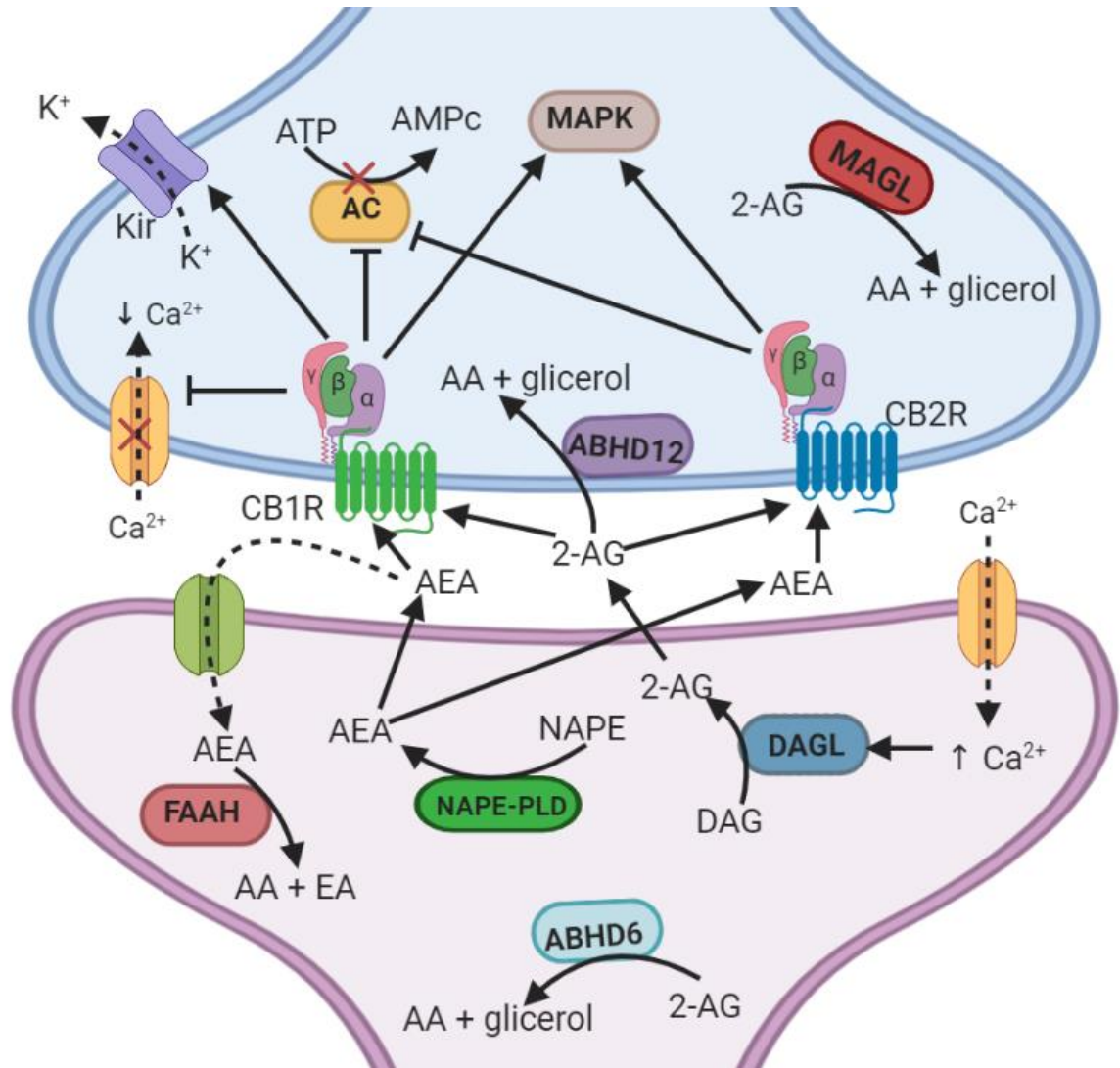


Figura 2.2: Vías de síntesis y degradación de endocannabinoides y mecanismo de transducción de señales de los receptores CB1 y CB2. Creado con BioRender.com.

El 2-araquidonil glicerol (2-AG) fue descrito de manera independiente por dos grupos de trabajo en 1995: el grupo del Dr. Takayuki Sugiura lo identificó en el cerebro de rata (Sugiura et al., 1995), mientras que el grupo del Dr. Rafael Mechoulam lo aisló del intestino delgado de perro (Mechoulam et al., 1995). El 2-AG es el eCB más abundante en el cerebro, y su concentración es aproximadamente 200 veces superior a la de la AEA (Stella, Schweitzer, & Plomelli,

1997); y activa a los receptores CB1 y CB2 (Mechoulam et al., 1995). En 1995 se aisló la oleamida del líquido cefalorraquídeo de gatos privados de sueño por el grupo de Richard Lerner (Cravatt et al., 1995), y es un agonista de los receptores CB1.

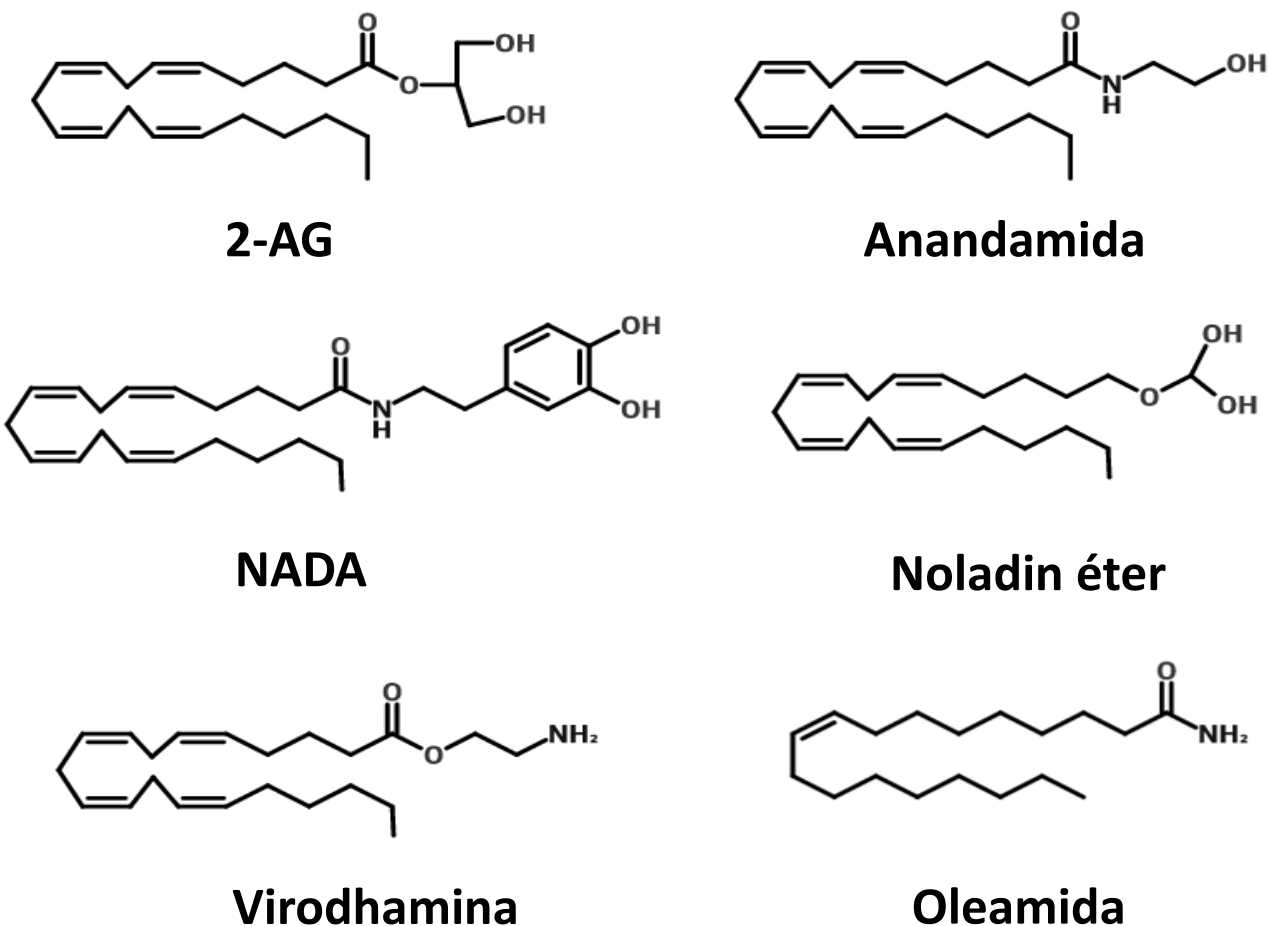


Figura 2.3: Estructura química de los principales endocannabinoides.

En el 2001 un cuarto eCB fue descrito por el grupo del Dr. Raphael Mechoulam, el 2-araquidonil-gliceril-eter o noladin-eter (NE), el cual fue aislado del cerebro de cerdo (Hanus et al., 2001) y después del cerebro de rata (Fezza et al., 2002). Un año después, se mostró la existencia de una molécula análoga a la AEA

en el cerebro de rata, pero con orientación opuesta de la fracción polar de la etanolamina, y lo llamaron virodhamina, del sánscrito “*virodha*” que significa opuesto. La virodhamina es un antagonista del receptor CB1 (Porter et al., 2002). Este mismo año, el grupo del Dr. Vincenzo Di Marzo describió la existencia de otro eCB en el cerebro de rata, la N-Araquidonil-Dopamina (NADA), que es un agonista de los receptores CB1 y de receptores vaniloides (Huang et al., 2002).

Estos eCBs son sintetizados por el organismo, y para ello utiliza toda una maquinaria enzimática. La AEA es biosintetizada por diferentes vías enzimáticas las cuales se ilustran en la figura 2.4; la principal es a través de una vía dependiente de fosfolípidos que consiste en dos reacciones enzimáticas: la primera es la formación del N-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE, por sus siglas en inglés) por la transferencia del ácido araquidónico de un glicerofosfolípido, por ejemplo, la fosfatidilcolina, a la amina de la fosfatidiletanolamina, proceso catalizado por la *N*-aciltransferasa (NAT). Posteriormente, la AEA es liberada del NAPE por una hidrólisis enzimática catalizada por NAPE-PLD (Di Marzo, Bifulco, & De Petrocellis, 2004). El 2-AG se sintetiza (figura 2.5) a partir de la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana celular, por ejemplo, el PIP₂, el cual es transformado a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃, por sus siglas en inglés) por acción de una fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés). Después el DAG es transformado a 2-AG por la diacilglicerol lipasa (Bisogno et al., 2003).

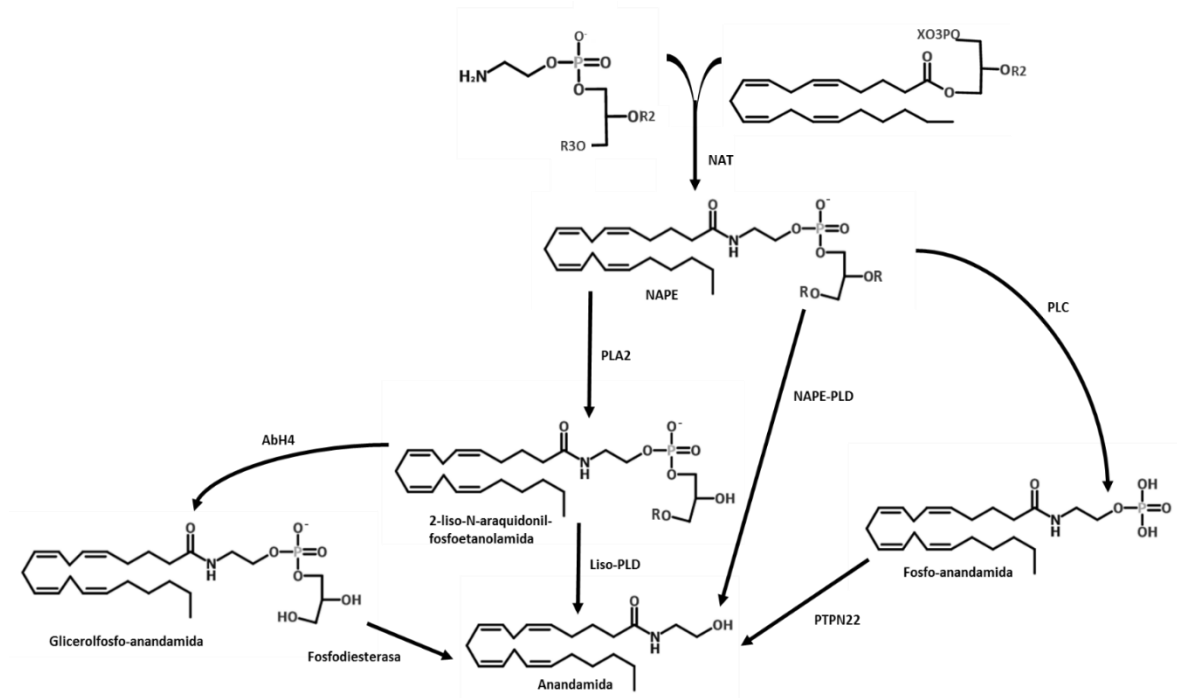


Figura 2.4: Biosíntesis de anandamida. Esquematiza las principales vías de síntesis de la anandamida. NAT: trans-N-aciltransferasa, NAPE-PLD: fosfolipasa D selectiva de *N*-acil-fosfatidiletanolamina, PLC: fosfolipasa C, NAPE: *N*-acil-fosfatidiletanolamina, AbH4: α/β -hidrolasa 4, PTPN22: proteína tirosin fosfatasa N22, PLA₂: fosfolipasa A₂, PLD: fosfolipasa D.

La actividad de los eCBs es finalizada mediante 2 procesos: por recaptura o por degradación enzimática. La AEA y la oleamida son hidrolizadas principalmente por la FAAH (Ueda, 2002), aunque también pueden ser degradadas por la amidasa ácida selectiva a las *N*-aciletanolaminas (NAAA, por sus siglas en inglés) (Ueda, Yamanaka, Terasawa, & Yamamoto, 1999). Mientras, el 2-AG es hidrolizado principalmente por la MGL (Blankman, Simon, & Cravatt, 2007). También se ha propuesto la existencia de un transportador de membrana que recaptura principalmente la AEA (Andrea Giuffrida, Beltramo, & Piomelli, 2001); sin embargo, a la fecha no ha podido ser clonado o aislado, se conoce de su existencia gracias a

fármacos como el AM404 o el AM1147 que aumentan las concentraciones de AEA (Beltramo et al., 1997).

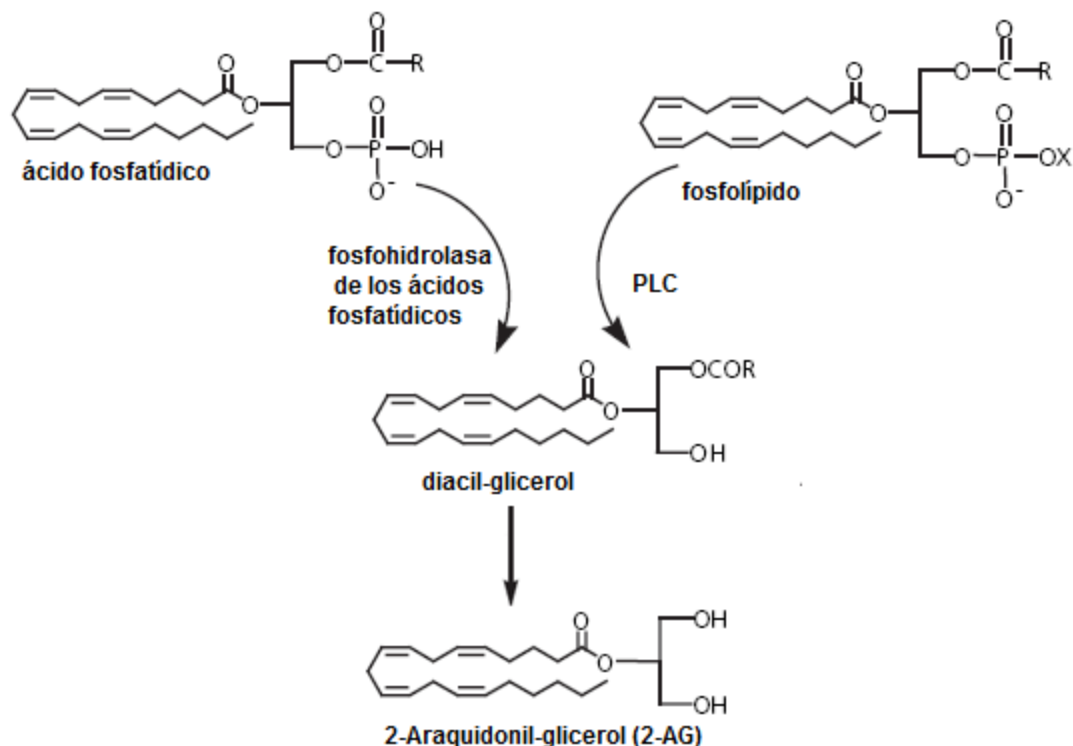


Figura 2.5: Biosíntesis del 2-araquidonil glicerol (2-AG). PLC: fosfolipasa C.

2.3 Funciones fisiológicas del sistema endocannabinoide

Desde su descubrimiento, el SeCB ha sido implicado en la regulación de una serie de procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo neural (Fride, 2008), la coordinación y el control del movimiento (Giuffrida & Piomelli, 2000), el estado emocional (Moreira & Lutz, 2008), el ciclo sueño-vigilia (Prospéro-García, Amancio-Belmont, Becerril Meléndez, Ruiz-Contreras, & Méndez-Díaz, 2016), la nocicepción (Paulsen & Burrell, 2019), la temperatura corporal (Smirnov & Kiyatkin, 2008), el apetito (Kirkham, 2009), el metabolismo y la homeostasis energética (Marzo &

Matias, 2005), los mecanismos de recompensa (Méndez-Díaz, Amancio-Belmont, Estrada-González, Ruiz-Contreras, & Prospéro-García, 2019; Solinas et al., 2007), el sistema inmune (Pandey et al., 2009), la respuesta al estrés (Lutz, Marsicano, Maldonado, & Hillard, 2015), y las funciones cognitivas superiores, sobre todo aquellas relacionadas con el aprendizaje y la memoria (Murillo-Rodríguez et al., 2001).

2.3.1 Participación del sistema endocannabinoide en el consumo de alcohol y el sistema de motivación recompensa

Diversos estudios preclínicos y clínicos han mostrado la participación del SeCB en la regulación del sistema de recompensa, la conducta motivada y en el consumo de alcohol. Diversos estudios han mostrado la participación del receptor CB1 sobre la liberación de dopamina en el NAcc; por ejemplo, la administración sistémica de un antagonista al receptor CB1 reduce la liberación de dopamina (DA) en el NAcc (Cheer et al., 2007); en cambio, la administración de un agonista CB1 aumenta la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan al NAcc, incrementando la liberación de DA en este núcleo (Cheer, Wassum, Heien, Phillips, & Wightman, 2004). Empleando la tarea de condicionamiento de preferencia de lugar (CPP, por sus siglas en inglés), la administración de agonistas CB1 en el NAcc promueve el CPP, efecto que se ve revertido por la administración de un antagonista al receptor CB1 (Méndez-Díaz et al., 2019). De igual forma, la autoadministración de un agonista al receptor CB1 en el NAcc promueve la

búsqueda del reforzador. Estas evidencias muestran que la activación del receptor CB1 en el NAcc facilita la respuesta hedónica (Hauser et al., 2020).

Por otro lado, la administración de antagonistas al CB1 previene la liberación de DA en el NAcc facilitada por el alcohol (Femenía, García-Gutiérrez, & Manzanares, 2010; Hungund, Szakall, Adam, Basavarajappa, & Vadasz, 2003); mientras que en ratones *KO* para el CB1 no hay liberación de DA en el NAcc facilitada por el alcohol (Hungund et al., 2003). Además, los ratones *KO* para el CB1 exhiben un aumento en la expresión del receptor D2 en el NAcc, sugiriendo una estrecha regulación entre los sistemas dopaminérgico y eCB (Houchi et al., 2005).

Adicionalmente, utilizando el modelo de autoadministración de alcohol, se ha mostrado la participación del receptor CB1 en la motivación para consumir alcohol; por ejemplo, la administración sistémica o intra-NAcc de antagonistas o agonistas inversos al receptor CB1 reducen la autoadministración de alcohol (Caille, Alvarez-Jaimes, Polis, Stouffer, & Parsons, 2007; Economidou et al., 2006), incluso en cepas con alta preferencia por el alcohol como la cepa Alko Alcohol (Malinen & Hyytiä, 2008). Por el contrario, la administración de agonistas al receptor CB1 facilitan la autoadministración de alcohol (Malinen & Hyytiä, 2008). De igual forma, en modelos de consumo voluntario de alcohol se ha mostrado que la administración de agonistas al receptor CB1 incrementa el consumo de alcohol (Colombo et al., 2002; Linsenhardt & Boehm, 2009), mientras que la administración de antagonistas o agonistas inversos reducen el consumo de alcohol (Colombo et al., 1998; Lallemand & De Witte, 2006). Además, ratones *KO* al receptor CB1 consumen menor cantidad de alcohol que los ratones del tipo *WT* (Thanos, Dimitrakakis, Rice, Gifford, &

Volkow, 2005; Vinod et al., 2008). Adicionalmente, empleando el CPP se ha mostrado que los ratones *KO* al receptor CB1 exhiben menor condicionamiento de preferencia de lugar que los ratones del tipo *WT* (Houchi et al., 2005; Thanos, Dimitrakakis, et al., 2005). Estas evidencias sugieren que la activación del receptor CB1, principalmente en el NAcc, facilita la búsqueda y el consumo de alcohol.

De igual forma, se ha mostrado la participación del receptor CB2 en la regulación del sistema de motivación-recompensa y en el consumo de alcohol. La administración de un agonista al receptor CB2 reduce el consumo de alcohol y reduce el CPP por alcohol (Al Mansouri et al., 2014). Además, los ratones *KO* para el receptor CB2 tienen mayor consumo y motivación por consumir el alcohol (Ortega-Álvaro et al., 2015). Por otro lado, se ha observado que manipulaciones genéticas y farmacológicas del receptor CB2 modifican elementos clave del sistema de recompensa como la expresión de receptores dopaminérgicos o los niveles de DA en el NAcc; por ejemplo, el antagonismo del receptor CB2 incrementa los niveles de DA en el NAcc, mientras que la administración de agonistas al receptor CB2 reduce la liberación de DA en el NAcc (Xi et al., 2011). Los ratones *KO* para CB2 exhiben una menor expresión de la TH y del receptor MOR en el VTA y NAcc respectivamente (Navarrete et al., 2013; Ortega-Álvaro et al., 2015), mientras que los ratones que sobreexpresan el receptor CB2 presentan mayor expresión de la TH y el DAT en el VTA y menor expresión del receptor MOR en el NAcc (Aracil-Fernández y cols., 2012).

Por otro lado, diversos estudios han mostrado que el alcohol modifica al SeCB, por ejemplo, el tratamiento agudo de alcohol aumenta la liberación de AEA

en el NAcc (Ceccarini, Casteels, Koole, Bormans, & Van Laere, 2013). En cambio, el tratamiento crónico de alcohol incrementa la concentración de AEA y 2-AG en el estriado mientras reduce la actividad y la expresión de la FAAH (Vinod et al., 2012). De igual forma, la autoadministración de alcohol aumenta la liberación de 2-AG en el NAcc (Caille et al., 2007) y los niveles de AEA en la corteza cerebral (Vinod, Yalamanchili, Xie, Cooper, & Hungund, 2006). Utilizando la tomografía de emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) se mostró que un tratamiento agudo de alcohol aumenta la disponibilidad del receptor CB1 en el NAcc; en cambio, el tratamiento crónico de alcohol reduce la disponibilidad del receptor CB1 en el NAcc y el hipocampo (Ceccarini et al., 2013). Mientras que estudios en humanos han mostrado que el consumo agudo de alcohol aumenta la disponibilidad del receptor CB1 en el NAcc, CxF, núcleo caudado (Ceccarini et al., 2014). Mientras que individuos que han desarrollado trastorno por consumo de alcohol tienen menor expresión del receptor CB1 en diversas áreas del cerebro, incluido el NAcc, CPF, ínsula, hipocampo y cerebelo (Hirvonen et al., 2013), evidenciando la estrecha relación entre el SeCB y el consumo de alcohol.

