



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

***El polimorfismo del gen CNR1 y su relación con  
la memoria de trabajo***

***Maribel Delgado Herrera***

Directora de tesis:  
**Dra. Alejandra E. Ruiz Contreras**

Revisor de tesis:  
**Dr. Oscar Próspero García**

México, D.F.

Agosto, 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

*A los ausentes...*

*mi padre, Francisco Delgado*

*y mi abuelo, Celedonio Herrera*

*que por sus enseñanzas mis noches son a color*

*Este proyecto de investigación fue apoyado por DGAPA-UNAM PAPIIT IN209808*

*a la Dra. Alejandra E. Ruiz Contreras.*

*Quiero agradecer a...*

*-DGAPA-UNAM PAPIIT IN209808 por el apoyo de una beca Tesis*

*-la Dra. Alejandra Ruiz*

*...Porque para poder abrir el tercer ojo, antes debes abrir los dos*

*-la Química Bacterióloga Parasitóloga Karol Carrillo Sánchez*

*...Porque quien sabe enseñar sabe vivir*

*-todos mis compañeros del laboratorio de Neurogenómica Cognitiva, especialmente a Gerardo Soria*

*...Porque para que la vainilla te sepa, debes estar acompañado*

# ÍNDICE

Resumen.....	1
<b>1.</b> Introducción.....	3
<b>2.</b> Antecedentes.....	4
<b>2.1</b> Sistema endocannabinoide.....	4
<b>2.1.1</b> Los endocannabinoides.....	4
<b>2.1.2</b> El receptor CB1.....	7
<b>2.2</b> Efectos del $\Delta$ 9-THC en la atención y la memoria .....	12
<b>2.2.1</b> Estudios con humanos.....	12
<b>2.2.2</b> Estudios con ratas.....	17
<b>2.3</b> Memoria de trabajo.....	19
<b>2.3.1</b> Modelo de Memoria de trabajo de Baddeley y Hitch.....	19
<b>2.3.2</b> ¿Cómo medir a la Memoria de Trabajo? .....	23
<b>2.3.2.1</b> Paradigma <i>N Back</i> verbal.....	26
<b>2.3.2.2</b> Paradigma <i>N Back</i> espacial.....	32
<b>2.3.2.3</b> Similitudes y diferencias entre <i>N Back</i> espacial y verbal.....	33
<b>2.4</b> ¿Qué explica la eficiencia de las personas en su capacidad de memoria de trabajo?.....	35
<b>2.4.1</b> Contribución genética.....	37
<b>3.</b> Planteamiento del problema.....	44
<b>4.</b> Pregunta de investigación.....	45
<b>5.</b> Hipótesis.....	45
<b>6.</b> Método.....	46
<b>6.1</b> Participantes.....	46
<b>6.2</b> Instrumentos.....	46
<b>6.3</b> Materiales y Aparatos.....	49
<b>6.4</b> Procedimiento.....	49
<b>6.5</b> Análisis genético.....	55
<b>6.6</b> Análisis de datos.....	63
<b>7.</b> Resultados.....	65
<b>8.</b> Discusión.....	74
<b>9.</b> Conclusión.....	80
<b>10.</b> Referencias.....	81

## RESUMEN

La memoria de trabajo es una función cognitiva indispensable para la vigilia. La red neuronal que subyace a la memoria de trabajo involucra la participación de varios neurotransmisores y neuromoduladores. Uno de ellos es el sistema endocannabinoide. Los endocannabinoides ejercen su función a través del receptor CB1, que es codificado por el gen CNR1. Johnson et al. (1997) mostraron que el polimorfismo AATn del gen CNR1 modula diferencialmente la atención en sujetos adictos. El objetivo de la presente investigación fue conocer la asociación del polimorfismo AATn del gen CNR1 con la capacidad de memoria de trabajo en jóvenes neurológica y psiquiátricamente sanos. Participaron 94 jóvenes quienes donaron una muestra de ADN y resolvieron una tarea de memoria de trabajo (*N back*) en dos versiones, espacial y verbal, con tres niveles de dificultad ( $N=0, 2$  y  $3$ ). Se midieron los tiempos de reacción y se calculó la Tasa de Aciertos Ajustada (TAA; Abi-Dargham et al., 2002). Se clasificó a la muestra en cuatro grupos en función de su genotipo de acuerdo al número de repetidos AAT: Genotipo 1 ( $14/\leq 11$ ,  $n=12$ ), Genotipo 2 ( $14/ > 11$ ,  $n=37$ ), Genotipo 3 ( $\leq 11/10-13$ ,  $n=24$ ) y Genotipo 4 ( $> 11/ > 11$ ,  $n=21$ ). Se encontró una asociación del Genotipo con el puntaje obtenido en la TAA en la tarea *N back* espacial. El Genotipo 1 fue significativamente menos eficiente comparado con los Genotipos 2 y 3. No se encontraron diferencias significativas en los tiempos de reacción ni se observaron resultados significativos para la tarea *N back* verbal. Esta investigación es la primera en describir una asociación del polimorfismo AATn del gen CNR1 con la diferente eficiencia con la que se ejecuta una tarea que evalúa a la memoria de trabajo espacial en jóvenes sanos. Si bien aún no está descrita la función de este polimorfismo, es probable que su efecto actúe sobre la transcripción, afectando así la expresión del receptor CB1 en áreas implicadas en la memoria de trabajo espacial.