3. Estrés temprano y su relación con las adicciones

El cerebro es un órgano vital el cual es susceptible a alteraciones ambientales. Diversos estudios han mostrado que las experiencias adversas o estresantes, principalmente en etapas importantes del desarrollo pueden afectar de manera negativa el desarrollo normal del cerebro produciendo cambios neuroquímicos y fisiológicos (Teicher et al., 2003; Teicher, Samson, Anderson, & Ohashi, 2016), que a su vez vulneran al sujeto a desarrollar trastornos psiquiátricos (Anda et al., 2006; Benjet, Borges, & Medina-Mora, 2010; Norman et al., 2012). Por ejemplo, en México la Encuesta Nacional de Comorbilidad mostró en un estudio realizado con 5,826 individuos que las adversidades crónicas sufridas en la niñez como la negligencia y el abuso físico y sexual, así como la disfunción familiar, aumentan el riesgo de sufrir un trastorno del estado de ánimo, de ansiedad, de consumo de sustancias y trastornos de externalización (trastorno por déficit de atención con hiperactividad, trastorno de oposición desafiante, y trastornos de la conducta) en la edad adulta (Benjet et al., 2010). De igual forma, en 2006 el grupo de Anda identificó ocho tipos de Experiencias Adversas durante la Niñez (EAN) que incluyen el abuso, la violencia doméstica, el abuso de sustancias dentro de los hogares, la pérdida de los padres (por el encarcelamiento, el divorcio, y otros); los investigadores calcularon una puntuación de EAN como una medida acumulada para determinar el grado de adversidad sufrido por los sujetos durante los primeros 18 años de vida. El 64% de los encuestados tenía al menos un EAN. El riesgo para la depresión, la ansiedad, los ataques de pánico, los intentos de suicidio, los trastornos del sueño, la obesidad el abuso de sustancias, incluido el alcohol y el

tabaquismo aumenta a mayor número de experiencias adversas (Anda et al., 2006). De igual forma, los resultados de la Encuesta Nacional de Comorbilidad de los Estados Unidos (n= 9,282) muestra un incremento en el riesgo para los trastornos del estado de ánimo, de ansiedad y de consumo de sustancias en función del número de EAN (Green et al., 2010). En un reciente meta-análisis de 37 estudios (n = 3,162,318; 17 casos y controles, y 20 de cohortes) se buscó establecer los efectos del abuso sexual asociados al riesgo para desarrollar trastornos psiquiátricos. Se determinó una asociación significativa entre el abuso sexual en hombres y mujeres con el diagnóstico para el trastorno de ansiedad, depresión, trastornos del sueño, intentos de suicidio, entre otros (Chen et al., 2010). Otro reciente meta-análisis de 124 estudios (66 estudios transversales, 52 de cohortes y 6 de casos y controles) se observó una asociación significativa entre el abuso físico, emocional y la negligencia con el trastorno de depresión; con los trastornos por consumo de sustancias; intentos suicidas, entre otros trastornos psiquiátricos (Norman et al., 2012) Estas evidencias apuntan a la importancia del cuidado parental y a la protección de los infantes a situaciones de estrés crónico temprano.

3.1 Privación de cuidado materno, como modelo animal para el estudio del estrés temprano

Las experiencias adversas o el estrés temprano se han modelado en animales de experimentación principalmente utilizando el modelo de privación de cuidado materno (PCM) también conocido como separación materna. En todos los mamíferos, en la etapa temprana postnatal, las estrechas relaciones madre-crías son de suma importancia (Nephew & Murgatroyd, 2013). El apego madre-cría va

más allá de satisfacer las necesidades nutricionales, son necesarias otras interacciones madre-cría, por ejemplo, la regulación de la temperatura, el aseo y acicalamiento, las lamidas anogenitales para estimular la defecación y micción (Gutman & Nemeroff, 2002). La exposición a estresores extremos y prolongados, como la separación materna, interrumpen con las interacciones madre-cría esenciales para el desarrollo neuronal y conductual normal (Cryan & Holmes, 2005; Li, Xue, Shao, Shao, & Wang, 2013; Pryce & Feldon, 2003). Por esto, la privación de cuidado materno se ha utilizado para modelar las experiencias adversas o estrés temprano (cuidado negligente y abuso). Utilizando este modelo se han evaluado los cambios conductuales, neuroquímicos, neuroanatómicos y endócrinos a consecuencia del estrés temprano en ratas adultas y adolescentes. Este modelo surge del trabajo del grupo de Meaney, donde se observó la existencia de madres altas y bajas cuidadoras. Madres altas cuidadoras expresan más las conductas de aseo, acicalamiento a sus crías y la postura de arqueamiento de la espalda que las bajas cuidadoras (Liu et al., 1997), y las crías de estas últimas muestran diferencias conductuales y neuroquímicas con aquellas que fueron cuidadas por madres altas cuidadoras. A la fecha se han descrito cambios en diferentes sistemas neuroquímicos asociados al cuidado negligente y a la privación de cuidado materno. En este trabajo detallaremos únicamente los cambios en el sistema dopaminérgico y endocannabinoide.

3.2 Cambios neuroquímicos asociados al cuidado negligente

3.2.1 Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)

Diversos estudios han mostrado cambios en el eje HHA asociados al cuidado materno negligente, por ejemplo, crías de madres bajas cuidadoras presentan una hiperrespuesta del eje HHA (mayor concentración plasmática de corticotropina (ACTH) y corticosterona) ante un estresor en comparación de las crías de madres altas cuidadoras (Liu et al., 1997). De igual forma, ratas expuestas a la privación de cuidado materno tienen mayores concentraciones basales de ACTH, y tienen una hiperrespuesta del eje HHA ante estresores en comparación con ratas no expuestas a la privación de cuidado materno; y en respuesta hay un aumento más pronunciado en la concentración de ACTH en plasma (Ladd, Owens, & Nemeroff, 1996; Plotsky & Meaney, 1993).

Adicionalmente, las crías de madres bajas cuidadoras tienen mayor expresión del ARNm del factor liberador de corticotropina (CRF, por sus siglas en inglés) en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo y se ha observado que la expresión de este ARNm depende inversamente proporcional de la cantidad de aseo y acicalamiento que recibieron las crías en los primeros 10 días postnatales. Además, las crías de madres bajas cuidadoras tienen una menor expresión del ARNm de los receptores a glucocorticoides (GR) en el hipocampo (Liu et al., 1997), sugiriendo una mayor expresión del GR y un incremento en la sensibilidad hipocampal a la respuesta glucocorticoide, por lo tanto, una disminución en la expresión del CRF hipotalámico. De igual forma, ratas privadas de cuidado materno presentan una mayor densidad de receptores CRF en el núcleo parabraquial (NPB), la eminencia media y el núcleo del Raphé; y menor densidad de receptores en la hipófisis anterior

(Ladd et al., 1996; Plotsky & Meaney, 1993); estos cambios son revertidos cuando las ratas sometidas a la privación de cuidado materno se colocaron con una madre “adoptiva” (Huot, Gonzalez, Ladd, Thirivikraman, & Plotsky, 2004), sugiriendo la importancia del cuidado en etapas tempranas del desarrollo.

Estudios posteriores mostraron que la privación de cuidado materno aumenta las concentraciones de CRF en el líquido cefalorraquídeo, así como un aumento de la expresión del ARNm del CRF y de las concentraciones del mismo en el NPV del hipotálamo (PVN), el núcleo central de la amígdala (CeA), el locus coeruleus (LC) y el BNST; y un aumento en la expresión del receptor CRF1 en el LC/NPB y en el PVN, y una disminución en la CxF (Plotsky et al., 2005).

3.2.2 Sistema dopaminérgico

Diversos estudios han mostrado cambios en el sistema dopaminérgico, causados por la privación de cuidado materno, por ejemplo, ratas que sufrieron privación de cuidado materno muestran un aumento en la concentración de dopamina (DA) en el estriado dorsal, pero no en el estriado ventral; así como una disminución en la proporción DOPAC/DA en la CPF medial (CPFm) (Matthews, Dalley, Matthews, Tsai, & Robbins, 2001). Adicionalmente, ratones privados de cuidado materno tienen una mayor expresión del ARNm de la tirosina hidroxilasa (TH) en el VTA (García-Gutiérrez et al., 2015). Por otro lado, ratas privadas de cuidado materno presentan una menor expresión del receptor D1 en el NAcc core, PV y globo pálido lateral (Ploj et al., 2003), además de una menor expresión de los receptores D2 y D3 en la CxF (Romano-López et al., 2016); mientras que en el NAcc se observó una mayor expresión del D2 y una menor expresión del D3 (Romano-

López et al., 2016). Por otro lado, utilizando un paradigma diferente de privación de cuidado materno (24 h de separación en el día postnatal (DPN) 9) se observó una disminución de DA en el estriado y un aumento en la relación DOPAC/DA en el estriado, CPF y amígdala en el grupo con privación de cuidado materno; de igual forma, las ratas privadas de cuidado materno tienen mayor expresión del receptor D2 en el estriado, y menor expresión en la CPF (Rentesi et al., 2013).

3.2.3 Sistema endocannabinoide

Estudios han mostrado que la privación de cuidado materno modifica al SeCB, por ejemplo, la privación por 3 horas diarias del DPN 2 al 15 disminuye la expresión del receptor CB1 en la CPF y en el hipocampo en la edad adulta (DPN 90) (Reyes Prieto et al., 2012). Utilizando un paradigma diferente (privación 6 horas diarias en dos bloques de 3 horas cada uno; DPN 2 al 15), los animales privados de cuidado materno tienen menor expresión del receptor CB1 en la CxF y mayor en el NAcc (Romano-López et al., 2012). De igual forma, se mostró que no existen cambios en la expresión del receptor CB2 en la CxF, hipocampo ni NAcc (Romano-López et al., 2012) ni cambios en la expresión de la NAPE-PLD, DAGL α , FAAH y MGL en la corteza frontal asociados a la privación de cuidado materno (Romano-López et al., 2016). En contraste, hay una reducción en la expresión de la FAAH y MGL, pero no de la NAPE-PLD y DAGL α en el NAcc (Romano-López et al., 2016). También se ha mostrado que la privación de cuidado materno reduce la expresión del receptor CB1 en la CPF y en la amígdala (Hill et al., 2019). Por otro lado, ratas privadas de cuidado materno por 24 h en el DPN 9 tienen menor expresión del

receptor CB1 en la CxP e hipocampo, y una mayor expresión del receptor CB2 (Marco et al., 2013).

También se ha mostrado cambios en los niveles de eCBs asociados a la privación de cuidado materno, por ejemplo, hay una menor concentración de 2-AG y AEA en ratas con privación de cuidado materno (Hill et al., 2019). También se ha mostrado que hay una reducción en los niveles de AEA en el estriado y de 2-AG en la CPF (Portero-Tresserra et al., 2018).

3.3 Cambios conductuales asociados al cuidado negligente

3.3.1 Conducta tipo ansiedad

Diversos grupos de investigación han mostrado a través de diferentes paradigmas que la privación de cuidado materno aumenta la conducta tipo ansiedad, por ejemplo los animales expuestos a privación de cuidado materno pasan menos tiempo en los brazos abiertos en el laberinto elevado en cruz (García-Gutiérrez et al., 2015), de igual forma, pasan un menor tiempo en el compartimento iluminado en la prueba de luz-oscuridad (light-dark box test) (García-Gutiérrez et al., 2015), y un menor tiempo en el centro del campo abierto (Lambás-Señas et al., 2009; Rentesi et al., 2010).

3.3.2 Conductas reforzadas y Adicción

Diversas investigaciones han mostrado que la privación de cuidado materno promueve el consumo de diferentes sustancias de abuso, por ejemplo, se ha mostrado que la privación de cuidado materno incrementa la autoadministración de

cocaína (Moffett et al., 2006) anfetamina, metanfetamina (Lewis et al., 2016; Lewis, Staudinger, Scheck, & Olive, 2013), morfina (Vazquez, 2005) y alcohol (García-Gutiérrez et al., 2015). Adicionalmente, las ratas privadas de cuidado materno adquieren más temprano la autoadministración por cocaína y escalan más rápido que los controles (Moffett et al., 2006). También presentan una hiperrespuesta locomotora a bajas dosis de cocaína (Brake, Zhang, Diorio, Meaney, & Gratton, 2004; Kikusui, Faccidomo, & Miczek, 2005) y anfetamina (Kehoe, Shoemaker, Triano, Hoffman, & Arons, 1996). Además, liberar una mayor cantidad de DA en el NAcc después de un reto con anfetamina (Kehoe et al., 1996), sugiriendo que existe una hiperrespuesta del sistema de recompensa. De igual forma, las ratas privadas de cuidado materno consumen una mayor cantidad de alcohol (Huot et al., 2001; Romano-López et al., 2012), morfina y anfetamina (Vazquez et al., 2006); además, presentan una mayor búsqueda de sustancias de abuso (Hensleigh & Pritchard, 2014) y una mayor motivación; (García-Gutiérrez et al., 2015), sobre todo después de ser expuestos a un estrés agudo (Peñasco, Mela, López-Moreno, Viveros, & Marco, 2015).

Por otro lado, crías de madres altas cuidadoras presentan menor autoadministración por cocaína (Francis & Kuhar, 2008; Moffett et al., 2006) y consumo de alcohol (Francis & Kuhar, 2008) que crías de madres bajas cuidadoras. Estas evidencias sugieren que la privación de cuidado materno incrementa la sensibilidad a las propiedades reforzantes de las sustancias de abuso, haciéndolas más placenteras, por lo tanto aumentando su búsqueda y aumentando la probabilidad de que el sujeto sea adicto a ella, y esto se puede deber a cambios en componentes del sistema dopaminérgico, eCB, opioide, entre otros que regulan el

reforzamiento (Gaetano Di Chiara & Bassareo, 2007; Gardner, 2011; Méndez-Díaz et al., 2010; Merrer, 2009; K. Ploj et al., 2003; Sagheddu, Muntoni, Pistis, & Melis, 2015).

3.4 Aislamiento social, como modelo animal para el estudio del estrés temprano

El aislamiento social también es un potente estresor en mamíferos, incluyendo al humano, principalmente durante la adolescencia. La adolescencia es un periodo de transición entre la niñez y la adultez, en donde el individuo busca una independencia de sus padres. Para alcanzar esta independencia, el individuo adquiere nuevas habilidades cognitivas, emocionales y sociales. Este periodo se caracteriza por el aumento en la cantidad y calidad de las interacciones sociales con los amigos y la familia, principalmente un aumento del tiempo dedicado a los amigos (Spear, 2000). Esta reestructuración de la organización social es necesaria para que se desarrollen estrategias de comportamiento que son esenciales para la supervivencia del individuo en la edad adulta (Gopnik et al., 2017). También es un periodo donde continúan los procesos de maduración del SNC, es un periodo crítico para los circuitos neuronales que controlan la homeostasis energética, el autocontrol, la toma de decisiones y las respuestas al estrés (Blakemore & Choudhury, 2006; Spear, 2000), donde las experiencias adversas y/o estresantes pueden provocar cambios neuroquímicos y conductuales a largo plazo, como veremos a continuación.

3.5 Cambios Neuroquímicos asociados al aislamiento social (AS)

3.5.1 Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA).

Muchas investigaciones han mostrado que el aislamiento social incrementa la actividad del eje HHA; por ejemplo, el aislamiento social agudo y crónico en monos aumenta los niveles basales de cortisol (Smith, Birnie, & French, 2011; Smith & French, 1997). En roedores se ha observado el mismo fenómeno, el aislamiento social crónico aumenta la concentración plasmática de corticosterona y ACTH (Djordjevic, Adzic, Djordjevic, & Radojcic, 2010; Dronjak, Gavrilović, Filipović, & Radojčić, 2004). Además, los animales aislados presentan una hiperrespuesta del eje HHA ante un estresor en comparación con los animales sociales; por ejemplo, tienen mayor concentración de corticosterona en plasma y en la CPF (Dronjak et al., 2004; Garrido et al., 2013). También se ha observado una mayor expresión del receptor a glucocorticoides en el hipocampo y en la CPF de ratas aisladas en comparación con el grupo socializado (Djordjevic et al., 2010; Dronjak et al., 2004).

3.5.2 Sistema dopaminérgico

Diversos estudios han mostrado que el aislamiento social modifica la liberación de DA dependiendo de la región, por ejemplo, la DA basal en la amígdala de ratas macho aisladas es menor en comparación con los sujetos socializados (Karkhanis, Alexander, Mccool, Weiner, & Jones, 2015), y esto está asociado a un mayor metabolismo de la DA en los animales aislados (Heidbreder et al., 2000). En contraste, sujetos aislados no presentan cambios en la cantidad basal de DA en la CPF ni en el NAcc (Fulford & Marsden, 1998; Hall et al., 1998; Jones, Hernandez,

Kendall, Marsden, & Robbins, 1992; Karkhanis, Locke, Mccool, Weiner, & Jones, 2014). A pesar de no existir diferencias en la cantidad de DA basal en NAcc entre sujetos aislados y controles, la administración de anfetamina, alcohol y cocaína facilita más la liberación de DA en el NAcc en los primeros, en comparación con los segundos (Hall et al., 1998; Karkhanis et al., 2014; Lapiz et al., 2003; Yorgason et al., 2016).

Adicionalmente, se han estudiado cambios en la expresión del transportador de DA (DAT). Por ejemplo, el aislamiento social incrementa la expresión del DAT en el estriado dorsal, en la amígdala y en el NAcc (Karkhanis et al., 2015; Yorgason et al., 2016), esto puede facilitar la recaptura de DA.

Por otro lado, también se ha estudiado los cambios en la expresión de los receptores dopaminérgicos. Algunos estudios han mostrado que el aislamiento social no modifica la expresión del receptor D2 en la CPF, NAcc, hipocampo o amígdala de ratas macho (Malone, Kearns, Chongue, Mackie, & Taylor, 2008; Yorgason, España, Konstantopoulos, Weiner, & Jones, 2013).

3.5.3 Sistema endocannabinoide

Algunos estudios que se han enfocado a describir los cambios en el SeCB causados por el aislamiento social. Utilizando un fármaco radiomarcado que se une al receptor CB1, se ha mostrado que el aislamiento social aumenta la expresión del CB1 en el núcleo caudado, principalmente en su porción dorsomedial y ventrolateral; sin embargo, no hubo cambios en la expresión del CB1 en el NAcc, amígdala ni en el hipocampo (Sciolino et al., 2010). En contraste, a través de

inmunofluorescencia se ha visto que hay una menor cantidad de CB1 en el caudado-putamen y la amígdala de ratas aisladas (Malone et al., 2008). Además, este grupo de investigación mostró que la expresión de la FAAH es mayor en el NAcc y caudado-putamen de individuos aislados en comparación a sujetos socializados (Malone et al., 2008).

Adicionalmente, se ha determinado que la concentración de 2-AG en la CPF es mayor en ratas aisladas en comparación a ratas socializadas, mientras no hay diferencias en la cantidad de 2-AG en el NAcc ni en el hipocampo. De igual forma, no se mostraron cambios en la cantidad de AEA en NAcc, hipocampo y CPF asociados al aislamiento social (Sciolino et al., 2010).

3.6 Cambios conductuales asociados al aislamiento social

3.6.1 Conducta tipo ansiedad

Diversos grupos de investigación usando diferentes paradigmas conductuales han mostrado el aislamiento social durante la adolescencia aumenta la conducta tipo ansiedad; por ejemplo, el aislamiento social reduce el tiempo que pasan los sujetos en los brazos abiertos del laberinto elevado de brazos abiertos en comparación con los individuos sociales (Chappell, Carter, McCool, & Weiner, 2013; Karkhanis et al., 2014; McCool & Chappell, 2009; Skelly, Chappell, Carter, & Weiner, 2015; Yorgason et al., 2013). De igual forma, utilizando la prueba de hiponeofagia, los animales aislados tardan más en acercarse al alimento novedoso e ingieren una menor cantidad de alimento que los animales que crecieron en un ambiente social (Parker & Morinan, 1986). Adicionalmente, utilizando en laberinto elevado en forma de cero y el campo abierto, ratones que se someten al aislamiento social pasan

menos tiempo en los segmentos abiertos del laberinto en forma de cero y menos tiempo en los cuadrantes centrales del campo abierto en comparación con los animales socializados (Cuesta et al., 2020; Han et al., 2018). Todas estas evidencias apuntan a que el aislamiento social aumenta las conductas tipo ansiedad, y se ha mostrado que el aumento de las conductas tipo ansiedad en los animales aislados parece depender de la falta de juego de los roedores en una etapa crítica del desarrollo (Baenninger, 1967; Panksepp, 1981).

3.5.2 Conductas reforzadas y Adicción

Anteriormente se señaló la importancia del sistema dopaminérgico en el reforzamiento. Asimismo, se mencionaron algunos cambios en el sistema dopaminérgico provocados por el aislamiento social y se ha mostrado que estos cambios pueden afectar la motivación y el reforzamiento, los cuales pueden facilitar el consumo de sustancias de abuso. Por ejemplo, el aislamiento social facilita la autoadministración de cocaína, incluso adquieren la conducta de autoadministración a dosis bajas, sugiriendo que los individuos aislados son más sensibles a los efectos reforzantes de la cocaína (Gipson, Beckmann, El-Maraghi, Marusich, & Bardo, 2011; Howes, Dalley, Morrison, Robbins, & Everitt, 2000; Schenk, Lacelle, Gorman, & Amit, 1987; Zhang, Sanchez, Kehoe, & Kosten, 2005). Otros estudios han mostrado que los animales aislados se autoadministran más a dosis altas de cocaína en comparación con los individuos socializados (Ding, Kang, Li, & Ma, 2005; Schenk et al., 1987). Adicionalmente, se ha mostrado que los animales aislados tienen mayor motivación por autoadministrarse cocaína en tareas

de razón progresiva (Baarendse, Limpens, & Vanderschuren, 2014; Zhang et al., 2005).

De igual forma, el aislamiento social facilita la autoadministración de anfetamina (Bardo, Klebaur, Valone, & Deaton, 2001), y morfina (Raz & Berger, 2010). En la tarea de CPP, también se ha demostrado que el aislamiento social facilita la búsqueda por psicoestimulantes, por ejemplo, los animales aislados tienen mayor preferencia por el compartimento asociado a cocaína o anfetamina que los individuos socializados (Cuesta et al., 2020; Whitaker, Degoulet, & Morikawa, 2013; Zakharova, Miller, Unterwald, Wade, & Izenwasser, 2009). Adicionalmente, diversos estudios han mostrado que el aislamiento social aumenta la preferencia por el alcohol en un paradigma de elección libre entre una botella de agua y una botella de alcohol (McCool & Chappell, 2009); además promueve el consumo de alcohol (Chappell et al., 2013; Karkhanis, Rose, Weiner, & Jones, 2016; Skelly et al., 2015) y la autoadministración (McCool & Chappell, 2009). Este hiperconsumo de alcohol está asociado con una mayor liberación de DA en el NAcc en respuesta al alcohol (Karkhanis et al., 2014). Usando el paradigma de CPP, también se mostró que los animales aislados desarrollan el CPP, mientras que este efecto no se observa en los animales aislados (Whitaker et al., 2013).

Estas evidencias apuntan a que el aislamiento social vulnera a los individuos a consumir una mayor cantidad de sustancias de abuso que a la larga podría resultar en el desarrollo de una adicción, y esto se puede deber a cambios en sistemas que regulan el reforzamiento.

Capítulo 4: Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos

4.1 Planteamiento del problema y pregunta experimental

El trastorno por consumo de alcohol está caracterizado por un consumo compulsivo de alcohol, la incapacidad de controlar el consumo y por la presencia de un estado emocional negativo durante la abstinencia. Diversos estudios sugieren que el desarrollo del trastorno por consumo de alcohol involucra cambios adaptativos en circuitos cerebrales que están relacionados con los estados afectivos negativos como la ansiedad, anhedonia y depresión, y cambios en el sistema de motivación-recompensa. Se ha mostrado que existe una comorbilidad entre el trastorno por consumo de alcohol y los trastornos del estado de ánimo y de ansiedad. De igual forma, las experiencias adversas sufridas durante la niñez, entre ellas el cuidado negligente, aumentan el riesgo de desarrollar trastorno por consumo de alcohol y trastornos del estado de ánimo y de ansiedad. En animales de experimentación, la separación de las crías de la madre en etapas tempranas del desarrollo y el aislamiento social han funcionado como modelos para estudiar los cambios conductuales y neuroquímicos debidos a las experiencias adversas en etapas tempranas del desarrollo. Diversos estudios han mostrado que la separación materna y el aislamiento social aumentan el consumo del alcohol y las conductas tipo ansiedad. De igual forma, se han mostrado cambios en la expresión del receptor CB1 por la separación materna en la CPF y NAcc; y aumento en la concentración de endocannabinoides en Nacc e hipocampo.

Sin embargo, se desconoce si la separación materna más el aislamiento social aumentan el consumo de alcohol y las conductas de tipo ansiedad, por cambios en el sistema endocannabinoide y dopaminérgico.

Con base en lo anterior, surgen las siguientes preguntas experimentales:

¿El aislamiento social aumenta el consumo de alcohol y las conductas tipo ansiedad en ratas privadas de cuidado materno?

¿Cuáles son los cambios en el sistema dopaminérgico y endocannabinoide asociado a la privación de cuidado materno más aislamiento social?

4.2 Hipótesis

El aislamiento social aumenta el consumo de alcohol y las conductas tipo ansiedad en ratas privadas de cuidado materno a través de cambios en la expresión de los receptores CB1, CB2, D2 y D3 en el NAcc.

4.3 Objetivos

4.3.1 Objetivo General

Establecer si la privación del cuidado materno y el aislamiento social se asocian a un incremento en el consumo de alcohol y las conductas tipo ansiedad; y cómo modifica la expresión de algunos componentes del sistema dopaminérgico y endocannabinoide en el NAcc.

4.3.2 Objetivos particulares

1. Determinar si el aislamiento social aumenta el consumo de alcohol en las ratas privadas del cuidado materno.
2. Determinar la expresión de los receptores CB1, CB2, D2 y D3 en el NAcc después de la manipulación conductual.

Capítulo 5: Metodología General

5.1 Experimento 1

5.1.1 Animales

Se emplearon 5 ratas Wistar gestantes a término (14 – 17 día gestacional). Los animales fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las ratas gestantes fueron constantemente monitoreadas para detectar el momento del nacimiento (DPN 0).

Todos los animales fueron mantenidos bajo condiciones de luz-oscuridad 12x12 (hora de encendido 08:00 AM), temperatura (21 ± 1 °C) y humedad (52%) constantes. Los animales tuvieron acceso a agua y alimento (RatChow, Purina) *ad libitum*. El manejo y cuidado de los animales se apegó estrictamente a las disposiciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana sobre “Especificaciones Técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio” (NOM-062-ZOO-1999) y a la Guía para el cuidado y uso de mamíferos en neurociencia e investigación conductual (National Research Council, 2010), y también en cumplimiento con las pautas ARRIVE (Animal Research: Reporting in Vivo Experiments, (www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines)) y fueron aprobados por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina, UNAM.

Para evitar la variabilidad en las pruebas debido a los ritmos circadianos, todas las pruebas (e.g, laberinto elevado de brazos abiertos, cuantificación del consumo de alcohol) se realizaron entre las 08:00 horas y las 11:00 horas. En la

Figura 5.1 se muestra la línea de tiempo con la secuencia de eventos y pruebas conductuales a las que se sometieron los animales.

5.1.2 Privación de cuidado materno

El protocolo de privación de cuidado materno duró del DPN 2 hasta el DPN 15, y consiste en quitar a la madre de las crías por 3 horas diarias (8:00 – 11:00 horas). A partir del DPN16 hasta el destete (DPN 21) las crías permanecen las 24 horas con su madre. En contraste, el grupo control (sin-PCM), las crías permanecen las 24 h con su madre desde el nacimiento hasta el destete.

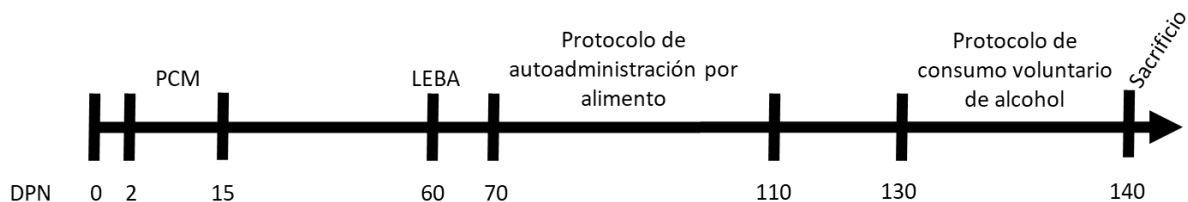


Figura 5.1: Línea del tiempo del experimento 1. DPN: día postnatal, PCM: privación de cuidado materno, LEBA: Laberinto elevado de brazos abiertos.

5.1.3 Laberinto elevado de brazos abiertos

A los animales se les evaluó las conductas tipo ansiedad utilizando el laberinto elevado de brazos abiertos, el cual consiste en un laberinto de 4 brazos con forma de signo de +, cada brazo mide 50 cm de largo x 12 cm de ancho. 2 brazos son abiertos, es decir, no tienen paredes, mientras los otros dos son cerrados, es decir tienen una pared de 90 cm de alto (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985). Las ratas se colocaron en el centro frente a un brazo abierto y se les permitió explorar el laberinto durante 5 min (300 s). Se usó un sistema de seguimiento de

video de comportamiento animal para registrar a los animales durante la prueba y se evaluó el tiempo de permanencia en cada brazo, así como el número de cruces.

5.1.4 Protocolo de autoadministración de alimento

Para evaluar el estado motivacional de las ratas, éstas fueron sometidas a un programa de razón progresiva, que mide la disposición de los animales a trabajar para obtener un *pellet* de alimento (Amancio-Belmont, Romano-López, Ruiz-Contreras, Méndez-Díaz, & Prospéro-García, 2017). La autoadministración de alimento ocurrió en cámaras de condicionamiento operante (Med Associated Inc., Saint Albans, VT, EE. UU.), equipadas con una palanca conectada a un depósito de alimento. Al presionar la palanca activa, se obtiene un *pellet* con sabor a chocolate (Dustless Precision pellets®, 45 mg de sabor a chocolate) y se enciende una luz blanca encima de la palanca (1 s), mientras que la palanca inactiva no entrega nada. Se registraron todas las presiones de palanca. Antes del experimento, los animales se mantenían al 85% de su peso corporal mediante la restricción de alimentos durante las sesiones de entrenamiento que fueron a razón fija 1 (FR1, por sus siglas en inglés). El entrenamiento duró 5 sesiones diarias de 30 minutos en donde los animales tenían que aprender a presionar la palanca activa para obtener el alimento.

Una vez completado el entrenamiento los animales regresaron a un programa de alimentación ad libitum y fueron sometidas a un programa de razón fija 5 (FR5, por sus siglas en inglés) hasta que alcanzaron la estabilidad. La estabilidad se obtuvo cuando las ratas presionaron la palanca activa sin variación superior al

15% en el número de presiones, en tres días consecutivos. Una vez que las ratas alcanzaron la estabilidad, se sometieron a un programa de razón progresiva para determinar la cantidad de trabajo que las ratas están dispuestas a realizar para obtener una recompensa en una tarea operante (*Breakpoint*). En estas sesiones las ratas tenían que presionar la palanca activa un número cada vez mayor de veces para obtener el siguiente *pellet* de alimento. El número de presiones de palanca necesarias para obtener cada *pellet* fue determinado con la siguiente fórmula ($PR = [5e^{(0.2 \times \text{número de } pellet)} - 5]$), que nos dio la siguiente secuencia: 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, 268, 328, 402, 492, 603. Las ratas alcanzaron el *breakpoint* cuando pasaron más de 20 minutos sin presionar la palanca activa o la sesión finalizaba (duración de la sesión = 1 h)

5.1.5 Protocolo de consumo voluntario de alcohol

Los animales (n = 10 por grupo) fueron sometidos al protocolo de consumo continuo y voluntario de alcohol. Los animales fueron alojados de manera individual y se le dio acceso continuo a una botella de agua y a otra con una solución de alcohol al 10%, por 10 días. Las botellas se cambiaban de lugar diariamente para evitar preferencia de lugar. La cantidad de líquido consumido de ambas botellas se cuantificó diariamente, así como la cantidad de alimento consumido.

5.1.6 Western blot

Finalizando el protocolo de alcohol los animales fueron sacrificados. Adicionalmente se sacrificó un grupo de ratas ratas naïve (n = 5 x grupo). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical seguidos de decapitación. Los cerebros se extrajeron rápidamente y se obtuvo las siguientes estructuras: CPF y NAcc con base en el manual estereotáxico (Paxinos y Watson, 2004). A los tejidos se les agregó 0.1g de tejido/ 1 mL de buffer de extracción de proteínas que contiene 250 mM de sucrosa, 1 mM de EDTA, 10 mM de Tris-HCl, 10 mM de PMSF, pH de 7.6 y coctel de inhibidores de proteasas (1 tableta/50 mL) (Roche Diagnostics) y se homogenizaron las muestras por sonicación.

Los homogeneizados se centrifugaron a 1000 g x 10 min a 4°C. Se separó el sobrenadante (S1) del precipitado (P1). P1 se desechó, mientras que S1 se centrifugó a 17000 g durante 20 min y a 4°C. Se separó el sobrenadante (S2), que contiene las proteínas citoplasmáticas, del precipitado (P2) que contiene las proteínas de la membrana plasmática. El P2 fue resuspendido agregando 85 µL del buffer de extracción de proteínas. Las muestras se congelaron a -20°C para su posterior análisis.

Para cuantificar la cantidad de proteína de la muestra, se empleó el método de Lowry (Lowry y cols., 1951). Para ello se preparó una solución stock de albumina con una concentración de 0.00147 g/mL (0.0147 g de albumina/10 mL de solución salina). Las muestras se cuantificaron por triplicado.

La solución de albumina se empleó para hacer una curva estándar, empleando como Blanco 37 μL de solución salina, 18 μL del reactivo A de Lowry (BIO-RAD) y 145 μL del reactivo B de Lowry (BIO-RAD). Para cada punto de la curva estándar se utilizó el mismo volumen de los reactivos A y B de Lowry. Para determinar la concentración de proteína se empleó 1 μL de muestra más 36 μL de solución salina más 18 μL del reactivo A de Lowry (BIO-RAD) y 145 μL del reactivo B de Lowry (BIORAD). Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y se lee a 600 nm en un espectrofotómetro. A través de la Ley de Lambert y Beer se determinó la concentración de proteína en cada muestra.

Para la cuantificación de la expresión de receptores se utilizó la técnica de western blot. Cada muestra se cuantificó por triplicado. El western blot es una técnica analítica que se usa para detectar proteínas específicas de una mezcla compleja de proteínas mediante una electroforesis en gel. 20 mg de proteína de las muestras que contienen proteínas de la membrana plasmática se colocaron en cada pozo del gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida al 8 % por 100 min a 110 V. Una vez separadas las proteínas por el peso molecular, se realizó la electrotransferencia a una membrana de PVDF (Millipore) durante 45 min a 10 V, en donde las proteínas del gel se desplazan hacia el polo positivo, quedando atrapadas en la membrana.

Las membranas se lavaron 3 veces (10 min cada lavado) empleando TBS-T (20 mM Tris HCl, 136 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6). Después, se realizó el bloqueo utilizando leche descremada en polvo (BIO-RAD) al 5 % en TBS-T durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana de PVDF se incubó durante la noche con anticuerpos policlonales de conejo CB1R (1:1000, CST, MA, EEUU) o β -actina

(1:1000, CST, MA, EEUU) diluido en TBS-T a 4 ° C. La membrana se lavó tres veces (10 minutos cada lavado) con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario de burro anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1:2,000; CST, MA, USA) en TBS-T durante 2 horas a temperatura ambiente.

Los inmunoblots se detectaron empleando un reactivo de quimioluminiscencia (AmershamBiosciences) y exponiendo la membrana a una película auto-radiográfica durante 1 minuto (Kodak). Las películas auto-radiográficas se analizaron en computadora empleando el programa *ImageG*. Los resultados se cuantificaron como la densidad óptica del receptor en relación con la β -actina, proteína que se empleó como control de carga.

5.1.7 Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como la media \pm EEM (error estándar de la media). Se realizaron pruebas de normalidad para todos los datos (prueba general de D'Agostino-Pearson). Se realizaron comparaciones estadísticas de las diferencias entre los grupos mediante una prueba t de Student de dos colas o la prueba U de Mann-Whitney cuando los datos no satisfacían la prueba de normalidad. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0.05$. Se calculó un coeficiente de correlación de momento de producto de Pearson o una correlación de orden de rango de Spearman, según corresponda, para evaluar la relación en los datos de comportamiento; y entre los datos de comportamiento y la expresión de CB1R. Para los análisis de correlación, la tasa de descubrimiento falso

se controló considerando los resultados como significativos cuando $p \leq 0.02$ para controlar el error Tipo I (Benjamini, Drai, Elmer, Kafkafi, & Golani, 2001). Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism versión 6.0.

5.2 Experimento 2

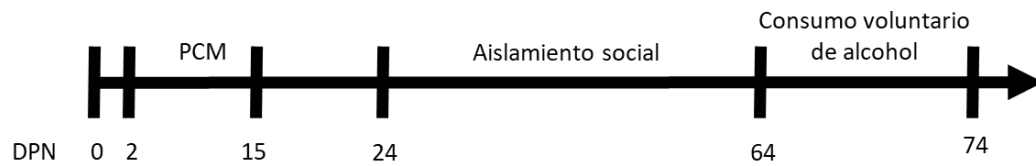
5.2.1 Animales

Se emplearon 12 ratas Wistar gestantes a término (14 – 17 día gestacional). Los animales fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las ratas gestantes fueron constantemente monitoreadas para detectar el momento del nacimiento (DPN 0).

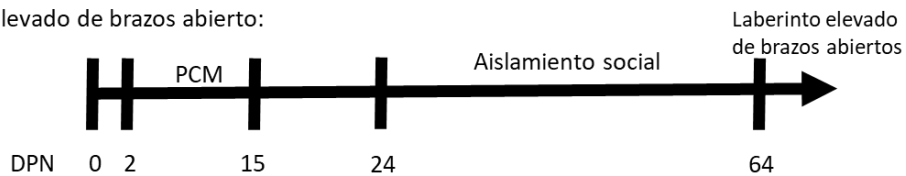
Todos los animales fueron mantenidos bajo las mismas condiciones descritas en la sección 5.1.1. El manejo y cuidado de los animales se apejó estrictamente a las disposiciones descritas en la sección 5.1.1 y el protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina, UNAM.

Para evitar la variabilidad en las pruebas debido a los ritmos circadianos, todas las pruebas (e.g, laberinto elevado de brazos abiertos, cuantificación del consumo de alcohol) se realizaron entre las 08:00 horas y las 11:00 horas. En la Figura 5.2 se muestra la línea de tiempo con la secuencia de eventos y pruebas conductuales a las que se sometieron los animales.

Protocolo de consumo voluntario de alcohol:



Laberinto elevado de brazos abierto:



Western Blot:

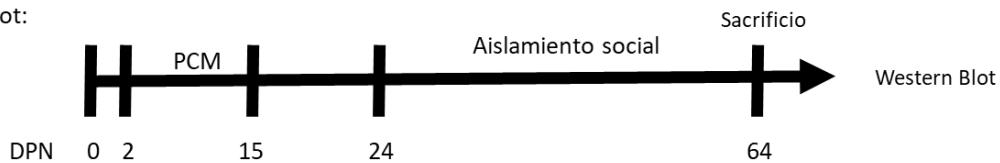


Figura 5.2: Línea del tiempo del experimento 2. DPN: día postnatal, PCM: privación de cuidado materno.

5.2.2 Privación de cuidado materno y Aislamiento social

Para la privación de cuidado materno se utilizó el mismo protocolo descrito en la sección 5.1.2. El aislamiento social consistió en alojar individualmente a las ratas ($n = 60$ sin privación de cuidado materno y 60 con privación de cuidado materno); en contraste, los grupos sociales se mantuvieron en grupos de 10 en una caja de acrílico ($n = 30$ por grupo) con las siguientes dimensiones $100 \times 50 \times 50$ cm, del DPN24 al 64.

5.2.3 Laberinto elevado de brazos abiertos

Se evaluó las conductas tipo ansiedad utilizando el laberinto elevado de brazos abiertos a animales naïve (n = 10 por grupo). Se utilizó el mismo protocolo descrito en la sección 5.1.3.

5.2.4 Protocolo de consumo voluntario de alcohol

Se evaluó el consumo de alcohol en animales naïve (n = 10 por grupo). Se utilizó el mismo protocolo descrito en la sección 5.1.5.

5.2.5 Western blot

Un grupo de ratas naïve (n = 10 por grupo) se sacrificó mediante dislocación cervical seguido de decapitación. Los cerebros se extrajeron rápidamente y se obtuvo el NAcc con base en el manual estereotáxico (Paxinos y Watson, 2004). El procesamiento de la muestra, la cuantificación de proteínas y el protocolo de western blot que se usó está descrito en la sección 5.1.6. La membrana de PVDF se incubó durante la noche con anticuerpos policlonales de conejo D2R (1:300, Santa Cruz, CA, EEUU), D3R (1:1000, Creative Diagnostics, NY, EEUU), CB1R (1:1000, CST, MA, EEUU) o CB2R (1:500, Santa Cruz, CA, EEUU) diluido en TBS-T a 4 ° C. La membrana se lava tres veces (10 minutos cada lavado) con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario de burro anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1:2,000; CST, MA, USA) en TBS-T durante 2 horas a temperatura ambiente.

Los inmunoblots se detectaron empleando un reactivo de quimioluminiscencia (AmershamBiosciences) y exponiendo la membrana a una película auto-radiográfica durante 1 minuto (Kodak). Las películas auto-radiográficas se analizaron en computadora empleando el programa *ImageG*. Los resultados se cuantificaron como la densidad óptica del receptor en relación con la β -actina, proteína que se empleó como control de carga.

5.2.6 Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como la media \pm EEM (error estándar de la media). Se realizaron pruebas de normalidad para todos los datos (prueba general de D'Agostino-Pearson). Se realizaron comparaciones estadísticas de las diferencias entre los grupos mediante una ANOVA de dos vías con la variable cuidado materno (Sin privación de cuidado materno vs. Privadas de cuidado materno) y la variable socialización (Sociales vs. Aislamiento Social). Se usó una prueba Tukey como post hoc. Para los datos del consumo diario de alcohol, se analizaron los datos a través de una ANOVA mixta de tres vías (entre sujetos: cuidado materno y tipo de crianza; intra sujetos: días). Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism versión 6.0.

Capítulo 6: Resultados

6.1 Experimento 1

6.1.1 Datos conductuales

La secuencia de las pruebas se ilustra en la Figura 5.1. Los datos muestran que la privación de cuidado materno (PCM) disminuye el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz (Figura 6.1; $t_{(18)} = 2.323$, $p = 0.0321$); de igual forma disminuye el número de entradas en los brazos abiertos (Figura 6.1; $t_{(18)} = 2.376$, $p = 0.0288$) en comparación con el grupo control (sin PCM). Sin embargo, no hay diferencias en el número total de entradas en el laberinto (Figura 6.1; $t_{(18)} = 0.4166$, $p = 0.6819$), ni en la distancia total (Figura 6.1; $t_{(18)} = 0.7562$, $p = 0.4593$).

En cuanto a la motivación por un reforzador apetitoso, los datos señalan que no existen diferencias estadísticamente significativas en la fase de adquisición de la tarea ni en la fase de razón fija 5 (FR5 por sus siglas en inglés) en ninguna de las dos palancas (activa e inactiva). De igual forma, no hay diferencias en la cantidad de alimento consumido. En la sesión de razón progresiva, tampoco se observaron diferencias en el número de presiones en palanca activa ni inactiva, ni en el *breakpoint* (BP) entre ratas el grupo control y las ratas que fueron privadas de cuidado materno (Tabla 2).

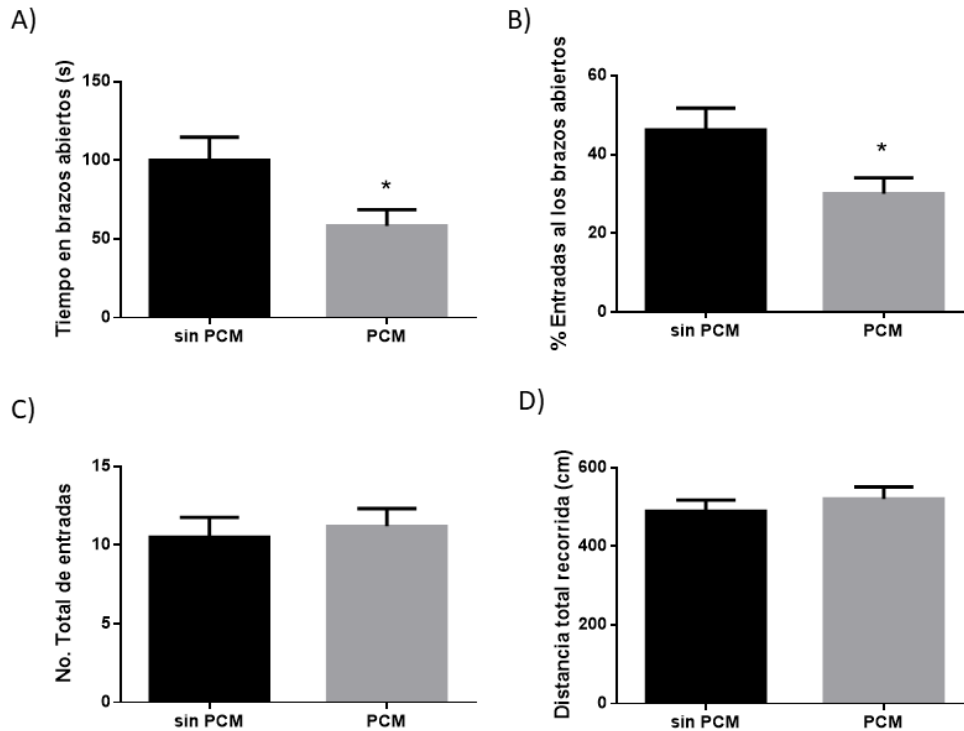


Figura 6.1: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) en la conducta tipo ansiedad. Los resultados muestran el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (A), el porcentaje de entradas a los brazos abiertos (B), el número total de entradas y la distancia total recorrida (D). * $p < 0.05$ sin PCM vs PCM.

Los datos de consumo de alcohol señalan que las ratas privadas de cuidado materno consumen una mayor cantidad de alcohol en comparación con el grupo control (Figura 6.2; $t_{(18)} = 2.466$, $p = 0.0239$). Haciendo análisis de correlaciones, los datos muestran una correlación negativa entre la cantidad de alcohol consumido y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto elevado de brazos abiertos (Figura 6.2, $r = -0.5698$, $p = 0.0087$). Sin embargo, no hay correlación entre el consumo de alcohol y la motivación por un reforzador apetitoso (Figura 6.2, $p = 0.6292$).

Tabla 3: Resultados del protocolo de autoadministración por un reforzador apetitoso

Parámetro	Sin PCM	PCM	t-test or Mann Whitney test	p
a) Presiones en la palanca activa (FR1)	252.7 ± 44.65	295.5 ± 35.84	t ₍₁₈₎ = 0.7476	0.4644
b) Presiones en la palanca inactiva (FR1)	4.100 ± 1.027	2.400 ± 0.8192	t ₍₁₈₎ = 1.294	0.2120
c) Presiones en la palanca activa (FR5)	260.7 ± 37.48	342.3 ± 55.92	t ₍₁₈₎ = 1.211	0.2415
d) Presiones en la palanca inactiva (FR5)	7.267 ± 1.941	11.17 ± 5.116	t _(11.54) = 0.7127	0.4902
e) Cantidad de alimento consumido en la línea base (g de alimento/ g de peso x 100)	0.6956 ± 0.1218	0.9680 ± 0.1641	t ₍₁₈₎ = 1.333	0.1992
f) Presiones en la palanca activa (BP)	259.6 ± 38.18	295.5 ± 74.72	t ₍₁₈₎ = 0.4279	0.6738
g) Presiones en la palanca inactiva (BP)	20.20 ± 11.45	18.50 ± 7.559	t ₍₁₈₎ = 0.1239	0.9028
h) <i>Breakpoint</i>	77 [50, 81.5]	77 [47.5, 81.5]	U _(110.5,99.5) = 44.5,	0.6977

Los datos están expresados como media ± EEM, a excepción del Breakpoint: mediana [rango intercuartil].

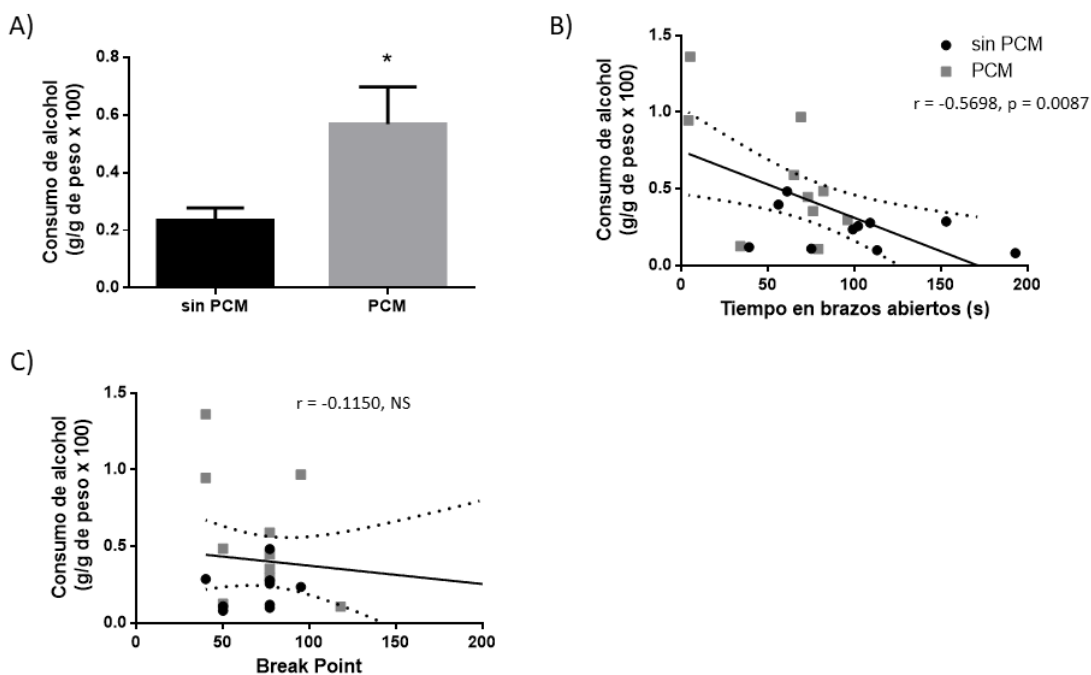


Figura 6.2: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) en el consumo de alcohol. Los datos muestran el consumo de alcohol (A) * $p < 0.05$ sin PCM vs PCM. B-C) Correlación entre la cantidad de alcohol consumido y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (B) y el Break point (C).

6.1.2 Expresión del receptor CB1

Se evaluó la expresión del receptor CB1 en un grupo de ratas naïve. Los datos muestran que la privación de cuidado materno disminuye la expresión del CB1 en la CPF (Figura 6.3; $t_{(4.779)} = 2.466$, $p = 0.0370$) y aumenta la expresión del CB1 en el NAcc (Figura 6.4; $t_{(8)} = 6.507$, $p = 0.0002$).

Adicionalmente, a las ratas que fueron sometidas a las evaluaciones conductuales, se les sacrificó al finalizar el protocolo de alcohol. Los datos muestran que existe una fuerte correlación negativa entre la cantidad de alcohol consumido y la expresión del receptor CB1 en la CPF (Figura 6.3, $r = -0.8464$, $p < 0.0001$). Sin

embargo, no hay una correlación entre el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (Figura 6.4, $p = 0.0449$) ni de la motivación por un reforzador apetitoso con la expresión del receptor CB1 en la CPF ($p = 0.8265$).

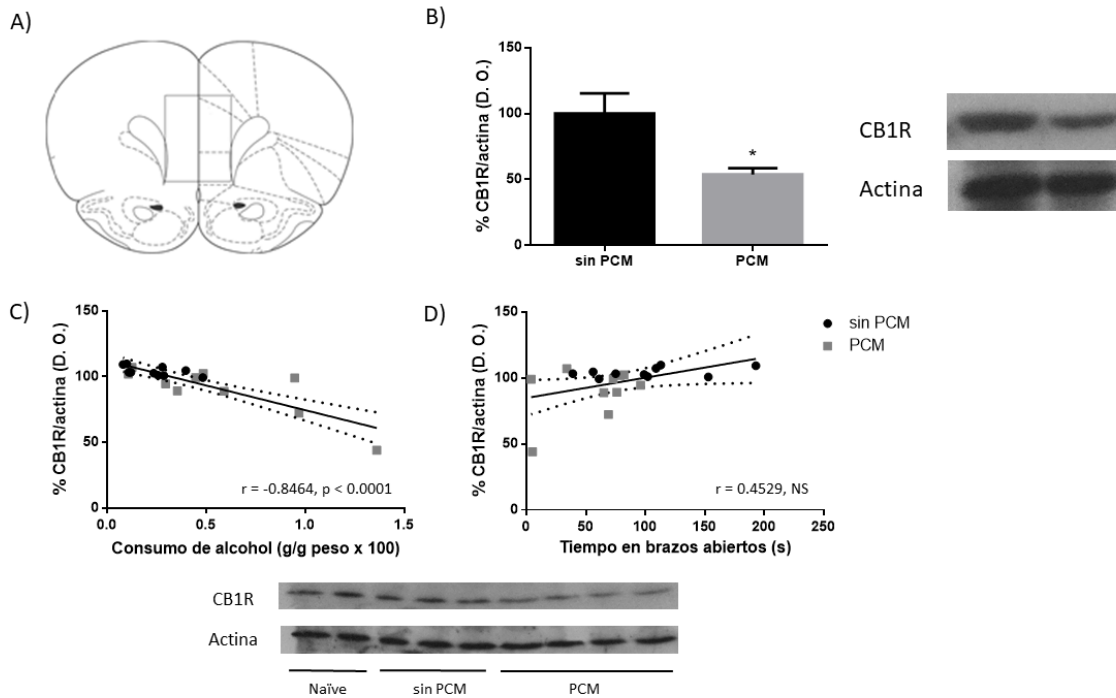


Figura 6.3: Receptor CB1 en la CPF. A) Ilustra la región del cerebro disectada. **B)** Expresión del receptor CB1 en la CPF, * $p < 0.05$. **C-D)** Correlación entre la expresión del receptor CB1 en la CPF y el consumo de alcohol (C), y entre la expresión del receptor CB1 en la CPF y el tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado de brazos abiertos (D). * $p < 0.05$ sin PCM vs PCM.

Además, se encontró una fuerte correlación entre la cantidad de alcohol consumido y la expresión del CB1 en el NAcc (Figura 6.4, $r = 0.8994$, $p < 0.0001$), y una correlación negativa entre el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y la expresión del CB1 en el NAcc (Figura 6.4, $r = -0.4529$, $p = 0.0202$). Sin embargo,

no se encontró correlación entre la motivación por un reforzador apetitoso y la expresión del CB1 en el NAcc ($p = 0.3058$).

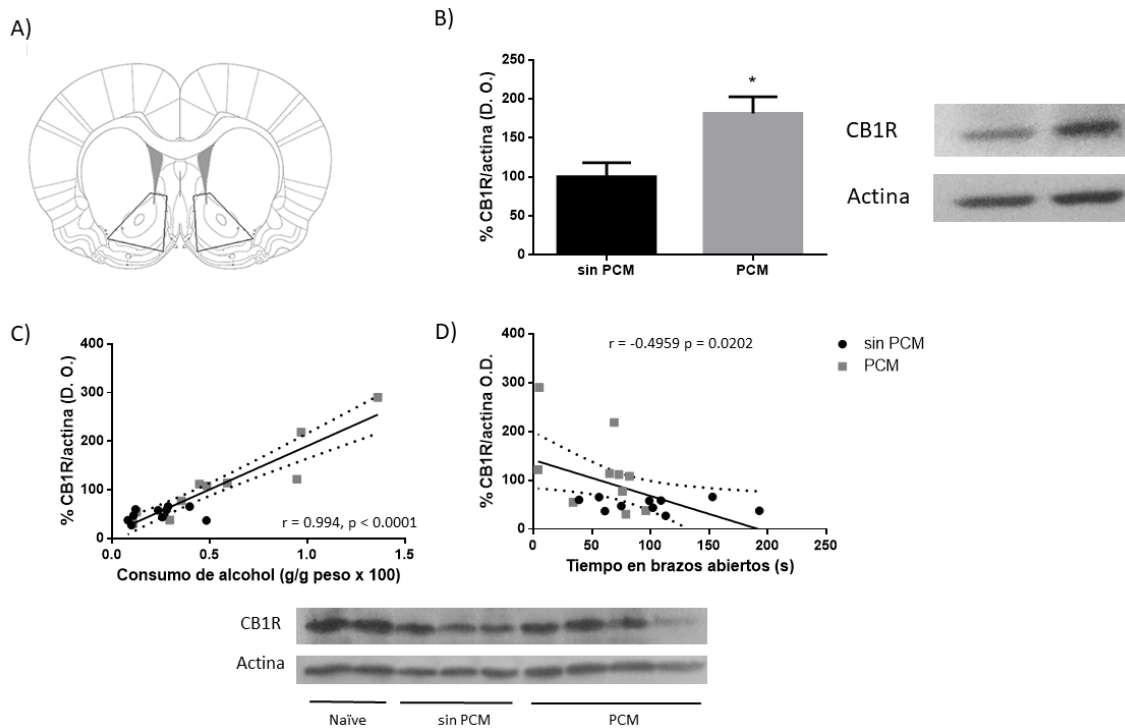


Figura 6.4: Receptor CB1 en el NAcc. A) Ilustra la región del cerebro disectada. B) Expresión del receptor CB1 en el NAcc, $*p < 0.05$. C-D) Correlación entre la expresión del receptor CB1 en el NAcc y el consumo de alcohol (C), y entre la expresión del receptor CB1 en el NAcc y el tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado de brazos abiertos (D). $* p < 0.05$ sin PCM vs PCM.

Asimismo, se encontró una fuerte correlación entre la expresión del receptor CB1 en la CPF y en el NAcc ($r = -0.865$, $p < 0.0001$). Considerando las correlaciones encontradas entre la expresión del CB1 en la CPF y en NAcc con el consumo de alcohol, y la correlación entre el consumo de alcohol y el tiempo en los brazos abierto se decidió hacer un análisis de regresión múltiple considerando estas tres variables. Los resultados muestran que sólo la expresión del receptor CB1 en el NAcc predice la cantidad de alcohol consumido por la rata ($\beta = 0.806$, $t_{(18)} = 3.592$,

$p = 0.001$), explicando una alta proporción de la varianza (R^2 ajustada = 0.827; $F_{(3,16)} = 31.247$, $p = 0.000001$).

6.2 Experimento 2

6.2.1 Datos conductuales

En el experimento 2 además de emplear ratas con privación de cuidado materno (PCM), también se emplearon ratas que sufrieron de aislamiento social (AS) durante la adolescencia y ratas con la combinación de ambos estresores (PCM + AS). A todos los individuos se les evaluó en la edad adulta el consumo de alcohol y la conducta tipo ansiedad. En la figura 6.5 se muestran los resultados para la conducta tipo ansiedad, los cuales muestran un efecto principal significativo en la variable cuidado materno para el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados del laberinto elevado de brazos abiertos (brazos abiertos: $F_{(1,32)} = 12.84$, $p = 0.0011$, $\eta_p^2 = 0.29$; brazos cerrados: $F_{(1,32)} = 6.676$, $p = 0.0145$, $\eta_p^2 = 0.16$). Las ratas privadas de cuidado materno pasan menos tiempo en los brazos abiertos y más tiempo en los brazos cerrados en comparación con las ratas sin privación de cuidado materno. De igual forma, se observó un efecto principal significativo en la variable socialización (brazos abiertos: $F_{(1,32)} = 9.897$, $p = 0.0036$, $\eta_p^2 = 0.24$; brazos cerrados: $F_{(1,32)} = 9.303$, $p = 0.0046$, $\eta_p^2 = 0.23$); los individuos que sufrieron aislamiento social pasan una menor cantidad de tiempo en los brazos abiertos y una mayor cantidad en los brazos cerrados en comparación con los individuos socializados. La interacción entre cuidado materno y socialización no fue estadísticamente significativa (brazos abiertos: $p = 0.9965$; brazos cerrados: $p =$

0.405). Se realizó un análisis de regresión lineal simple para determinar cómo se afecta el tiempo que pasan en los brazos abierto o cerrados en función de número de factores de estrés que sufrieron los animales. El análisis estadístico muestra que el tiempo en los brazos se predijo significativamente por el número de factores de estrés ($\beta = -0.0087$, $t_{(34)} = -4.915$, $p < 0.0001$), y una proporción significativa de la varianza se explica por estas manipulaciones ($R^2 = 0.4153$, $F_{(1,34)} = 24.15$, $p < 0.0001$). Asimismo, el tiempo en los brazos se predijo significativamente por el número de factores de estrés ($\beta = 0.008$, $t_{(34)} = 3.994$, $p = 0.0003$), y también una proporción significativa de la varianza se explica por el predictor ($R^2 = 0.3194$, $F_{(1,34)} = 15.95$, $p = 0.0003$).

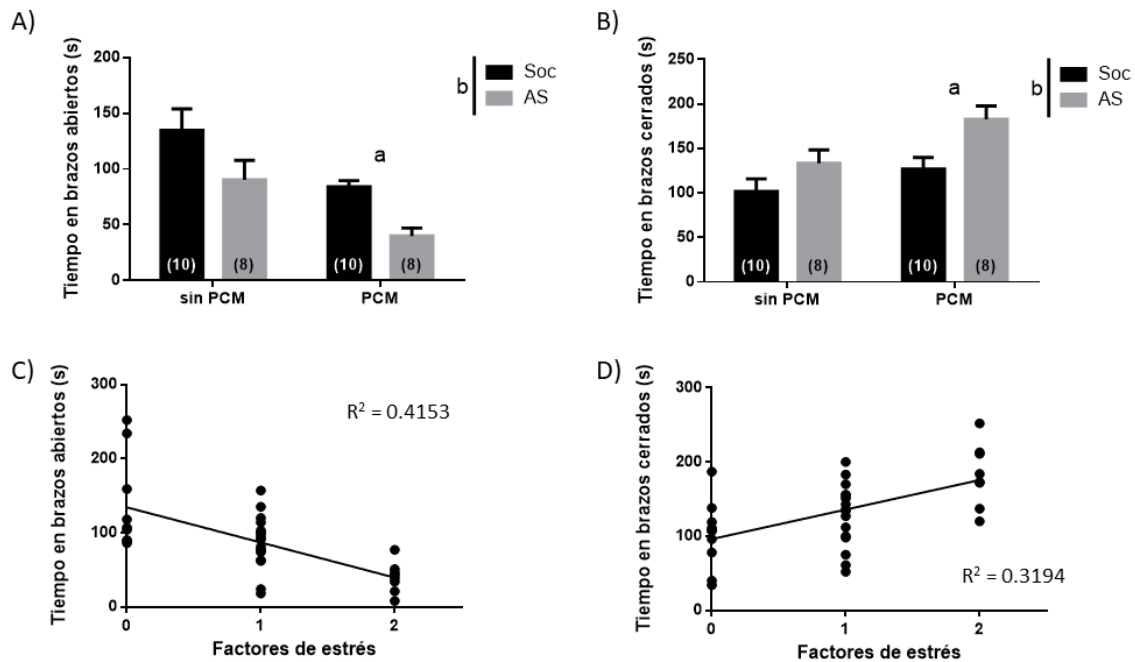


Figura 6.5: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) y el aislamiento social (AS) en las conductas tipo ansiedad. Los datos muestran el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (A) y brazos cerrados (B). (C-D) Análisis de regresión lineal simple para el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (C) y brazos cerrados (D) función de número de factores de estrés. ^a $p < 0.05$ sin PCM vs PCM, ^b $p < 0.05$ Soc vs AS.

En otro grupo diferente de ratas se evaluó el consumo de alcohol voluntario, los datos se muestran en la figura 6.6. El análisis estadístico muestra un efecto principal significativo en la variable cuidado materno para el consumo y la preferencia por el alcohol (Consumo de alcohol: $F_{(1,36)} = 39.14$, $p < 0.0001$, $\eta_p^2 = 0.52$; preferencia por el alcohol: $F_{(1,36)} = 30.26$, $p < 0.0001$, $\eta_p^2 = 0.46$), las ratas privadas de cuidado materno tienen una mayor preferencia y consumo de alcohol en comparación con los animales sin privación de cuidado materno. Asimismo, se observó un efecto principal significativo en la variable socialización (consumo de alcohol: $F_{(1,36)} = 21.74$, $p < 0.0001$, $\eta_p^2 = 0.38$; preferencia por el alcohol: $F_{(1,36)} = 21.37$, $p < 0.0001$, $\eta_p^2 = 0.37$); los individuos que sufrieron aislamiento social tienen un mayor consumo y preferencia de alcohol que los animales socializados. La interacción entre cuidado materno y socialización no fue estadísticamente significativa (consumo de alcohol: $p = 0.4626$; preferencia por el alcohol: $p = 0.968$). También se realizó un análisis de regresión lineal simple para determinar cómo se afecta el consumo y la preferencia de alcohol en función de número de factores de estrés. El análisis estadístico muestra que el consumo de alcohol se predijo significativamente por el número de factores de estrés ($\beta = 0.78$, $t_{(38)} = 7.739$, $p < 0.0001$) y una proporción significativa de la varianza se explica por estas manipulaciones ($R^2 = 0.6118$, $F_{(1,38)} = 59.90$, $p < 0.0001$). Adicionalmente, la preferencia por el alcohol también se predijo significativamente por el número de factores de estrés ($\beta = 0.77$, $t_{(38)} = 7.32$, $p < 0.0001$), y también, una proporción

significativa de la varianza se explica por el predictor ($R^2 = 0.5848$, $F_{(1,38)} = 53.52$, $p < 0.0001$).

Uno de los criterios para determinar si una rata es alta consumidora de alcohol es que consuma más de 5 g/kg de alcohol al día (). En la tabla 3 se muestra la cantidad de animales que cumplen con este criterio. El 27.5% de las ratas de los 4 grupos consume más de 5 g/kg al día. De estos, el 72.7% son ratas que fueron privadas de cuidado materno y después fueron aisladas. El 18.2% pertenecen al grupo PCM + Soc y el 9.1% son ratas sin PCM + AS.

Tabla 4: Distribución de ratas altas y bajas bebedoras

	Sin PCM +Soc	PCM + Soc	Sin PCM + AS	PCM + AS	Total
Bajo (<5g/kg)	10	8	9	2	29
Alto (>5g/kg)	0	2	1	8	11

También se evaluó el consumo total de líquido (Figura 6.7). El análisis estadístico revela que no hay diferencias estadísticamente significativas en función de la variable cuidado materno ($p = 0.2817$), la variable socialización ($p = 0.7094$), ni en la interacción ($p = 0.8442$). De igual forma, se evaluó la cantidad total de calorías ingeridas (Figura 6.7), tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en función de la variable cuidado materno ($p = 0.0645$), la variable socialización ($p = 0.1618$), ni en la interacción ($p = 0.6925$).

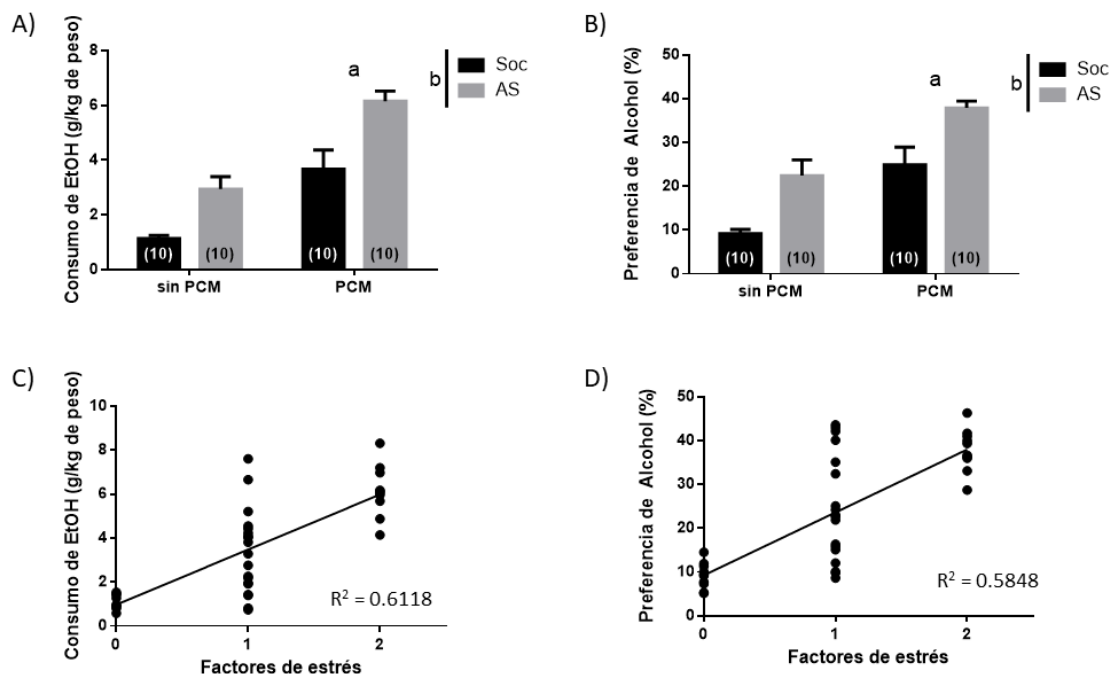


Figura 6.6: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) y el aislamiento social (AS) en el consumo (A) y preferencia (B) por el alcohol. (C-D) Análisis de regresión lineal simple para el consumo (C) y la preferencia por el alcohol (D) función de número de factores de estrés. ^a $p < 0.05$ sin PCM vs PCM, ^b $p < 0.05$, Soc vs AS.

Se cuantificó la cantidad diaria de alcohol que consumieron los diferentes grupos experimentales (Figura 6.8). El análisis estadístico revela que la interacción entre las variables cuidado materno, socialización y día no es estadísticamente significativo ($F_{(1,36)} = 0.42$, $p = 0.521$). Tampoco las interacciones entre cuidado materno-socialización ($F_{(1,36)} = 0.551$, $p = 0.462$), entre socialización-día ($F_{(1,36)} = 0.546$, $p = 0.464$) fueron estadísticamente significativas. En contraste, la interacción cuidado materno-día sí fue estadísticamente significativa ($F_{(1,36)} = 20.748$, $p < 0.0001$). El análisis post hoc muestra que las ratas privadas de cuidado materno consumen mayor cantidad de alcohol a partir del día 2, con excepción del día 5: día 2 ($p < 0.0001$), día 3 ($p = 0.007$), día 4 ($p = 0.005$), día 6 ($p = 0.0005$), día 7 ($p <$

0.0001), día 8 ($p < 0.0001$), día 9 ($p < 0.0001$) y día 10 ($p = 0.0007$) en comparación con los individuos sin privación de cuidado materno. De igual forma, el análisis post hoc muestra que no hay diferencias en el consumo de los animales sin privación de cuidado materno a lo largo de los 10 días ($p > 0.5$). Sin embargo, el grupo con privación de cuidado materno consume una mayor cantidad de alcohol a lo largo de los 10 días: las ratas con privación de cuidado materno consumen más alcohol en el día 6 ($p = 0.018$), día 7 ($p = 0.005$), día 8 ($p < 0.001$), día 9 ($p < 0.001$) y día 10 ($p < 0.001$) en relación con el día 1. Asimismo, ingieren una mayor cantidad de alcohol en los días 8, 9 and 10 en relación con el día 2 ($p = 0.002$, $p = 0.001$, $p = 0.001$, respectivamente), día 3 ($p = 0.005$, $p = 0.004$, $p = 0.004$, respectivamente) y día 4 ($p = 0.011$, $p = 0.009$, $p = 0.01$, respectivamente).

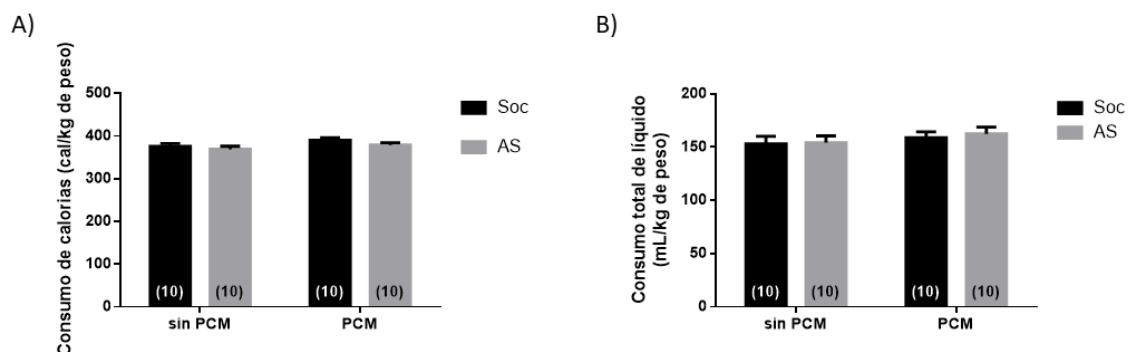


Figura 6.7: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) y el aislamiento social (AS) en el consumo total de líquido (A) y en el consumo total de calorías (B).

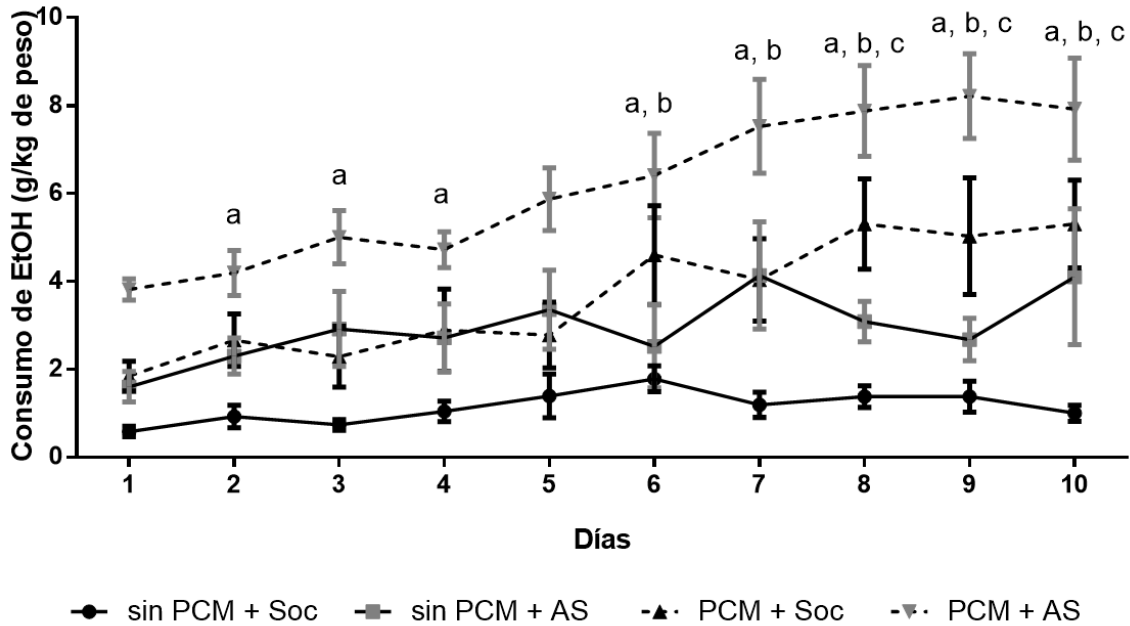


Figura 6.8: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) y el aislamiento social (AS) en el consumo diario de alcohol. ^a $p < 0.01$ para diferencias entre ratas sin PCM vs PCM. En ratas privadas de cuidado materno: ^b $p < 0.02$ vs Día 1. ^c $p < 0.02$ vs Días 2, 3 y 4.

6.2.2 Expresión del receptor CB1 y CB2

Se evaluó la expresión de los receptores CB1 y CB2 en el NAcc, en un grupo de ratas naïve de los 4 grupos experimentales. Los resultados de la expresión del receptor CB1 se muestran en la figura 6.9. El análisis estadístico muestra un efecto principal significativo en la variable cuidado materno para la expresión del receptor CB1 ($F_{(1,36)} = 110.5$, $p < 0.0001$, $\eta_p^2 = 0.75$); sin embargo, el factor socialización ($p = 0.4014$) ni la interacción ($p = 0.2382$) fueron estadísticamente significativos.

Los datos de la expresión del receptor CB2 se muestran en la figura 6.9. El análisis estadístico muestra que ninguno de los factores (Cuidado materno: $p =$

0.1080; Socialización: $p = 0.2150$) ni la interacción ($p = 0.0704$) fueron estadísticamente significativos.

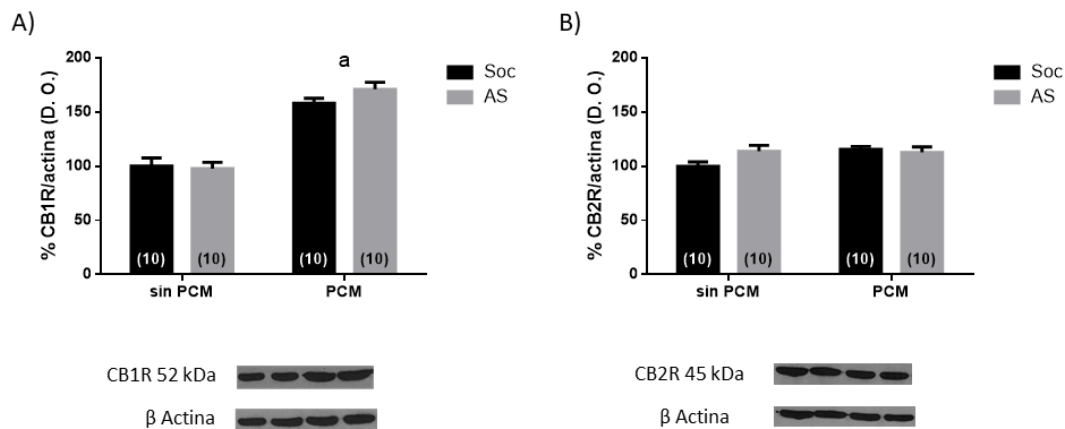


Figura 6.9: Efectos de la privación de cuidado materno (PCM) y el aislamiento social (AS) en la expresión de receptores a cannabinoides CB1 (A) y CB2 (B) en el NAcc. ^a $p < 0.05$ sin PCM vs PCM.

6.2.3 Expresión del receptor D2 y D3

También se determinó la expresión de los receptores D2 y D3 en el NAcc, en un grupo de ratas naïve de los 4 grupos experimentales. Los resultados de la expresión del receptor D2 se muestran en la figura 6.10. El análisis estadístico muestra que los factores principales cuidado materno ($F_{(1,36)} = 16.92$, $p = 0.0002$, $\eta_p^2 = 0.32$) y socialización ($F_{(1,36)} = 6.499$, $p = 0.0152$, $\eta_p^2 = 0.15$) son estadísticamente significativos, así como la interacción ($F_{(1,36)} = 9.798$, $p = 0.0035$, $\eta_p^2 = 0.21$). El análisis *post hoc* muestra que hay una mayor expresión del receptor D2 en los grupos sin PCM + AS ($p = 0.0016$), PCM + Soc ($p < 0.0001$) y PCM + AS ($p = 0.0002$) en comparación con el grupo control (sin PCM + Soc). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sin PCM + AS y PCM

+ Soc ($p = 0.6881$), sin PCM + AS y PCM + AS ($p = 0.8981$), y PCM + Soc y PCM + AS ($p = 0.9763$).

Los resultados para la expresión del receptor D3 se muestran en la figura 6.10. El análisis estadístico muestra que los factores principales cuidado materno ($F_{(1,36)} = 19.39$, $p < 0.0001$, $\eta_p^2 = 0.35$) y socialización ($F_{(1,36)} = 21.61$, $p < 0.0001$, $\eta_p^2 = 0.38$) son estadísticamente significativos, así como la interacción ($F_{(1,36)} = 5.841$, $p = 0.0208$, $\eta_p^2 = 0.14$). El análisis *post hoc* muestra que hay una mayor expresión del receptor D3 en los grupos sin PCM + AS ($p < 0.0001$), PCM + Soc ($p = 0.0001$) y PCM + AS ($p < 0.0001$) en comparación con el grupo control (sin PCM + Soc). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sin PCM + AS y PCM + Soc ($p = 0.9981$), sin PCM + AS y PCM + AS ($p = 0.5048$), y PCM + Soc y PCM + AS ($p = 0.4035$).

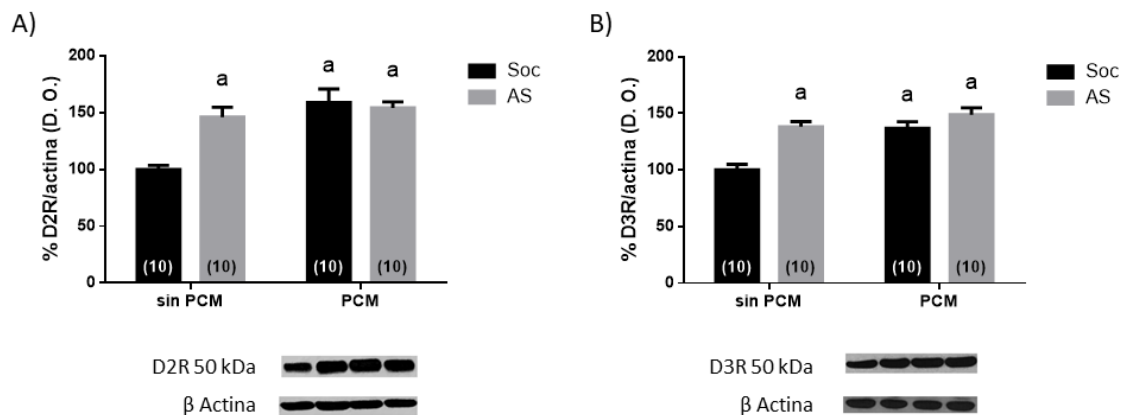


Figura 6.10: Efectos de la privación materna (PCM) y el aislamiento social (AS) en la expresión receptores dopaminérgicos D2 (A) y D3 (B) en el NAcc. ^a $p < 0.05$ vs sin PCM + Soc.

Capítulo 7: Discusión

7.1 Experimento 1

El experimento 1 muestra que la privación de cuidado materno en ratas macho aumenta las conductas tipo-ansiedad e incrementa el consumo voluntario de alcohol. Además, muestra que entre mayor sean las conductas tipo ansiedad, mayor es el consumo de alcohol. Asimismo, la privación de cuidado materno aumenta la expresión del receptor CB1 en el NAcc y reduce la expresión del CB1 en la CPF. También se mostró que a mayor expresión del CB1 en el NAcc, mayor es el consumo de alcohol y mayor las conductas tipo ansiedad. En contraste, a mayor consumo de alcohol, menor es la expresión del CB1 en la CPF.

Estos datos son consistentes con datos previos que han mostrado que la privación de cuidado materno aumenta las conductas tipo ansiedad, por ejemplo, la privación de cuidado materno por 4 horas (h) diarias del DPN 1 al 21 aumenta las conductas tipo ansiedad en ratas Wistar adolescentes (Li et al., 2013). De igual forma, la privación de cuidado materno en ratones aumentó las conductas tipo ansiedad en el laberinto elevado de brazos abiertos, la prueba de caja de luz y oscuridad (light-dark box test) y en el campo abierto (García-Gutiérrez et al., 2015; Shin, Baek, Han, & Min, 2019). Asimismo, privación de cuidado materno por 3 h del DPN 1 al 14 incrementa las conductas tipo ansiedad en ratas Sprague-Dawley adultas (Lee, Kim, & Jahng, 2014); fenómeno que ha sido descrito por otros grupos de investigación (Lambás-Señas et al., 2009). Nuestros datos muestran que la

privación de cuidado materno por 3 h diarias del DPN 2 al 15 incrementa las conductas tipo ansiedad.

De igual forma, diversas investigaciones han mostrado que la privación de cuidado materno facilita el consumo de sustancias de abuso, incluido el alcohol. Previamente en el laboratorio se había mostrado que la privación de cuidado materno por 6 h diarias del DPN 2 al 15 facilita el consumo de alcohol en ratas Wistar adultas en comparación con el grupo sin privación de cuidado materno (Romano-López et al., 2012); mientras que la privación de cuidado materno por 3 h diarias del DPN 2 al 15 aumenta el consumo de alcohol en ratas Long Evans (Huot et al., 2001). Nuestros datos muestran que la privación de cuidado materno por 3 h diarias del DPN 2 al 15 también incrementa el consumo de alcohol voluntario y que este alto consumo de alcohol está correlacionado con el nivel de ansiedad de los individuos. Sin embargo, la privación de cuidado materno no modifica la motivación por obtener un reforzador apetitoso, sugiriendo que el estrés temprano probablemente no impacta en la motivación de reforzadores naturales.

Las interacciones entre la madre y las crías son esenciales para el desarrollo neural de los últimos (Kuhn, Pauk, & Schanberg, 1990; Nephew & Murgatroyd, 2013). Se ha mostrado que las interferencias en estas interacciones pueden alterar los procesos neurales y afectar el desarrollo normal de estructuras relacionadas con el reforzamiento como el NAcc, VTA y el pálido ventral (Monroy et al., 2010; Ploj et al., 2003; Romano-López et al., 2016); con el control del estrés como la CPF (Brenhouse, Lukkes, & Andersen, 2013) y con estructuras que median la respuesta al estrés como el eje HPA y la amígdala (Ladd et al., 1996; Plotsky & Meaney, 1993). Con base en esto, hipotetizamos que estas alteraciones, las cuales incluyen

cambios en el sistema eCB (Portero-Tresserra et al., 2018; Romano-López et al., 2012), pueden incrementar la vulnerabilidad a la ansiedad y esta a su vez facilitar el consumo de alcohol. Dado que diversos estudios han mostrado los efectos ansiolíticos del alcohol (Morales-Mulia et al., 2012), es esperado que niveles anormales de ansiedad faciliten el consumo de alcohol (Pandey et al., 2005) con el objetivo de disminuir los estados afectivos negativos causados por la ansiedad (Yang et al., 2015). Además, se ha demostrado la importancia de la CPF en la terminación de la respuesta al estrés (Hill et al., 2010, 2011), y a la regulación de las emociones, y la participación del SeCB en estos procesos (Bambico, Katz, Debonnel, & Gobbi, 2007; McLaughlin et al., 2012; Rubino et al., 2008). Con base en esto, se propone que la baja expresión del receptor CB1 en la CPF de ratas con privación de cuidado materno es responsable de los altos niveles de estrés observado en roedores que fueron privados de cuidado materno (Aisa, Tordera, Lasheras, Del Río, & Ramírez, 2007; Lajud, Roque, Cajero, Gutiérrez-Ospina, & Torner, 2012), generando una ineficiente habilidad para detener la respuesta al estrés del eje HPA; que a su vez incrementa los niveles de ansiedad en estos sujetos, lo que facilitaría el consumo de alcohol.

Diversos estudios han mostrado que alcohol induce a cambios en el SeCB, por ejemplo, el tratamiento crónico de alcohol incrementa la síntesis de anandamida y 2-AG en SK-N-SH y en neuronas granulares del cerebelo (Basavarajappa & Hungund, 1999; Basavarajappa, Saito, Cooper, & Hungund, 2000, 2003); mientras, el consumo de alcohol aumenta los niveles de 2-AG en el NAcc (Alvarez-Jaimes, Stouffer, & Parsons, 2009; Caille et al., 2007) y los de AEA en la corteza cerebral (Vinod et al., 2006) y también en el NAcc (Malinen, Lehtonen, & Hyytiä, 2009).

Nuestros datos muestran que la privación de cuidado materno altera la expresión del receptor CB1, observamos que la privación de cuidado materno reduce la expresión del receptor CB1 en la CPF mientras lo incrementa en el NAcc. Hipotetizamos que la reducción en la expresión del receptor CB1 es una medida compensadora del sistema debido al alto tono endocannabinoide en la CPF asociado al alto consumo de alcohol (Hansson et al., 2007). En contraste, la privación de cuidado materno aumenta la expresión del receptor CB1 en el NAcc, la cual suponemos que facilita el consumo de alcohol y además es un mecanismo compensador debido al bajo tono eCB observado en roedores expuestos a la privación de cuidado materno (Portero-Tresserra et al., 2018).

Nuestro estudio muestra la importancia de la expresión del receptor CB1 en el NAcc como un predictor del consumo de alcohol. Diversas evidencias farmacológicas apoyan esta idea; por ejemplo, la activación del CB1 en el NAcc incrementa el consumo de alcohol; en cambio, el bloqueo del CB1 disminuye el consumo de alcohol (Gallate, Saharov, Mallet, & McGregor, 1999; Malinen & Hyytiä, 2008). De igual forma, el antagonismo del receptor CB1 reduce las propiedades reforzantes del alcohol al disminuir la liberación de DA en el NAcc (Hungund et al., 2003). El receptor CB1 se expresa en el NAcc en las terminales glutamatérgicas, su activación previene la liberación de glutamato (Pistis, Muntoni, Pillolla, & Gessa, 2002; Robbe, Alonso, Duchamp, Bockaert, & Manzoni, 2001) lo que a su vez reduce la excitabilidad de las espinosas medianas (MSN, por sus siglas en inglés) del NAcc (Pistis et al., 2002), las cuales ejercen un control inhibitorio sobre las neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan al NAcc (Grueter, Brasnjo, & Malenka, 2010). Por lo tanto, la activación del receptor CB1 en el NAcc indirectamente facilita

la activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA y la liberación de DA en el NAcc (Hungund et al., 2003; Perra et al., 2005) lo que promueve el reforzamiento (Méndez-Díaz et al., 2019). Con base en esto, hipotetizamos que la privación de cuidado materno sobreexpresa al receptor CB1 en las terminales glutamatérgicas, las cuales estarían más inhibidas por acción del CB1 y no activarían a las MSN, en consecuencia, no habría control inhibitor de las dopaminérgicas del VTA, lo que facilitaría la liberación de DA asociado al consumo del alcohol, y por lo tanto aumentaría su consumo.

7.2 Experimento 2

En el experimento 2 se muestra que la privación de cuidado materno (PCM) aumenta el consumo de alcohol y la ansiedad en ratas macho. En estos experimentos se incluyó una nueva variable, la socialización (S) como condición control y el aislamiento social (AS) como condición experimental. Este estudio muestra que el aislamiento social aumenta la preferencia y el consumo de alcohol y las conductas tipo ansiedad en ratas macho. Mientras que la combinación de privación de cuidado materno más aislamiento social (PCM + AS) incrementan aún más las conductas tipo ansiedad y la preferencia y la ingesta de alcohol. Adicionalmente, los resultados muestran que todos los grupos consumieron la misma cantidad de líquido, sugiriendo que los cambios en el consumo de alcohol no se deben a cambios en el sistema homeostático sino a cambios en el sistema del reforzamiento. Como se mencionó anteriormente, hay una relación entre los niveles de ansiedad y el consumo de alcohol. En este estudio se muestra que los grupos

estresados (PCM + S, sin PCM + AS y PCM + AS) exhiben mayores niveles de ansiedad lo que pudiera estar facilitando el consumo de alcohol.

Previamente, se había discutido la importancia de las relaciones entre la madre y las crías en el desarrollo de las crías, y que las alteraciones en estas interacciones generaban cambios en regiones asociadas al control del estrés, del reforzamiento y de la respuesta al estrés. De manera similar, la privación de interacciones sociales durante la adolescencia, que son cruciales para el desarrollo cortical de los individuos (Pellis, Pellis, & Bell, 2010) pueden alterar el control del estrés y el autocontrol. Por otra parte, se ha mostrado que reforzadores sociales previenen la recaída a la autoadministración de sustancias de abuso (Venniro et al., 2018).

Nuestros datos son consistentes con datos previos que muestran que el estrés crónico durante la adolescencia facilita las conductas tipo ansiedad (Skelly et al., 2015; Yorgason et al., 2013) y estas a su vez facilitan el consumo de alcohol (Lesscher et al., 2015; McCool & Chappell, 2009; Skelly et al., 2015). Adicionalmente, nuestros resultados muestran que la combinación de privación de cuidado materno más aislamiento social aumenta aún más la ansiedad y el consumo de alcohol, lo que sugiere un efecto aditivo si el individuo experimenta crianza negligente y/o abusiva, y además sufre estrés psicosocial durante la adolescencia.

Al igual que en el experimento 1, el experimento 2 muestra que la privación de cuidado materno aumenta la expresión del receptor CB1 en el NAcc. Anteriormente, se había discutido la relación del receptor CB1 en el NAcc en el consumo de alcohol y cómo la sobreexpresión de este receptor en el NAcc estaría facilitando el consumo de alcohol en las ratas privadas de cuidado materno, de

hecho, hipotetizamos que la sobreexpresión del receptor CB1 en el NAcc estaría facilitando el escalamiento en el consumo de alcohol observado únicamente en las ratas privadas de cuidado materno. A pesar de las evidencias sobre la importancia del SeCB en la socialización (Folkes et al., 2019; Trezza et al., 2012) nuestro estudio indica que el aislamiento social no produce cambios en la expresión del receptor CB1 en el NAcc.

A pesar de que hay evidencias farmacológicas que apuntan a la participación del receptor CB2 en las propiedades reforzantes del alcohol (Al Mansouri et al., 2014), este estudio muestra que no hay cambios en la expresión del CB2 en el NAcc por la privación de cuidado materno ni por el aislamiento social.

Adicionalmente también se evaluó la expresión de los receptores dopaminérgicos D2 y D3 en el NAcc. Los datos muestran que tanto la privación de cuidado materno como el aislamiento social aumentan la expresión de estos receptores. Sin embargo, la combinación de privación de cuidado materno más aislamiento social no incrementa más la expresión de estos receptores dopaminérgicos; es posible que los genes que codifican a los receptores D2 y D3 compartan los mismos mecanismos epigenéticos y, por lo tanto, cuando ya se ha sobreexpresado el receptor, no se puede sobreexpresar más.

Los datos de este estudio están en concordancia con datos previos del laboratorio que muestran que la privación de cuidado materno aumenta la expresión del D2 en el NAcc (Romano-López et al., 2016); y con estudios previos que muestran que el aislamiento social incrementa la expresión del D2 en el NAcc (Djouma et al., 2006; Han et al., 2012). Otro estudio realizado en ratones a los cuales se les ha sobreexpresado el receptor de D2 sólo en las MSN de la vía indirecta, se

observa que presentan mayor motivación a consumir un reforzador (Gallo et al., 2018). Hipotetizamos que la privación de cuidado materno y el aislamiento social estarían sobreexpresado el receptor D2 en las MSN de la vía indirecta, y esto facilitaría la motivación por el alcohol.

Para el caso del receptor D3, se ha mostrado que la exposición a un estresor agudo aumenta la expresión del receptor D3 en el NAcc de ratas adultas (El-Khodor & Boksa, 2001); sin embargo, a la fecha no se ha mostrado el efecto de estresores crónicos en la expresión del este receptor. Hipotetizamos que esta sobreexpresión del receptor D3 en el NAcc facilita el consumo de alcohol, esto está sustentado en evidencias farmacológicas que han mostrado que la administración de un agonista al receptor D3 facilita el consumo de alcohol (Bahi & Dreyer, 2014); en contraste, el antagonismo del D3 reduce la auto-administración de alcohol (Christian A. Heidbreder et al., 2007), y la preferencia por alcohol en ratas (Thanos, Katana, et al., 2005). De igual forma, manipulaciones genéticas han mostrado que la sobreexpresión del receptor D3 en el NAcc a través de un vector viral incrementa la conducta de búsqueda por alcohol y el consumo de alcohol; en cambio, la reducción de la expresión del D3 a través de un vector viral en el NAcc reduce el consumo y la búsqueda de alcohol (Bahi & Dreyer, 2014).

En resumen, estos estudios sugieren que el estrés crónico en etapas tempranas de la vida incrementa la ansiedad, lo que facilitaría el consumo de alcohol. Además, la combinación de estresores (privación de cuidado materno más aislamiento social) incrementaría aún más la ansiedad y la ingesta de alcohol. Por otro lado, el estrés está afectando la expresión de receptores dopaminérgicos D2 y

D3 y al receptor CB1 en el NAcc, los cuales estarían facilitando el consumo de alcohol y potencialmente facilitando el desarrollo de un trastorno por consumo de alcohol.

Capítulo 8: Conclusión

Este estudio muestra que el cuidado negligente y/o abuso por parte de los cuidadores primarios más estrés psicosocial en la adolescencia (acoso, discriminación, estigmatización, etc.) modifican la expresión de algunos componentes del sistema dopaminérgico y del sistema endocannabinoide que podrían estar vulnerando al sujeto a desarrollar un trastorno de ansiedad que facilitaría el consumo de alcohol u otras sustancias de abuso y a la larga podría desarrollarse un trastorno por consumo de sustancias. Esta investigación también muestra la importancia de una buena calidad de vida en etapas importantes del desarrollo para prevenir el desarrollo de algunos trastornos psiquiátricos como trastornos por consumo de sustancias o trastorno de ansiedad.

Referencias

- Ahlenius, S., Arvid Carlsson, F. K., Engel, J., Svensson, T., & Per Sodersten, F. K. (1973). Antagonism by alpha methyltyrosine of the ethanol-induced stimulation and euphoria in man. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 14(4 PART 1), 586–591. <https://doi.org/10.1002/cpt1973144part1586>
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J., & Ramírez, M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(3), 256–266. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.12.013>
- Al Mansouri, S., Ojha, S., Al Maamari, E., Al Ameri, M., Nurulain, S. M., & Bahi, A. (2014). The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.06.025>
- Alvarez-Jaimes, L., Stouffer, D. G., & Parsons, L. H. (2009). Chronic ethanol treatment potentiates ethanol-induced increases in interstitial nucleus accumbens endocannabinoid levels in rats. *Journal of Neurochemistry*, 111(1), 37–48. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06301.x>
- Amancio-Belmont, O., Romano-López, A., Ruiz-Contreras, A. E., Méndez-Díaz, M., & Prospéro-García, O. (2017). From adolescent to elder rats: Motivation for palatable food and cannabinoids receptors. *Developmental Neurobiology*, 77(8), 917–927. <https://doi.org/10.1002/dneu.22472>
- American Psychiatric Association, 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth ed. (DSM-5)*, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th ed. TR
- Anda, R. F., Felitti, V. J., Bremner, J. D., Walker, J. D., Whitfield, C., Perry, B. D., Dube, S. R., & Giles, W. H. (2006). The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood: A convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 256(3), 174–186. <https://doi.org/10.1007/s00406-005-0624-4>
- Baarendse, P. J. J., Limpens, J. H. W., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2014). Disrupted social development enhances the motivation for cocaine in rats. *Psychopharmacology*, 231(8), 1695–1704. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3362-8>
- Baenninger, L. P. (1967). Comparison of behavioural development in socially isolated and grouped rats. *Animal Behaviour*, 15(2–3), 312–323. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(67\)90018-8](https://doi.org/10.1016/0003-3472(67)90018-8)
- Bahi, A., & Dreyer, J. L. (2012). Involvement of nucleus accumbens dopamine D1 receptors in ethanol drinking, ethanol-induced conditioned place preference, and ethanol-induced psychomotor sensitization in mice. *Psychopharmacology*, 222(1), 141–153. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2630-8>

- Bahi, A., & Dreyer, J. L. (2014). Lentiviral Vector-Mediated dopamine D3 receptor modulation in the rat brain impairs alcohol intake and ethanol-induced conditioned place preference. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(9), 2369–2376. <https://doi.org/10.1111/acer.12503>
- Bambico, F. R., Katz, N., Debonnel, G., & Gobbi, G. (2007). Cannabinoids Elicit Antidepressant-Like Behavior and Activate Serotonergic Neurons through the Medial Prefrontal Cortex. *Journal of Neuroscience*, 27(43), 11700–11711. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1636-07.2007>
- Bardo, M. T., Klebaur, J. E., Valone, J. M., & Deaton, C. (2001). Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. *Psychopharmacology*, 155(3), 278–284. <https://doi.org/10.1007/s002130100720>
- Basavarajappa, B. S., & Hungund, B. L. (1999). Chronic Ethanol Increases the Cannabinoid Receptor Agonist Anandamide and Its Precursor in SK-N-SH Cells. *PRism*, 522–528.
- Basavarajappa, B. S., Saito, M., Cooper, T. B., & Hungund, B. L. (2000). Stimulation of cannabinoid receptor agonist 2-arachidonylglycerol by chronic ethanol and its modulation by specific neuromodulators in cerebellar granule neurons. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1535(1), 78–86. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(00\)00085-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(00)00085-5)
- Basavarajappa, B. S., Saito, M., Cooper, T. B., & Hungund, B. L. (2003). Chronic ethanol inhibits the anandamide transport and increases extracellular anandamide levels in cerebellar granule neurons. *European Journal of Pharmacology*, 466(1–2), 73–83. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01557-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01557-7)
- Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A., & Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, 277(5329), 1094–1097. <https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1094>
- Bénard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenço, J., Bellocchio, L., Soria-Gómez, E., Matias, I., Delamarre, A., Metna-Laurent, M., Cannich, A., Hebert-Chatelain, E., Mülle, C., Ortega-Gutiérrez, S., Martín-Fontecha, M., Klugmann, M., Guggenhuber, S., Lutz, B., Gertsch, J., Chaouloff, F., ... Marsicano, G. (2012). Mitochondrial CB 1 receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nature Neuroscience*, 15(4), 558–564. <https://doi.org/10.1038/nn.3053>
- Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., & Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural Brain Research*, 125(1–2), 279–284. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00297-2](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00297-2)
- Benjet, C., Borges, G., & Medina-Mora, M. E. (2010). Chronic childhood adversity and onset of psychopathology during three life stages: Childhood, adolescence and

adulthood. *Journal of Psychiatric Research*, 44(11), 732–740. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.01.004>

- Bice, P. J., Liang, T., Zhang, L., Strother, W. N., & Carr, L. G. (2008). Drd2 expression in the high alcohol-preferring and low alcohol-preferring mice. *Mammalian Genome*, 19(2), 69–76. <https://doi.org/10.1007/s00335-007-9089-2>
- Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M. G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E. J., Gangadbaran, U., Hobbs, C., Di Marzo, V., & Doherty, P. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *Journal of Cell Biology*, 163(3), 463–468. <https://doi.org/10.1083/jcb.200305129>
- Blakemore, S.-J., & Choudhury, S. (2006). Development of the adolescent brain: implications for executive function and social cognition. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 47(3–4), 296–312. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2006.01611.x>
- Blankman, J. L., Simon, G. M., & Cravatt, B. F. (2007). A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Chemistry and Biology*, 14(12), 1347–1356. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.11.006>
- Boileau, I., Assaad, J. M., Pihl, R. O., Benkelfat, C., Leyton, M., Diksic, M., Tremblay, R. E., & Dagher, A. (2003). Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. *Synapse*, 49(4), 226–231. <https://doi.org/10.1002/syn.10226>
- Bonson, K. (2002). Neural Systems and Cue-Induced Cocaine Craving. *Neuropsychopharmacology*, 26(3), 376–386. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00371-2](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00371-2)
- Bossert, J. M., Stern, A. L., Theberge, F. R. M., Cifani, C., Koya, E., Hope, B. T., & Shaham, Y. (2011). Ventral medial prefrontal cortex neuronal ensembles mediate context-induced relapse to heroin. *Nature Neuroscience*, 14(4), 420–422. <https://doi.org/10.1038/nn.2758>
- Bossert, J. M., Stern, A. L., Theberge, F. R. M., Marchant, N. J., Wang, H. L., Morales, M., & Shaham, Y. (2012). Role of projections from ventral medial prefrontal cortex to nucleus accumbens shell in context-induced reinstatement of heroin seeking. *Journal of Neuroscience*, 32(14), 4982–4991. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0005-12.2012>
- Bouthenet, M. L., Souil, E., Martres, M. P., Sokoloff, P., Giros, B., & Schwartz, J. C. (1991). Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Research*, 564(2), 203–219. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91456-b](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91456-b)
- Brake, W. G., Zhang, T. Y., Diorio, J., Meaney, M. J., & Gratton, A. (2004). Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *European Journal of Neuroscience*, 19(7), 1863–1874. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03286.x>

- Brenhouse, H. C., Lukkes, J. L., & Andersen, S. L. (2013). Early life adversity alters the developmental profiles of addiction-related prefrontal cortex circuitry. *Brain Sciences*, 3(1), 143–158. <https://doi.org/10.3390/brainsci3010143>
- Britt, J. P., Benaliouad, F., McDevitt, R. A., Stuber, G. D., Wise, R. A., & Bonci, A. (2012). Synaptic and Behavioral Profile of Multiple Glutamatergic Inputs to the Nucleus Accumbens. *Neuron*, 76(4), 790–803. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.040>
- Brodie, M. S., Shefner, S. A., & Dunwiddie, T. V. (1990). Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. *Brain Research*, 508(1), 65–69. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91118-Z](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91118-Z)
- Caille, S., Alvarez-Jaimes, L., Polis, I., Stouffer, D. G., & Parsons, L. H. (2007). Specific Alterations of Extracellular Endocannabinoid Levels in the Nucleus Accumbens by Ethanol, Heroin, and Cocaine Self-Administration. *Journal of Neuroscience*, 27(14), 3695–3702. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4403-06.2007>
- Calu, D. J., Kawa, A. B., Marchant, N. J., Navarre, B. M., Henderson, M. J., Chen, B., Yau, H. J., Bossert, J. M., Schoenbaum, G., Deisseroth, K., Harvey, B. K., Hope, B. T., & Shaham, Y. (2013). Optogenetic inhibition of dorsal medial prefrontal cortex attenuates stress-induced reinstatement of palatable food seeking in female rats. *Journal of Neuroscience*, 33(1), 214–226. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2016-12.2013>
- Carlsson, A., Lindqvist, M., & Magnusson, T. (1957). November 30, 1957. I, 4710.
- Carr, D. B., & Sesack, S. R. (2000). Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: Target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 20(10), 3864–3873. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-10-03864.2000>
- Ceccarini, J., Casteels, C., Koole, M., Bormans, G., & Van Laere, K. (2013). Transient changes in the endocannabinoid system after acute and chronic ethanol exposure and abstinence in the rat: a combined PET and microdialysis study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 40(10), 1582–1594. <https://doi.org/10.1007/s00259-013-2456-1>
- Ceccarini, J., Hompes, T., Verhaeghen, A., Casteels, C., Peuskens, H., Bormans, G., Claes, S., & Van Laere, K. (2014). Changes in cerebral CB1 receptor availability after acute and chronic alcohol abuse and monitored abstinence. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(8), 2822–2831. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0849-13.2014>
- Chappell, A. M., Carter, E., McCool, B. A., & Weiner, J. L. (2013). Adolescent rearing conditions influence the relationship between initial anxiety-like behavior and ethanol drinking in male long evans rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(SUPPL.1), 394–403. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01926.x>
- Charara, A., Smith, Y., & Parent, A. (1996). Glutamatergic inputs from the pedunculo-pontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: Phaseolus vulgaris -leucoagglutinin anterograde labeling combined with postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry. *Journal of*

Comparative Neurology, 364(2), 254–266. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960108\)364:2<254::AID-CNE5>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960108)364:2<254::AID-CNE5>3.0.CO;2-4)

- Cheer, J. F., Wassum, K. M., Heien, M. L. A. V., Phillips, P. E. M., & Wightman, R. M. (2004). Cannabinoids Enhance Subsecond Dopamine Release in the Nucleus Accumbens of Awake Rats. *Journal of Neuroscience*, 24(18), 4393–4400. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0529-04.2004>
- Cheer, J. F., Wassum, K. M., Sombers, L. A., Heien, M. L. A. V., Ariansen, J. L., Aragona, B. J., Phillips, P. E. M., & Wightman, R. M. (2007). Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation. *Journal of Neuroscience*, 27(4), 791–795. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4152-06.2007>
- Chen, B. T., Yau, H. J., Hatch, C., Kusumoto-Yoshida, I., Cho, S. L., Hopf, F. W., & Bonci, A. (2013). Rescuing cocaine-induced prefrontal cortex hypoactivity prevents compulsive cocaine seeking. *Nature*, 496(7445), 359–362. <https://doi.org/10.1038/nature12024>
- Chen, L., Murad, H., Paras, M., Colbenson, K., Satler, A., Goranson, E., Elamin, M., Seime, R., Shinozaki, G., Prokop, L., & Zirakzadeh, A. (2010). Sexual abuse and lifetime diagnosis of psychiatric disorders: Systematic review and meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings*, 85(7), 618–627. <https://doi.org/10.4065/mcp.2009.0583>
- Christenson, J. G., Dairman, W., & Udenfriend, S. (1970). Preparation and properties of a homogeneous aromatic l-amino acid decarboxylase from hog kidney. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 141(1), 356–367. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90144-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90144-X)
- Christoffel, D. J., Walsh, J. J., Heifets, B. D., Hoerbelt, P., Neuner, S., Sun, G., Ravikumar, V. K., Wu, H., Halpern, C. H., & Malenka, R. C. (2021). Input-specific modulation of murine nucleus accumbens differentially regulates hedonic feeding. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22430-7>
- Coimbra, B., Soares-Cunha, C., Vasconcelos, N. A. P., Domingues, A. V., Borges, S., Sousa, N., & Rodrigues, A. J. (2019). Role of laterodorsal tegmentum projections to nucleus accumbens in reward-related behaviors. *Nature Communications*, 10(1), 4138. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11557-3>
- Colombo, G., Agabio, R., Fà, M., Guano, L., Lobina, C., Loche, A., Reali, R., & Gessa, G. L. (1998). Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol-preferring sP rats by the cannabinoid antagonist SR-141716. *Alcohol and Alcoholism*, 33(2), 126–130. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.alcalc.a008368>
- Colombo, G., Serra, S., Brunetti, G., Gomez, R., Melis, S., Vacca, G., Carai, M. A., & Gessa, G. (2002). Stimulation of voluntary ethanol intake by cannabinoid receptor agonists in ethanol-preferring sP rats. *Psychopharmacology*, 159(2), 181–187. <https://doi.org/10.1007/s002130100887>
- Cravatt, B. F., Prospero-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/10.1126/science.7770779>

- Cryan, J. F., & Holmes, A. (2005). The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*, 4(9), 775–790. <https://doi.org/10.1038/nrd1825>
- Cuesta, S., Funes, A., & Pacchioni, A. M. (2020). Social Isolation in Male Rats During Adolescence Inhibits the Wnt/ β -Catenin Pathway in the Prefrontal Cortex and Enhances Anxiety and Cocaine-Induced Plasticity in Adulthood. *Neuroscience Bulletin*, 36(6), 611–624. <https://doi.org/10.1007/s12264-020-00466-x>
- Czachowski, C. L., Chappell, A. M., & Samson, H. H. (2001). Effects of raclopride in the nucleus accumbens on ethanol seeking and consumption. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(10), 1431–1440. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2001.tb02144.x>
- Czachowski, C. L., Santini, L. A., Legg, B. H., & Samson, H. H. (2002). Separate measures of ethanol seeking and drinking in the rat: Effects of remoxipride. *Alcohol*, 28(1), 39–46. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(02\)00236-7](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(02)00236-7)
- D'Souza, M. S., Ikegami, A., Olsen, C. M., & Duvauchelle, C. L. (2003). Chronic D1 agonist and ethanol coadministration facilitate ethanol-mediated behaviors. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 76(2), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2003.08.004>
- da Silva Lopes, F. H., Arnolds, D. E. A. T., & Neijt, H. C. (1984). A functional link between the limbic cortex and ventral striatum: Physiology of the subiculum accumbens pathway. *Experimental Brain Research*, 55(2), 205–214. <https://doi.org/10.1007/BF00237271>
- Dal Toso, R., Sommer, B., Ewert, M., Herb, A., Pritchett, D. B., Bach, A., Shivers, B. D., & Seeburg, P. H. (1989). The dopamine D2 receptor: Two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO Journal*, 8(13), 4025–4034. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08585.x>
- Dalley, J. W., Cardinal, R. N., & Robbins, T. W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: Neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(7), 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.006>
- Deutch, A. Y., & Cameron, D. S. (1992). Pharmacological characterization of dopamine systems in the nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience*, 46(1), 49–56. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90007-O](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90007-O)
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34(5), 605–613.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5090), 1946–1949. <https://doi.org/10.1126/science.1470919>
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85(14), 5274–5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>

- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1986). Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens by opiates, alcohol, and barbiturates: studies with transcerebral dialysis in freely moving rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 473(1), 367–381. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb23629.x>
- Di Chiara, Gaetano, & Bassareo, V. (2007). Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.11.003>
- Di Marzo, V., Bifulco, M., & De Petrocellis, L. (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(9), 771–784. <https://doi.org/10.1038/nrd1495>
- Diaz, J., Lévesque, D., Lammers, C. H., Griffon, N., Martres, M. P., Schwartz, J. C., & Sokoloff, P. (1995). Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience*, 65(3), 731–745. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00527-c](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00527-c)
- Ding, Y., Kang, L., Li, B., & Ma, L. (2005). Enhanced cocaine self-administration in adult rats with adolescent isolation experience. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 82(4), 673–677. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.11.007>
- Djordjevic, A., Adzic, M., Djordjevic, J., & Radojicic, M. B. (2010). Chronic social isolation suppresses proplastic response and promotes proapoptotic signalling in prefrontal cortex of Wistar rats. *Journal of Neuroscience Research*, 88(11), 2524–2533. <https://doi.org/10.1002/jnr.22403>
- Djouma, E., Card, K., Lodge, D. J., & Lawrence, A. J. (2006). The CRF1 receptor antagonist, antalarmin, reverses isolation-induced up-regulation of dopamine D2 receptors in the amygdala and nucleus accumbens of fawn-hooded rats. *European Journal of Neuroscience*, 23(12), 3319–3327. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04864.x>
- Domenici, M. R., Azad, S. C., Marsicano, G., Schierloh, A., Wotjak, C. T., Dodt, H. U., Zieglgänsberger, W., Lutz, B., & Rammes, G. (2006). Cannabinoid receptor type 1 located on presynaptic terminals of principal neurons in the forebrain controls glutamatergic synaptic transmission. *Journal of Neuroscience*, 26(21), 5794–5799. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0372-06.2006>
- Dreyer, J. K., Herrik, K. F., Berg, R. W., & Hounsgaard, J. D. (2010). Influence of phasic and tonic dopamine release on receptor activation. *Journal of Neuroscience*, 30(42), 14273–14283. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1894-10.2010>
- Dronjak, S., Gavrilović, L., Filipović, D., & Radojčić, M. B. (2004). Immobilization and cold stress affect sympatho-adrenomedullary system and pituitary-adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiology and Behavior*, 81(3), 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.01.011>
- Economidou, D., Mattioli, L., Cifani, C., Perfumi, M., Massi, M., Cuomo, V., Trabace, L., & Ciccocioppo, R. (2006). Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR-

- 141716A on ethanol self-administration and ethanol-seeking behaviour in rats. *Psychopharmacology*, 183(4), 394–403. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0199-9>
- Eiden, L. E., & Weihe, E. (2011). VMAT2: A dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1216(1), 86–98. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05906.x>
- Eisenhofer, G., Kopin, I. J., & Goldstein, D. S. (2004). Catecholamine metabolism: A contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological Reviews*, 56(3), 331–349. <https://doi.org/10.1124/pr.56.3.1>
- El-Ghundi, M., George, S. R., Drago, J., Fletcher, P. J., Fan, T., Nguyen, T., Liu, C., Sibley, D. R., Westphal, H., & O'Dowd, B. F. (1998). Disruption of dopamine D1 receptor gene expression attenuates alcohol-seeking behavior. *European Journal of Pharmacology*, 353(2–3), 149–158. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00414-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00414-2)
- El-Khodor, B., & Boksa, P. (2001). Caesarean section birth produces long term changes in dopamine D1 receptors and in stress-induced regulation of D3 and D4 receptors in the rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 25(3), 423–439. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00228-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00228-7)
- Engleman, E. A., Ingraham, C. M., Rodd, Z. A., Murphy, J. M., McBride, W. J., & Ding, Z. M. (2020). The reinforcing effects of ethanol within the prelimbic cortex and ethanol drinking: Involvement of local dopamine D2 receptor-mediated neurotransmission. *Drug and Alcohol Dependence*, 214(May), 108165. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2020.108165>
- Enoch, M.-A. (2011). The role of early life stress as a predictor for alcohol and drug dependence. *Psychopharmacology*, 214(1), 17–31. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1916-6>
- Enoch, M. A., & Goldman, D. (2001). The genetics of alcoholism and alcohol abuse. *Current Psychiatry Reports*, 3(2), 144–151. <https://doi.org/10.1007/s11920-001-0012-3>
- Euston, D. R., Gruber, A. J., & McNaughton, B. L. (2012). The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. *Neuron*, 76(6), 1057–1070. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.002>
- Femenía, T., García-Gutiérrez, M. S., & Manzanares, J. (2010). CB1 receptor blockade decreases ethanol intake and associated neurochemical changes in fawn-hooded rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 34(1), 131–141. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.01074.x>
- Fezza, F., Bisogno, T., Minassi, A., Appendino, G., Mechoulam, R., & Di Marzo, V. (2002). Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: Inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. *FEBS Letters*, 513(2–3), 294–298. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02341-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02341-4)
- Floresco, S. B., West, A. R., Ash, B., Moorel, H., & Grace, A. A. (2003). Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nature Neuroscience*, 6(9), 968–973. <https://doi.org/10.1038/nn1103>

- Folkes, O. M., Báldi, R., Kondev, V., Marcus, D. J., Hartley, N. D., Turner, B. D., Ayers, J. K., Baechele, J. J., Misra, M. P., Altemus, M., Grueter, C. A., Grueter, B. A., & Patel, S. (2019). An endocannabinoid-regulated basolateral amygdala-nucleus accumbens circuit modulates sociability. *Journal of Clinical Investigation*, 130(4), 1728–1742. <https://doi.org/10.1172/jci131752>
- Francis, D. D., & Kuhar, M. J. (2008). Frequency of maternal licking and grooming correlates negatively with vulnerability to cocaine and alcohol use in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 90(3), 497–500. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.04.012>
- Fride, E. (2008). Multiple roles for the endocannabinoid system during the earliest stages of life: Pre- and oostnatal development. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(SUPPL. 1), 75–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01670.x>
- Fulford, A. J., & Marsden, C. A. (1998). Effect of isolation-rearing on conditioned dopamine release in vivo in the nucleus accumbens of the rat. *Journal of Neurochemistry*, 70(1), 384–390. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70010384.x>
- Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussosoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., LE Fur, G., & Casellas, P. (1995). Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. *European Journal of Biochemistry*, 232(1), 54–61. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x>
- Gallate, J. E., Saharov, T., Mallet, P. E., & McGregor, I. S. (1999). Increased motivation for beer in rats following administration of a cannabinoid CB1 receptor agonist. *European Journal of Pharmacology*, 370(3), 233–240. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00170-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00170-3)
- Gallistel, C. R., Shizgal, P., & Yeomans, J. S. (1981). A portrait of the substrate for self-stimulation. *Psychological Review*, 88(3), 228–273. <https://doi.org/10.1037//0033-295x.88.3.228>
- Gallo, E. F., Meszaros, J., Sherman, J. D., Chohan, M. O., Teboul, E., Choi, C. S., Moore, H., Javitch, J. A., & Kellendonk, C. (2018). Accumbens dopamine D2 receptors increase motivation by decreasing inhibitory transmission to the ventral pallidum. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03272-2>
- García-Gutiérrez, M. S., Navarrete, F., Aracil, A., Bartoll, A., Martínez-Gras, I., Lanciego, J. L., Rubio, G., & Manzanares, J. (2015). Increased vulnerability to ethanol consumption in adolescent maternal separated mice. *Addiction Biology*, 847–858. <https://doi.org/10.1111/adb.12266>
- Gardner, E. L. (2011). Addiction and brain reward and antireward pathways. *Chronic Pain and Addiction*, 30, 22–60. <https://doi.org/10.1159/000324065>
- Garrido, P., De Blas, M., Ronzoni, G., Cordero, I., Antón, M., Giné, E., Santos, A., Del Arco, A., Segovia, G., & Mora, F. (2013). Differential effects of environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: Relationship to working and emotional memories.

In *Journal of Neural Transmission* (Vol. 120, Issue 5, pp. 829–843).
<https://doi.org/10.1007/s00702-012-0935-3>

- George, O., Sanders, C., Freiling, J., Grigoryan, E., Vu, S., Allen, C. D., Crawford, E., Mandyam, C. D., & Koob, G. F. (2012). Recruitment of medial prefrontal cortex neurons during alcohol withdrawal predicts cognitive impairment and excessive alcohol drinking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(44), 18156–18161.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1116523109>
- Georges, F., & Aston-Jones, G. (2001). Potent regulation of midbrain dopamine neurons by the bed nucleus of the stria terminalis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(16), 1–6.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-16-j0003.2001>
- Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), 441–466.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>
- Gipson, C. D., Beckmann, J. S., El-Maraghi, S., Marusich, J. A., & Bardo, M. T. (2011). Effect of environmental enrichment on escalation of cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology*, 214(2), 557–566. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2060-z>
- Giuffrida, A., & Piomelli, D. (2000). The endocannabinoid system: A physiological perspective on its role in psychomotor control. *Chemistry and Physics of Lipids*, 108(1–2), 151–158. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(00\)00193-6](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(00)00193-6)
- Giuffrida, Andrea, Beltramo, M., & Piomelli, D. (2001). Mechanisms of endocannabinoid inactivation: Biochemistry and pharmacology. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(1), 7–14.
- Goeders, N., & Smith, J. (1983). Cortical dopaminergic involvement in cocaine reinforcement. *Science*, 221(4612), 773–775.
<https://doi.org/10.1126/science.6879176>
- Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2002). Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *American Journal of Psychiatry*, 159(10), 1642–1652.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.10.1642>
- Gong, J. P., Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Liu, Q. R., Tagliaferro, P. A., Brusco, A., & Uhl, G. R. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Research*, 1071(1), 10–23.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.035>
- Gopnik, A., O’Grady, S., Lucas, C. G., Griffiths, T. L., Wente, A., Bridgers, S., Aboody, R., Fung, H., & Dahl, R. E. (2017). Changes in cognitive flexibility and hypothesis search across human life history from childhood to adolescence to adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(30), 7892–7899.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1700811114>

- Grant, S., London, E. D., Newlin, D. B., Villemagne, V. L., Liu, X., Contoreggi, C., Phillips, R. L., Kimes, A. S., & Margolin, A. (1996). Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21), 12040–12045. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.12040>
- Green, J. G., McLaughlin, K. A., Berglund, P. A., Gruber, M. J., Sampson, N. A., Zaslavsky, A. M., & Kessler, R. C. (2010). Childhood Adversities and Adult Psychiatric Disorders in the National Comorbidity Survey Replication I. *Archives of General Psychiatry*, 67(2), 113. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.186>
- Grueter, B. A., Brasnjo, G., & Malenka, R. C. (2010). Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, 13(12), 1519–1526. <https://doi.org/10.1038/nn.2685>
- Grueter, B. A., Robison, A. J., Neve, R. L., Nestler, E. J., & Malenka, R. C. (2013). Δ FosB differentially modulates nucleus accumbens direct and indirect pathway function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(5), 1923–1928. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221742110>
- Gutman, D. a, & Nemeroff, C. B. (2002). Neurobiology of early life stress: rodent studies. *Seminars in Clinical Neuropsychiatry*, 7(2), 89–95. <https://doi.org/S1084361202500125> [pii]
- Hajnal, A., & Norgren, R. (2001). Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. *Brain Research*, 904(1), 76–84. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02451-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02451-9)
- Hall, F. S., Wilkinson, L. S., Humby, T., Inglis, W., Kendall, D. A., Marsden, C. A., & Robbins, T. W. (1998). Isolation rearing in rats: Pre- and postsynaptic changes in striatal dopaminergic systems. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(4), 859–872. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(97\)00510-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(97)00510-8)
- Hamlin, A. S., Clemens, K. J., & McNally, G. P. (2008). Renewal of extinguished cocaine-seeking. *Neuroscience*, 151(3), 659–670. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.11.018>
- Hammer, J. H., Parent, M. C., Spiker, D. A., & World Health Organization. (2018). Global status report on alcohol and health 2018. In *Global status report on alcohol* (Vol. 65, Issue 1). <https://doi.org/10.1037/cou0000248>
- Han, R. T., Kim, Y. B., Park, E. H., Kim, J. Y., Ryu, C., Kim, H. Y., Lee, J. H., Pahk, K., Shanyu, C., Kim, H., Back, S. K., Kim, H. J., Kim, Y. I., & Na, H. S. (2018). Long-Term Isolation Elicits Depression and Anxiety-Related Behaviors by Reducing Oxytocin-Induced GABAergic Transmission in Central Amygdala. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00246>
- Han, X., Li, N., Xue, X., Shao, F., & Wang, W. (2012). Early social isolation disrupts latent inhibition and increases dopamine D2 receptor expression in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of adult rats. *Brain Research*, 1447, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.01.058>

- Hansen, S., Harthorn, C., Wallin, E., Löfberg, L., & Svensson, K. (1991). Mesotelencephalic Dopamine System and Reproductive Behavior in the Female Rat: Effects of Ventral Tegmental 6-Hydroxydopamine Lesions on Maternal and Sexual Responsiveness. *Behavioral Neuroscience*, 105(4), 588–598. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.105.4.588>
- Hansson, A. C., Bermúdez-Silva, F. J., Malinen, H., Hyytiä, P., Sanchez-Vera, I., Rimondini, R., Rodriguez De Fonseca, F., Kunos, G., Sommer, W. H., & Heilig, M. (2007). Genetic impairment of frontocortical endocannabinoid degradation and high alcohol preference. *Neuropsychopharmacology*, 32(1), 117–126. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301034>
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., Kustanovich, I., & Mechoulam, R. (2001). 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 3662–3665. <https://doi.org/10.1073/pnas.061029898>
- Harrington, K. A., Augood, S. J., Kingsbury, A. E., Foster, O. J. F., & Emson, P. C. (1996). Dopamine transporter (DAT) and synaptic vesicle amine transporter (VMAT2) gene expression in the substantia nigra of control and Parkinson's disease. *Molecular Brain Research*, 36(1), 157–162. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00278-Z](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00278-Z)
- Hauser, S. R., Katner, S. N., Waeiss, R. A., Truitt, W. A., Bell, R. L., McBride, W. J., & Rodd, Z. A. (2020). Selective breeding for high alcohol preference is associated with increased sensitivity to cannabinoid reward within the nucleus accumbens shell. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 197(July), 173002. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.173002>
- Heidbreder, C. A., Weiss, I. C., Domeney, A. M., Pryce, C., Homberg, J., Hedou, G., Feldon, J., Moran, M. C., & Nelson, P. (2000). Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience*, 100(4), 749–768. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00336-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00336-5)
- Heidbreder, Christian A., Andreoli, M., Marcon, C., Hutcheson, D. M., Gardner, E. L., & Ashby, C. R. (2007). Evidence for the role of dopamine D3 receptors in oral operant alcohol self-administration and reinstatement of alcohol-seeking behavior in mice. *Addiction Biology*, 12(1), 35–50. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00051.x>
- Heidbreder, Christian A., & Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(6), 555–579. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.09.003>
- Heimer, L., Zahm, D. S., Churchill, L., Kalivas, P. W., & Wohltmann, C. (1991). Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*, 41(1), 89–125. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90202-y](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90202-y)
- Heinz, A., Siessmeier, T., Wrase, J., Hermann, D., Klein, S., Grüsser, S. M., Grüsser-Sinopoli, S. M., Flor, H., Braus, D. F., Buchholz, H. G., Gründer, G., Schreckenberger, M., Smolka, M. N., Rösch, F., Mann, K., & Bartenstein, P. (2004). Correlation between dopamine D(2) receptors in the ventral striatum and central

processing of alcohol cues and craving. *The American Journal of Psychiatry*, 161(10), 1783–1789. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.10.1783>

- Hensleigh, E., & Pritchard, L. M. (2014). The effect of early environmental manipulation on locomotor sensitivity and methamphetamine conditioned place preference reward. *Behavioural Brain Research*, 268, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.03.045>
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(2), 563–583. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-02-00563.1991>
- Hill, M. N., McLaughlin, R. J., Bingham, B., Shrestha, L., Lee, T. T. Y., Gray, J. M., Hillard, C. J., Gorzalka, B. B., & Viau, V. (2010). Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9406–9411. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914661107>
- Hill, M. N., McLaughlin, R. J., Pan, B., Fitzgerald, M. L., Roberts, C. J., Lee, T. T.-Y., Karatsoreos, I. N., Mackie, K., Viau, V., Pickel, V. M., McEwen, B. S., Liu, Q. -s., Gorzalka, B. B., & Hillard, C. J. (2011). Recruitment of Prefrontal Cortical Endocannabinoid Signaling by Glucocorticoids Contributes to Termination of the Stress Response. *Journal of Neuroscience*, 31(29), 10506–10515. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0496-11.2011>
- Hill, Matthew N., Eiland, L., Lee, T. T. Y., Hillard, C. J., & McEwen, B. S. (2019). Early life stress alters the developmental trajectory of corticolimbic endocannabinoid signaling in male rats. *Neuropharmacology*, 146(August 2018), 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.036>
- Hillard, C. J., Harris, R. A., & Bloom, A. S. (1985). Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: Fluorescence studies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 232(3), 579–588.
- Hines, L. A., Morley, K. I., Mackie, C., & Lynskey, M. (2015). Genetic and environmental interplay in adolescent substance use disorders. *Current Addiction Reports*, 312(24), 2668–2675. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.15298.Metformin>
- Hirvonen, J., Zanotti-Fregonara, P., Umhau, J. C., George, D. T., Rallis-Frutos, D., Lyoo, C. H., Li, C., Hines, C. S., Sun, H., Terry, G. E., Morse, C., Zoghbi, S. S., Pike, V. W., Innis, R. B., & Heilig, M. (2013). Reduced cannabinoid CB1 receptor binding in alcohol dependence measured with positron emission tomography. *Molecular Psychiatry*, 18(8), 916–921. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.100>
- Hjelmstad, G. O., Xia, Y., Margolis, E. B., & Fields, H. L. (2013). Opioid modulation of ventral pallidal afferents to ventral tegmental area neurons. *Journal of Neuroscience*, 33(15), 6454–6459. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0178-13.2013>
- Hodge, C. W., Samson, H. H., & Chappelle, A. M. (1997). Alcohol self-administration: Further examination of the role of dopamine receptors in the nucleus accumbens. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21(6), 1083–1091. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1997.tb04257.x>

- Houchi, H., Babovic, D., Pierrefiche, O., Ledent, C., Daoust, M., & Naassila, M. (2005). CB1 receptor knockout mice display reduced ethanol-induced conditioned place preference and increased striatal dopamine D2 receptors. *Neuropsychopharmacology*, 30(2), 339–349. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300568>
- Howes, S. R., Dalley, J. W., Morrison, C. H., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2000). Leftward shift in the acquisition of cocaine self-administration in isolation-reared rats: Relationship to extracellular levels of dopamine, serotonin and glutamate in the nucleus accumbens and amygdala-striatal FOS expression. *Psychopharmacology*, 151(1), 55–63. <https://doi.org/10.1007/s002130000451>
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., & 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>
- Howlett, A. C., & Fleming, R. M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Molecular Pharmacology*, 26(3), 532–538. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6092901>
- Huang, S. M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T. J., Krey, J. F., Chu, C. J., Miller, J. D., Davies, S. N., Geppetti, P., Walker, J. M., & Di Marzo, V. (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 8400–8405. <https://doi.org/10.1073/pnas.122196999>
- Hungund, B. L., Szakall, I., Adam, A., Basavarajappa, B. S., & Vadasz, C. (2003). Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Journal of Neurochemistry*, 84(4), 698–704. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01576.x>
- Huot, R. L., Gonzalez, M. E., Ladd, C. O., Thrivikraman, K. V., & Plotsky, P. M. (2004). Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology*, 29(2), 279–289. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(03\)00028-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(03)00028-3)
- Huot, R. L., Thrivikraman, K. V., Meaney, M. J., & Plotsky, P. M. (2001). Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology*, 158(4), 366–373. <https://doi.org/10.1007/s002130100701>
- Jackson, D. M., & Westlind-Danielsson, A. (1994). Dopamine receptors: Molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacology and Therapeutics*, 64(2), 291–370. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)90041-8)
- Jhou, T. C., Fields, H. L., Baxter, M. G., Saper, C. B., & Holland, P. C. (2009). The Rostromedial Tegmental Nucleus (RMTg), a GABAergic Afferent to Midbrain

Dopamine Neurons, Encodes Aversive Stimuli and Inhibits Motor Responses. *Neuron*, 61(5), 786–800. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.001>

- Jones, G. H., Hernandez, T. D., Kendall, D. A., Marsden, C. A., & Robbins, T. W. (1992). Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: Study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 43(1), 17–35. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(92\)90635-S](https://doi.org/10.1016/0091-3057(92)90635-S)
- Kampe, K. K. W., Frith, C. D., Dolan, R. J., & Frith, U. (2001). Reward value of attractiveness and gaze. *Nature*, 413(6856), 589–589. <https://doi.org/10.1038/35098149>
- Karkhanis, A. N., Alexander, N. J., Mccool, B. A., Weiner, J. L., & Jones, S. R. (2015). Chronic social isolation during adolescence augments catecholamine response to acute ethanol in the basolateral amygdala. *Synapse*, 69(8), 385–395. <https://doi.org/10.1002/syn.21826>
- Karkhanis, A. N., Locke, J. L., Mccool, B. A., Weiner, J. L., & Jones, S. R. (2014). Social isolation rearing increases nucleus accumbens dopamine and norepinephrine responses to acute ethanol in adulthood. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(11), 2770–2779. <https://doi.org/10.1111/acer.12555>
- Karkhanis, A. N., Rose, J. H., Weiner, J. L., & Jones, S. R. (2016). Early-life social isolation stress increases kappa opioid receptor responsiveness and downregulates the dopamine system. *Neuropsychopharmacology*, 41(9), 2263–2274. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.21>
- Katona, I., Sperl agh, B., S ik, A., K afalvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K., & Freund, T. F. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *Journal of Neuroscience*, 19(11), 4544–4558. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-11-04544.1999>
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., & Emson, P. C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences*, 18(12), 527–535. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)98374-8](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)98374-8)
- Kehoe, P., Shoemaker, W. J., Triano, L., Hoffman, J., & Arons, C. (1996). Repeated isolation in the neonatal rat produces alterations in behavior and ventral striatal dopamine release in the juvenile after amphetamine challenge. *Behav Neurosci*, 110(6), 1435–1444. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.110.6.1435>
- Kelley, A. E., & Domesick, V. B. (1982). The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: An anterograde and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience*, 7(10), 2321–2335. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(82\)90198-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90198-1)
- Kikusui, T., Faccidomo, S., & Miczek, K. A. (2005). Repeated maternal separation: Differences in cocaine-induced behavioral sensitization in adult male and female mice. *Psychopharmacology*, 178(2–3), 202–210. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1989-1>

- Kimura, M., & Higuchi, S. (2011). Genetics of alcohol dependence. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 65(3), 213–225. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2011.02190.x>
- Kirkham, T. C. (2009). Cannabinoids and appetite: food craving and food pleasure. *International Review of Psychiatry (Abingdon, England)*, 21(April), 163–171. <https://doi.org/10.1080/09540260902782810>
- Koepp, M. J., Gunn, R. N., Lawrence, A. D., Cunningham, V. J., Dagher, A., Jones, T., Brooks, D. J., Bench, C. J., & Grasby, P. M. (1998). Evidence for striatal dopamine release during a video game. *Nature*, 393(6682), 266–268. <https://doi.org/10.1038/30498>
- Kuhn, C. M., Pauk, J., & Schanberg, S. M. (1990). Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Developmental Psychobiology*, 23(5), 395–410. <https://doi.org/10.1002/dev.420230503>
- Kvitsiani, D., Ranade, S., Hangya, B., Taniguchi, H., Huang, J. Z., & Kepecs, A. (2013). Distinct behavioural and network correlates of two interneuron types in prefrontal cortex. *Nature*, 498(7454), 363–366. <https://doi.org/10.1038/nature12176>
- Ladd, C. O., Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (1996). Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. *Endocrinology*, 137(4), 1212–1218. <https://doi.org/10.1210/en.137.4.1212>
- Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutiérrez-Ospina, G., & Torner, L. (2012). Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 37(3), 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.07.011>
- Lallemand, F., & De Witte, P. (2006). SR147778, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, suppresses ethanol preference in chronically alcoholized Wistar rats. *Alcohol*, 39(3), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2006.08.001>
- Lambás-Señas, L., Mnie-Filali, O., Certin, V., Faure, C., Lemoine, L., Zimmer, L., & Haddjeri, N. (2009). Functional correlates for 5-HT1A receptors in maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behaviors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(2), 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.11.017>
- Lammel, S., Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., Deisseroth, K., & Malenka, R. C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*, 491(7423), 212–217. <https://doi.org/10.1038/nature11527>
- Langleben, D. D., Ruparel, K., Elman, I., Busch-Winokur, S., Pratiwadi, R., Loughhead, J., O'Brien, C. P., & Childress, A. R. (2008). Acute effect of methadone maintenance dose on brain fMRI response to heroin-related cues. *American Journal of Psychiatry*, 165(3), 390–394. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2007.07010070>
- Lapiz, M. D. S., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, R., Parker, T., & Marsden, C. A. (2003). Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 33(1), 13–29. <https://doi.org/10.1023/a:1021171129766>

- Le Moine, C., & Bloch, B. (1995). D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: Sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *Journal of Comparative Neurology*, 355(3), 418–426. <https://doi.org/10.1002/cne.903550308>
- Lee, J.-H., Kim, J. Y., & Jahng, J. W. (2014). Highly Palatable Food during Adolescence Improves Anxiety-Like Behaviors and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Dysfunction in Rats that Experienced Neonatal Maternal Separation. *Endocrinology and Metabolism*, 29(2), 169. <https://doi.org/10.3803/enm.2014.29.2.169>
- Leggio, G. M., Camillieri, G., Platania, C. B. M., Castorina, A., MARRAZZO, G., TORRISI, S. A., NONA, C. N., D'AGATA, V., NOBREGA, J., STARK, H., BUCOLO, C., LE FOLL, B., DRAGO, F., & SALOMONE, S. (2014). Dopamine D3 receptor is necessary for ethanol consumption: An approach with bupirone. *Neuropsychopharmacology*, 39(8), 2017–2028. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.51>
- Lesscher, H. M. B., Spoelder, M., Rotte, M. D., Janssen, M. J., Hesseling, P., Lozeman-Van't Klooster, J. G., Baars, A. M., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2015). Early social isolation augments alcohol consumption in rats. *Behavioural Pharmacology*, 26, 673–680. <https://doi.org/10.1097/FBP.000000000000165>
- Lewis, C. R., Bastle, R., Manning, T. B., Himes, S. M., Fennig, P., Conrad, P. R., Colwell, J., Pagni, B. A., Hess, L. A., Matekel, C. G., Newbern, J. M., & Olive, M. F. (2016). Interactions Between Early Life Stress, Nucleus Accumbens MeCP2 Expression, and Methamphetamine Self-Administration in Male Rats. *Neuropsychopharmacology*, May, 1–35. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.96>
- Lewis, C. R., Staudinger, K., Scheck, L., & Olive, F. F. (2013). The effects of maternal separation on adult methamphetamine self-administration, extinction, reinstatement, and MeCP2 immunoreactivity in the nucleus accumbens. *Frontiers in Psychiatry*, 4(JUN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00055>
- Li, M., Xue, X., Shao, S., Shao, F., & Wang, W. (2013). Cognitive, emotional and neurochemical effects of repeated maternal separation in adolescent rats. *Brain Research*, 1518, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.026>
- Linsenbardt, D. N., & Boehm, S. L. (2009). Agonism of the endocannabinoid system modulates binge-like alcohol intake in male C57BL/6J mice: involvement of the posterior ventral tegmental area. *Neuroscience*, 164(2), 424–434. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.007>
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D. D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1997). Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. *Science*, 277(5332), 1659–1662. <https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1659>
- Lobo, M. K., Zaman, S., Damez-Werno, D. M., Koo, J. W., Bagot, R. C., DiNieri, J. A., Nugent, A., Finkel, E., Chaudhury, D., Chandra, R., Riberio, E., Rabkin, J., Mouzon, E., Cachope, R., Cheer, J. F., Han, M.-H., Dietz, D. M., Self, D. W., Hurd, Y. L., ... Nestler, E. J. (2013). FosB Induction in Striatal Medium Spiny Neuron Subtypes in Response to Chronic Pharmacological, Emotional, and Optogenetic Stimuli. *Journal*

of Neuroscience, 33(47), 18381–18395. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1875-13.2013>

- Lobo, Mary Kay, Covington, H. E., Chaudhury, D., Friedman, A. K., Sun, H., Damez-Werno, D., Dietz, D. M., Zaman, S., Koo, J. W., Kennedy, P. J., Mouzon, E., Mogri, M., Neve, R. L., Deisseroth, K., Han, M.-H., & Nestler, E. J. (2010). Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6002), 385–390. <https://doi.org/10.1126/science.1188472>
- 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>
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., & Mitchell, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *Journal of Neuroscience*, 15(10), 6552–6561. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-10-06552.1995>
- Malinen, H., & Hyytiä, P. (2008). Ethanol self-administration is regulated by CB1 receptors in the nucleus accumbens and ventral tegmental area in alcohol-preferring AA rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32(11), 1976–1983. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00786.x>
- Malinen, H., Lehtonen, M., & Hyytiä, P. (2009). Modulation of brain endocannabinoid levels by voluntary alcohol consumption in alcohol-preferring AA rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(10), 1711–1720. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.01008.x>
- Malone, D. T., Kearn, C. S., Chongue, L., Mackie, K., & Taylor, D. A. (2008). Effect of social isolation on CB1 and D2 receptor and fatty acid amide hydrolase expression in rats. *Neuroscience*, 152(1), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.043>
- Marco, E. M., Valero, M., De La Serna, O., Aisa, B., Borcel, E., Ramirez, M. J., & Viveros, M. P. (2013). Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. *Neuropharmacology*, 68, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.08.014>
- Maresz, K., Carrier, E. J., Ponomarev, E. D., Hillard, C. J., & Dittel, B. N. (2005). Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *Journal of Neurochemistry*, 95(2), 437–445. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03380.x>
- Marsicano, G., & Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *The European Journal of Neuroscience*, 11(12), 4213–4225. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00847.x>
- Marzo, V. Di, & Matias, I. (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. 8(5), 585–589. <https://doi.org/10.1038/nn1457>

- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561–564. <https://doi.org/10.1038/346561a0>
- Matthews, K., Dalley, J. W., Matthews, C., Tsai, T. H., & Robbins, T. W. (2001). Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain. *Synapse*, 40(1), 1–10. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(200104\)40:1<1::AID-SYN1020>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1098-2396(200104)40:1<1::AID-SYN1020>3.0.CO;2-E)
- McBride, W. J., Chernet, E., Dyr, W., Lumeng, L., & Li, T. K. (1993). Densities of dopamine D2 receptors are reduced in CNS regions of alcohol-preferring P rats. *Alcohol*, 10(5), 387–390. [https://doi.org/10.1016/0741-8329\(93\)90025-J](https://doi.org/10.1016/0741-8329(93)90025-J)
- McCool, B. A., & Chappell, A. M. (2009). Early social isolation in male long-evans rats alters both appetitive and consummatory behaviors expressed during operant ethanol self-administration. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(2), 273–282. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00830.x>
- Mcdonald, A. J. (1991). Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience*, 44(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90247-L](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90247-L)
- 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>
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R., Pertwee, R. G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., & Vogel, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50(1), 83–90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-D](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-D)
- Méndez-Díaz, M., Amancio-Belmont, O., Estrada-González, V., Ruiz-Contreras, A. E., & Prospéro-García, O. (2019). CB1R mediates oleamide's reward while 5HT2cR mediates aversion in the nucleus accumbens shell of rats. *Neuroscience Letters*, 706(May), 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.05.033>
- Méndez-Díaz, M., Contreras, A. E. R., Gómez, B. P., Romano, A., Caynas, S., & García, O. P. (2010). El cerebro y las drogas, sus mecanismos neurobiológicos. *Salud Mental*, 33(5), 451–456.
- Mengod, G., Vilaró, M. T., Niznik, H. B., Sunahara, R. K., Seeman, P., O'Dowd, B. F., & Palacios, J. M. (1991). Visualization of a dopamine D1 receptor mRNA in human and rat brain. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 10(2), 185–191. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(91\)90110-j](https://doi.org/10.1016/0169-328x(91)90110-j)
- Menon, V., & Levitin, D. J. (2005). The rewards of music listening: Response and physiological connectivity of the mesolimbic system. *NeuroImage*, 28(1), 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.05.053>

- Merriner, J. L. E. (2009). Reward Processing by the Opioid System in the Brain. 1379–1412. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2009>.
- Missale, C., Russel Nash, S., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*, 78(1), 189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
- Moffett, M. C., Harley, J., Francis, D., Sanghani, S. P., Davis, W. I., & Kuhar, M. J. (2006). Maternal separation and handling affects cocaine self-administration in both the treated pups as adults and the dams. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), 1210–1218. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.101139>
- Monroy, E., Hernández-Torres, E., & Flores, G. (2010). Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 40(2), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.05.005>
- Montagu, K. A. (1957). Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals [11]. *Nature*, 180(4579), 244–245. <https://doi.org/10.1038/180244a0>
- Montaron, M. F., Deniau, J. M., Menetrey, A., Glowinski, J., & Thierry, A. M. (1996). Prefrontal cortex inputs of the nucleus accumbens-nigro-thalamic circuit. *Neuroscience*, 71(2), 371–382. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00455-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00455-6)
- Morales-Mulia, M., Estrada-Camarena, E., Amaya, M. I., Mejía-Mauries, S., Sollozo-Dupont, I., Mengod, G., & De Gortari, P. (2012). Anxiolytic effects of ethanol are partially related to a reduced expression of adenylyl cyclase 5 but not to μ -opioid receptor activation in rat nucleus accumbens. *Behavioural Brain Research*, 235(2), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.036>
- Moreira, F. A., & Lutz, B. (2008). The endocannabinoid system: Emotion, learning and addiction. *Addiction Biology*, 13(2), 196–212. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2008.00104.x>
- Muñiz, I. nacional de psiquiatría R. F. (2017). Encodat_Alcohol_2016_2017. Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco, ENCODAT 2016-2017, 1, 190.
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61–65. <https://doi.org/10.1038/365061a0>
- Murillo-Rodríguez, E., Giordano, M., Cabeza, R., Henriksen, S. J., Méndez Díaz, M., Navarro, L., & Prospéro-García, O. (2001). Oleamide modulates memory in rats. *Neuroscience Letters*, 313(1–2), 61–64. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02256-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02256-X)
- Navarrete, F., Rodríguez-Arias, M., Martín-García, E., Navarro, D., García-Gutiérrez, M. S., Aguilar, M. A., Aracil-Fernández, A., Berbel, P., Miñarro, J., Maldonado, R., & Manzanares, J. (2013). Role of CB2 cannabinoid receptors in the rewarding, reinforcing, and physical effects of nicotine. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(12), 2515–2524. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.157>

- National Research Council, 2010. Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research. The National Academies, Washington DC.
- Nephew, B., & Murgatroyd, C. (2013). The role of maternal care in shaping CNS function. *Neuropeptides*, 47(6), 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.10.013>
- Neto, L. L., Oliveira, E., Correia, F., & Ferreira, A. G. (2008). The human nucleus accumbens: where is it? A stereotactic, anatomical and magnetic resonance imaging study. *Neuromodulation: Journal of the International Neuromodulation Society*, 11(1), 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1403.2007.00138.x>
- Nieh, E. H., Vander Weele, C. M., Matthews, G. A., Presbrey, K. N., Wichmann, R., Leppla, C. A., Izadmehr, E. M., & Tye, K. M. (2016). Inhibitory Input from the Lateral Hypothalamus to the Ventral Tegmental Area Disinhibits Dopamine Neurons and Promotes Behavioral Activation. *Neuron*, 90(6), 1286–1298. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.035>
- Norman, R. E., Byambaa, M., De, R., Butchart, A., Scott, J., & Vos, T. (2012). The Long-Term Health Consequences of Child Physical Abuse, Emotional Abuse, and Neglect: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Medicine*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001349>
- Nowak, K. L., McBride, W. J., Lumeng, L., Li, T. K., & Murphy, J. M. (2000). Involvement of dopamine D2 autoreceptors in the ventral tegmental area on alcohol and saccharin intake of the alcohol-preferring P rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24(4), 476–483. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2000.tb02014.x>
- Olds, J., & Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47, 419–427. <https://doi.org/10.1037/h0058775>
- Omelchenico, N., & Sesack, S. R. (2005). Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. *Journal of Comparative Neurology*, 483(2), 217–235. <https://doi.org/10.1002/cne.20417>
- Omelchenko, N., & Sesack, S. R. (2006). Cholinergic axons in the rat ventral tegmental area synapse preferentially onto mesoaccumbens dopamine neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 494(6), 863–875. <https://doi.org/10.1002/cne.20852>
- Omelchenko, N., & Sesack, S. R. (2010). Periaqueductal gray afferents synapse onto dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience Research*, 88(5), 981–991. <https://doi.org/10.1002/jnr.22265>
- Ortega-Álvaro, A., Ternianov, A., Aracil-Fernández, A., Navarrete, F., García-Gutiérrez, M. S., & Manzanares, J. (2015). Role of cannabinoid CB2 receptor in the reinforcing actions of ethanol. *Addiction Biology*, 20(1), 43–55. <https://doi.org/10.1111/adb.12076>
- Pandey, R., Mousawy, K., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. (2009). Endocannabinoids and immune regulation☆. *Pharmacological Research*, 60(2), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.03.019>

- Pandey, S. C., Zhang, H., Roy, A., & Xu, T. (2005). Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. *Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2762–2773. <https://doi.org/10.1172/JCI24381>
- Panksepp, J. (1981). The ontogeny of play in rats. *Developmental Psychobiology*, 14(4), 327–332. <https://doi.org/10.1002/dev.420140405>
- Pappata, S., Dehaene, S., Poline, J. B., Gregoire, M. C., Jobert, A., Delforge, J., Frouin, V., Bottlaender, M., Dolle, F., Di Giambardino, L., & Syrota, A. (2002). In Vivo detection of striatal dopamine release during reward: A PET study with [¹¹C]raclopride and a single dynamic scan approach. *NeuroImage*, 16(4), 1015–1027. <https://doi.org/10.1006/nimg.2002.1121>
- Parker, V., & Morinan, A. (1986). The socially-isolated rat as a model for anxiety. *Neuropharmacology*, 25(6), 663–664. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(86\)90224-8](https://doi.org/10.1016/0028-3908(86)90224-8)
- Paulsen, R. T., & Burrell, B. D. (2019). Comparative studies of endocannabinoid modulation of pain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1785). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0279>
- Pellis, S. M., Pellis, V. C., & Bell, H. C. (2010). The function of play in the development of the social brain. *American Journal of Play*, 2(3), 278–296. <https://mail.google.com/mail/u/1/>
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Peñasco, S., Mela, V., López-Moreno, J. A., Viveros, M. P., & Marco, E. M. (2015). Early maternal deprivation enhances voluntary alcohol intake induced by exposure to stressful events later in life. *Neural Plasticity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/342761>
- Perra, S., Pillolla, G., Melis, M., Muntoni, A. L., Gessa, G. L., & Pistis, M. (2005). Involvement of the endogenous cannabinoid system in the effects of alcohol in the mesolimbic reward circuit: Electrophysiological evidence in vivo. *Psychopharmacology*, 183(3), 368–377. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0195-0>
- Pertwee, R G, Howlett, a C., Abood, M. E., Alexander, S. P. H., Marzo, V. Di, Elphick, M. R., Greasley, P. J., Hansen, H. S., & 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>
- Pertwee, Roger G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 74(2), 129–180. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(97\)82001-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(97)82001-3)
- Peters, J., Pattij, T., & De Vries, T. J. (2013). Targeting cocaine versus heroin memories: Divergent roles within ventromedial prefrontal cortex. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(12), 689–695. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.10.004>

- Phillips, A. G., & Fibiger, H. C. (1978). The role of dopamine in maintaining intracranial self-stimulation in the ventral tegmentum, nucleus accumbens, and medial prefrontal cortex. *Canadian Journal of Psychology*, 32(2), 58–66. <https://doi.org/10.1037/h0081676>
- Phillips, T. J., Brown, K. J., Burkhart-Kasch, S., Wenger, C. D., Kelly, M. A., Rubinstein, M., Grandy, D. K., & Low, M. J. (1998). Alcohol preference and sensitivity are markedly reduced in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature Neuroscience*, 1(7), 610–615. <https://doi.org/10.1038/2843>
- Phillipson, O. T., & Griffiths, A. C. (1985). The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience*, 16(2), 275–296. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(85\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(85)90002-8)
- Pina, M. M., & Cunningham, C. L. (2014). Effects of dopamine receptor antagonists on the acquisition of ethanol-induced conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology*, 231(3), 459–468. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3252-0>
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(11), 873–884. <https://doi.org/10.1038/nrn1247>
- Pistis, M., Muntoni, A. L., Pillolla, G., & Gessa, G. L. (2002). Cannabinoids inhibit excitatory inputs to neurons in the shell of the nucleus accumbens: An in vivo electrophysiological study. *European Journal of Neuroscience*, 15(11), 1795–1802. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02019.x>
- Ploj, K., Roman, E., & Nylander, I. (2003). Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male wistar rats. *Neuroscience*, 121(3), 787–799. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00499-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00499-8)
- Ploj, Karolina, Roman, E., & Nylander, I. (2003). Long-term effects of short and long periods of maternal separation on brain opioid peptide levels in male Wistar rats. *Neuropeptides*, 37(3), 149–156. [https://doi.org/10.1016/S0143-4179\(03\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S0143-4179(03)00043-X)
- Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research*, 18(3), 195–200. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(93\)90189-V](https://doi.org/10.1016/0169-328X(93)90189-V)
- Plotsky, P. M., Thivikraman, K. V, Nemeroff, C. B., Caldji, C., Sharma, S., & Meaney, M. J. (2005). Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(12), 2192–2204. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300769>
- Porter, A. C., Sauer, J. M., Knierman, M. D., Becker, G. W., Berna, M. J., Bao, J., Nomikos, G. G., Carter, P., Bymaster, F. P., Leese, A. B., & Felder, C. C. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3), 1020–1024. <https://doi.org/10.1124/jpet.301.3.1020>
- Portero-Tresserra, M., Gracia-Rubio, I., Cantacorps, L., Pozo, O. J., Gómez-Gómez, A., Pastor, A., López-Arnau, R., de la Torre, R., & Valverde, O. (2018). Maternal

separation increases alcohol-drinking behaviour and reduces endocannabinoid levels in the mouse striatum and prefrontal cortex. *European Neuropsychopharmacology*, 28(4), 499–512. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.02.003>

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>

Pryce, C. R., & Feldon, J. (2003). Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: Manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(1–2), 57–71. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00009-5)

Qi, J., Zhang, S., Wang, H. L., Barker, D. J., Miranda-Barrientos, J., & Morales, M. (2016). VTA glutamatergic inputs to nucleus accumbens drive aversion by acting on GABAergic interneurons. *Nature Neuroscience*, 19(5), 725–733. <https://doi.org/10.1038/nn.4281>

Qi, J., Zhang, S., Wang, H. L., Wang, H., De Jesus Aceves Buendia, J., Hoffman, A. F., Lupica, C. R., Seal, R. P., & Morales, M. (2014). A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons. *Nature Communications*, 5(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms6390>

Raz, S., & Berger, B. D. (2010). Social isolation increases morphine intake: Behavioral and psychopharmacological aspects. *Behavioural Pharmacology*, 21(1), 39–46. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32833470bd>

Rentesi, G., Antoniou, K., Marselos, M., Fotopoulos, A., Alboycharali, J., & Konstandi, M. (2010). Long-term consequences of early maternal deprivation in serotonergic activity and HPA function in adult rat. *Neuroscience Letters*, 480(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.04.054>

Rentesi, G., Antoniou, K., Marselos, M., Syrrou, M., Papadopoulou-Daifoti, Z., & Konstandi, M. (2013). Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behavioural Brain Research*, 244, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.040>

Reyes Prieto, N. M., Romano López, A., Pérez Morales, M., Pech, O., Méndez-Díaz, M., Ruiz Contreras, A. E., & Prospéro-García, O. (2012). Oleamide restores sleep in adult rats that were subjected to maternal separation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(2), 308–312. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.08.028>

Rice, O. V., Schonhar, C. A., Gaál, J., Gardner, E. L., & Ashby, C. R. (2015). The selective dopamine D3 receptor antagonist SB-277011-A significantly decreases binge-like consumption of ethanol in C57BL/J6 mice. In *Synapse* (Vol. 69, Issue 6, pp. 295–298). <https://doi.org/10.1002/syn.21816>

Risinger, F. O., Freeman, P. A., Rubinstein, M., Low, M. J., & Grandy, D. K. (2000). Lack of operant ethanol self-administration in dopamine D2 receptor knockout mice. *Psychopharmacology*, 152(3), 343–350. <https://doi.org/10.1007/s002130000548>

- Robbe, D., Alonso, G., Duchamp, F., Bockaert, J., & Manzoni, O. J. (2001). Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 21(1), 109–116. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-01-00109.2001>
- Romano-López, A., Méndez-Díaz, M., Ruiz-Contreras, A. E., Carrisoza, R., & Prospéro-García, O. (2012). Maternal separation and proclivity for ethanol intake: a potential role of the endocannabinoid system in rats. *Neuroscience*, 223, 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.071>
- Romano-López, Antonio, Méndez-Díaz, M., García, F. G., Regalado-Santiago, C., Ruiz-Contreras, A. E., & Prospéro-García, O. (2016). Maternal separation and early stress cause long-lasting effects on dopaminergic and endocannabinergic systems and alters dendritic morphology in the nucleus accumbens and frontal cortex in rats. *Developmental Neurobiology*, 76(8), 819–831. <https://doi.org/10.1002/dneu.22361>
- Routtenberg, A., Gardner, E. L., & Huang, Y. H. (1971). Self-stimulation pathways in the monkey, *Macaca mulatta*. *Experimental Neurology*, 33(1), 213–224. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(71\)90115-4](https://doi.org/10.1016/0014-4886(71)90115-4)
- Routtenberg, A., & Sloan, M. (1972). Self-stimulation in the frontal cortex of *rattus norvegicus*. *Behavioral Biology*, 7(4), 567–572. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(72\)80218-9](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(72)80218-9)
- Rubino, T., Realini, N., Castiglioni, C., Guidali, C., Viganó, D., Marras, E., Petrosino, S., Perletti, G., Maccarrone, M., Di Marzo, V., & Parolaro, D. (2008). Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 18(6), 1292–1301. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm161>
- Sagheddu, C., Muntoni, A. L., Pistis, M., & Melis, M. (2015). Endocannabinoid Signaling in Motivation, Reward, and Addiction: Influences on Mesocorticolimbic Dopamine Function. In *International Review of Neurobiology* (1st ed., Vol. 125). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.10.004>
- SAMHSA. (2019). Key substance use and mental health indicators in the United States: Results from the 2018 National Survey on Drug Use and Health. HHS Publication No. PEP19-5068, NSDUH Series H-54, 170, 51–58. <https://www.samhsa.gov/data/>
- Schenk, S., Lacelle, G., Gorman, K., & Amit, Z. (1987). Cocaine self-administration in rats influenced by environmental conditions: implications for the etiology of drug abuse. *Neuroscience Letters*, 81(1–2), 227–231. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)91003-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)91003-2)
- Schultz, W. (1997). Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(2), 191–197. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(97\)80007-4](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80007-4)
- Sciolino, N. R., Bortolato, M., Eisenstein, S. A., Fu, J., Oveisi, F., Hohmann, A. G., & Piomelli, D. (2010). Social isolation and chronic handling alter endocannabinoid signaling and behavioral reactivity to context in adult rats. *Neuroscience*, 168(2), 371–386. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.04.007>

- Shin, S. Y., Baek, N. J., Han, S. H., & Min, S. S. (2019). Chronic administration of ketamine ameliorates the anxiety- and aggressive-like behavior in adolescent mice induced by neonatal maternal separation. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 23(1), 81–87. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2019.23.1.81>
- Silvestre, J. S., O'Neill, M. F., Fernández, A. G., & Palacios, J. M. (1996). Effects of a range of dopamine receptor agonists and antagonists on ethanol intake in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 318(2–3), 257–265. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(96\)00821-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(96)00821-7)
- Skelly, M. J., Chappell, A. E., Carter, E., & Weiner, J. L. (2015). Adolescent social isolation increases anxiety-like behavior and ethanol intake and impairs fear extinction in adulthood: Possible role of disrupted noradrenergic signaling. *Neuropharmacology*, 97, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.025>
- Smirnov, M. S., & Kiyatkin, E. A. (2008). Behavioral and temperature effects of delta 9-tetrahydrocannabinol in human-relevant doses in rats. *Brain Research*, 1228, 145–160. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.06.069>
- Smith, A. S., Birnie, A. K., & French, J. A. (2011). Social isolation affects partner-directed social behavior and cortisol during pair formation in marmosets, *Callithrix geoffroyi*. *Physiology and Behavior*, 104(5), 955–961. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.06.014>
- Smith, T. E., & French, J. A. (1997). Psychosocial stress and urinary cortisol excretion in marmoset monkeys (*Callithrix kuhli*). *Physiology and Behavior*, 62(2), 225–232. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00103-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00103-0)
- Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M. P., Bouthenet, M. L., & Schwartz, J. C. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature*, 347(6289), 146–151. <https://doi.org/10.1038/347146a0>
- Solinas, M., Tanda, G., Justinova, Z., Wertheim, C. E., Yasar, S., Piomelli, D., Vadvivel, S. K., Makriyannis, A., & Goldberg, S. R. (2007). The endogenous cannabinoid anandamide produces δ -9-tetrahydrocannabinol-like discriminative and neurochemical effects that are enhanced by inhibition of fatty acid amide hydrolase but not by inhibition of anandamide transport. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321(1), 370–380. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.114124>
- Spear, L. P. (2000). Neurobehavioral Changes in Adolescence. *Current Directions in Psychological Science*, 9(4), 111–114. <https://doi.org/10.1111/1467-8721.00072>
- Stefanik, M. T., Moussawi, K., Kupchik, Y. M., Smith, K. C., Miller, R. L., Huff, M. L., Deisseroth, K., Kalivas, P. W., & Lalumiere, R. T. (2013). Optogenetic inhibition of cocaine seeking in rats. *Addiction Biology*, 18(1), 50–53. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2012.00479.x>
- Stefanini, E., Frau, M., Garau, M. G., Garau, B., Fadda, F., & Gessa, G. L. (1992). Alcohol-preferring rats have fewer dopamine D2 receptors in the limbic system. *Alcohol*, 27(2), 127–130. <http://alcalc.oxfordjournals.org/content/alcalc/27/2/127.full.pdf>

- Stella, N., Schweitzer, P., & Plomelli, D. (1997). A second endogenous' cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388(6644), 773–778. <https://doi.org/10.1038/42015>
- Stratford, T. R., & Kelley, A. E. (1999). Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control oil feeding behavior. *Journal of Neuroscience*, 19(24), 11040–11048. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-24-11040.1999>
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., & Waku, K. (1995). 2-arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 215, Issue 1, pp. 89–97). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437>
- Sunahara, R. K., Guan, H. C., O'Dowd, B. F., Seeman, P., Laurier, L. G., Ng, G., George, S. R., Torchia, J., Van Tol, H. H. M., & Niznik, H. B. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*, 350(6319), 614–619. <https://doi.org/10.1038/350614a0>
- Tan, K. R., Yvon, C., Turiault, M., Mirzabekov, J. J., Doehner, J., Labouèbe, G., Deisseroth, K., Tye, K. M., & Lüscher, C. (2012). GABA Neurons of the VTA Drive Conditioned Place Aversion. *Neuron*, 73(6), 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.015>
- Teicher, M. H., Andersen, S. L., Polcari, A., Anderson, C. M., Navalta, C. P., & Kim, D. M. (2003). The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(1–2), 33–44. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00007-1)
- Teicher, M. H., Samson, J. A., Anderson, C. M., & Ohashi, K. (2016). The effects of childhood maltreatment on brain structure, function and connectivity. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(10), 652–666. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.111>
- Thanos, P. K., Dimitrakakis, E. S., Rice, O., Gifford, A., & Volkow, N. D. (2005). Ethanol self-administration and ethanol conditioned place preference are reduced in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Behavioural Brain Research*, 164(2), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.021>
- Thanos, P. K., Katana, J. M., Ashby, C. R., Michaelides, M., Gardner, E. L., Heidbreder, C. A., & Volkow, N. D. (2005). The selective dopamine D3 receptor antagonist SB-277011-A attenuates ethanol consumption in ethanol preferring (P) and non-preferring (NP) rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(1), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.03.013>
- Thanos, P. K., Rivera, S. N., Weaver, K., Grandy, D. K., Rubinstein, M., Umegaki, H., Wang, G. J., Hitzemann, R., & Volkow, N. D. (2005). Dopamine D2R DNA transfer in dopamine D2 receptor-deficient mice: Effects on ethanol drinking. *Life Sciences*, 77(2), 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.061>
- Thanos, P. K., Roushdy, K., Sarwar, Z., Rice, O., Ashby, C. R., & Grandy, D. K. (2015). The effect of dopamine D4 receptor density on novelty seeking, activity, social

interaction, and alcohol binge drinking in adult mice. *Synapse*, 69(7), 356–364. <https://doi.org/10.1002/syn.21822>

Thanos, P. K., Taintor, N. B., Rivera, S. N., Umegaki, H., Ikari, H., Roth, G., Ingram, D. K., Hitzemann, R., Fowler, J. S., Gatley, S. J., Wang, G. J., & Volkow, N. D. (2004). DRD2 gene transfer into the nucleus accumbens core of the alcohol preferring and nonpreferring rats attenuates alcohol drinking. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 28(5), 720–728. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000125270.30501.08>

Thanos, P. K., Volkow, N. D., Freimuth, P., Umegaki, H., Ikari, H., Roth, G., Ingram, D. K., & Hitzemann, R. (2001). Overexpression of dopamine D2 receptors reduces alcohol self-administration. *Journal of Neurochemistry*, 78(5), 1094–1103. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00492.x>

Trezza, V., Damsteegt, R., Manduca, A., Petrosino, S., Van Kerkhof, L. W., Pasterkamp, R. J., Zhou, Y., Campolongo, P., Cuomo, V., Di Marzo, V., & Vanderschuren, L. J. (2012). Endocannabinoids in amygdala and nucleus accumbens mediate social play reward in adolescent rats. *J Neurosci*, 32(43), 14899–14908. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0114-12.2012>

Tritsch, N. X., & Sabatini, B. L. (2012). Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum. *Neuron*, 76(1), 33–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.023>

Turner, B. D., Rook, J. M., Lindsley, C. W., Conn, P. J., & Grueter, B. A. (2018). mGlu1 and mGlu5 modulate distinct excitatory inputs to the nucleus accumbens shell. *Neuropsychopharmacology*, 43(10), 2075–2082. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0049-1>

Tzschentke, T. M. (2000). The medial prefrontal cortex as a part of the brain reward system. *Amino Acids*, 19(1), 211–219. <https://doi.org/10.1007/s007260070051>

Ueda, N. (2002). Endocannabinoid hydrolases. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 68–69, 521–534. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00053-9)

Ueda, N., Yamanaka, K., Terasawa, Y., & Yamamoto, S. (1999). An acid amidase hydrolyzing anandamide as an endogenous ligand for cannabinoid receptors. *FEBS Letters*, 454(3), 267–270. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00820-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00820-0)

Van den Oever, M. C., Spijker, S., Smit, A. B., & De Vries, T. J. (2010). Prefrontal cortex plasticity mechanisms in drug seeking and relapse. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(2), 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.11.016>

Van Tol, H. H. M., Bunzow, J. R., Guan, H. C., Sunahara, R. K., Seeman, P., Niznik, H. B., & Civelli, O. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350(6319), 610–614. <https://doi.org/10.1038/350610a0>

Van Zessen, R., Phillips, J. L., Budygin, E. A., & Stuber, G. D. (2012). Activation of VTA GABA Neurons Disrupts Reward Consumption. *Neuron*, 73(6), 1184–1194. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.016>

- Vazquez, V. (2005). Maternal Deprivation Increases Vulnerability to Morphine Dependence and Disturbs the Enkephalinergic System in Adulthood. *Journal of Neuroscience*, 25(18), 4453–4462. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4807-04.2005>
- Vazquez, Vincent, Giros, B., & Daugé, V. (2006). Maternal deprivation specifically enhances vulnerability to opiate dependence. *Behavioural Pharmacology*, 17(8), 715–724. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3280116e6f>
- Venniro, M., Zhang, M., Caprioli, D., Hoots, J. K., Golden, S. A., Heins, C., Morales, M., Epstein, D. H., & Shaham, Y. (2018). Volitional social interaction prevents drug addiction in rat models. *Nature Neuroscience*, 21(11), 1520–1529. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0246-6>
- Venton, B. J., Zhang, H., Garris, P. A., Phillips, P. E. M., Sulzer, D., & Wightman, R. M. (2003). Real-time decoding of dopamine concentration changes in the caudate-putamen during tonic and phasic firing. *Journal of Neurochemistry*, 87(5), 1284–1295. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02109.x>
- Vinod, K. Y., MacCioni, P., Garcia-Gutierrez, M. S., Femenia, T., Xie, S., Carai, M. A. M., Manzanares, J., Cooper, T. B., Hungund, B. L., & Colombo, G. (2012). Innate difference in the endocannabinoid signaling and its modulation by alcohol consumption in alcohol-preferring sP rats. *Addiction Biology*, 17(1), 62–75. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00299.x>
- Vinod, K. Y., Yalamanchili, R., Thanos, P. K., Vadasz, C., Cooper, T. B., Volkow, N. D., & Hungund, B. L. (2008). Genetic and pharmacological manipulations of the CB1 receptor alter ethanol preference and dependence in ethanol preferring and nonpreferring mice. *Synapse*, 62(8), 574–581. <https://doi.org/10.1002/syn.20533>
- Vinod, K. Y., Yalamanchili, R., Xie, S., Cooper, T. B., & Hungund, B. L. (2006). Effect of chronic ethanol exposure and its withdrawal on the endocannabinoid system. *Neurochemistry International*, 49(6), 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.05.002>
- Volkow, N. D., & Morales, M. (2015). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, 162(4), 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046>
- Volkow, N. D., Wang, G., Begleiter, H., Porjesz, B., Fowler, J. S., Telang, F., Wong, C., Ma, Y., Logan, J., Goldstein, R., Alexoff, D., & Thanos, P. K. (2006). High Levels of Dopamine D 2 Receptors in Unaffected Members of Alcoholic Families. *Arch. Gen. Psychiatry*, 63(Sep.), 999–1008.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Logan, J., Hitzemann, R., Ding, Y. S., Pappas, N., Shea, C., & Piscani, K. (1996). Decreases in dopamine receptors but not in dopamine transporters in alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 20(9), 1594–1598. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1996.tb05936.x>
- Weiss, F., Lorang, M. T., Bloom, F. E., & Koob, G. F. (1993). Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 267(1), 250–258. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229752>

- Whitaker, L. R., Degoulet, M., & Morikawa, H. (2013). Social Deprivation Enhances VTA Synaptic Plasticity and Drug-Induced Contextual Learning. *Neuron*, 77(2), 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.022>
- WHO. (2009). Global Health Risks. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf
- Xi, Z.-X., Peng, X.-Q., Li, X., Song, R., Zhang, H.-Y., Liu, Q.-R., Yang, H.-J., Bi, G.-H., Li, J., & Gardner, E. L. (2011). Brain cannabinoid CB(2) receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nature Neuroscience*, 14(9), 1160–1166. <https://doi.org/10.1038/nn.2874>
- Yang, Hongbin, de Jong, J. W., Tak, Y., Peck, J., Bateup, H. S., & Lammel, S. (2018). Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. *Neuron*, 97(2), 434-449.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.022>
- Yang, Hongyu, Spence, J. S., Briggs, R. W., Rao, U., North, C., Devous, M. D., Xiao, H., & Adinoff, B. (2015). Interaction between early life stress and alcohol dependence on neural stress reactivity. *Addiction Biology*, 20(3), 523–533. <https://doi.org/10.1111/adb.12135>
- Yorgason, J. T., Calipari, E. S., Ferris, M. J., Karkhanis, A. N., Fordahl, S. C., Weiner, J. L., & Jones, S. R. (2016). Social isolation rearing increases dopamine uptake and psychostimulant potency in the striatum. *Neuropharmacology*, 101(1), 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.025>
- Yorgason, J. T., España, R. A., Konstantopoulos, J. K., Weiner, J. L., & Jones, S. R. (2013). Enduring increases in anxiety-like behavior and rapid nucleus accumbens dopamine signaling in socially isolated rats. *European Journal of Neuroscience*, 37(6), 1022–1031. <https://doi.org/10.1111/ejn.12113>
- Young, E. A., Dreumont, S. E., & Cunningham, C. L. (2014). Role of nucleus accumbens dopamine receptor subtypes in the learning and expression of alcohol-seeking behavior. *Neurobiology of Learning and Memory*, 108, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.05.004>
- Zakharova, E., Miller, J., Unterwald, E., Wade, D., & Izenwasser, S. (2009). Social and physical environment alter cocaine conditioned place preference and dopaminergic markers in adolescent male rats. *Neuroscience*, 163(3), 890–897. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.06.068>
- Zhang, X. Y., Sanchez, H., Kehoe, P., & Kosten, T. A. (2005). Neonatal isolation enhances maintenance but not reinstatement of cocaine self-administration in adult male rats. *Psychopharmacology*, 177(4), 391–399. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1963-y>
- Zhou, Q. Y., Grandy, D. K., Thambi, L., Kushner, J. A., Van Tol, H. H., Cone, R., Pribnow, D., Salon, J., Bunzow, J. R., & Civelli, O. (1990). Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature*, 347(6288), 76–80. <https://doi.org/10.1038/347076a0>