# 1. INTRODUCCIÓN

Una de las funciones cognitivas más utilizada en la vida de los seres humanos es la memoria; sin embargo, no todos nos desempeñamos igual en esta capacidad. La memoria nos permite revivir el pasado, interpretar el presente y planificar el futuro. Sin memoria seríamos incapaces de aprender o pensar, no podríamos expresar nuestras ideas, ni siquiera podríamos tener una identidad personal. Para su estudio, la memoria se ha clasificado en varios subtipos. Uno de ellos, la denominada memoria de trabajo, es fundamental para realizar cualquier actividad que llevamos a cabo en la vigilia, ya que se encarga de manipular la información que estamos recibiendo en un preciso momento, manteniéndola a nuestro alcance por algún tiempo y también comparándola con información que ya poseíamos. Este tipo de memoria nos permite mantener y manipular la información a fin de alcanzar un objetivo (p. ej., mantener una conversación). Aunque todas las personas poseemos esta capacidad, la ejecución de ella varía entre individuos. Las razones de esta variabilidad son poco claras. Sin embargo, dado que los procesos de memoria involucran conexiones específicas entre diversas áreas cerebrales así como la mediación de diversas sustancias químicas es posible que los sistemas de neurotransmisión y neuromodulación pudiesen estar involucrados. En la actualidad, se ha documentado la asociación de variaciones genéticas con variaciones fenotípicas entre individuos, incluyendo funciones cognitivas como la memoria. De esta forma, sería probable que la variabilidad de la memoria entre individuos resultara, al menos en parte, asociada con la expresión de ciertas variantes genotípicas de, por ejemplo, receptores para neurotransmisores y neuromodulares que participan en el proceso de memoria. Así, el objetivo de la presente investigación fue el de evaluar la asociación entre el polimorfismo del gen CNR1 y las diferencias en la capacidad de memoria de trabajo que poseen las personas. Este gen codifica para el receptor a cannabinoides 1 (CB1) y forma parte del sistema endocanabinoide. Sistema que regula procesos como la ingestión de alimento, la conducta sexual y, muy importantemente, la memoria.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Sistema Endocannabinoide**

El descubrimiento de los receptores sobre los cuales el principal componente activo de la *Cannabis sativa* (marihuana), el  $\Delta$ 9-tetrahidrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC), ejerce sus efectos neurobiológicos permitió el descubrimiento de los ligando endógenos conocidos como cannabinoides. Este sistema endógeno funciona como neuromodulador de varios sistemas de neurotransmisión (Bisogno, Ligresti & Di Marzo, 2005), está ampliamente distribuido en el cerebro y recibe el nombre de sistema endocannabinoide.

Matsuda, Lolait, Brownstein, Young & Bonner (1990) clonaron el primer receptor cerebral para los cannabinoides, el CB1. Posteriormente, Munro, Thomas & Abu-Shaar (1993) caracterizaron y clonaron un segundo tipo del receptor a cannabinoides, el CB2. Y en la actualidad se sugiere la existencia de un tercer receptor (Ranganathan & D'Souza, 2006). Hasta la fecha se han descrito diversos endocannabinoides, como por ejemplo, la anandamida (araquidonil-etanolamida), el 2-AG, la oleamida, la N-palmitoil-etanolamida (PEA, inhibe la expresión de la Hidrolasa de los Ácidos Grasos Amidados, FAAH, por sus siglas en inglés, *fatty amino acid hydrolase*), la N-oleoil-etanolamida (OEA), el 2-araquidonil-glicerol-éter (éter noladín), el O-araquidonil-etanolamina (virodhamina), y la N-araquidonil-dopamina (NADA; Méndez-Díaz et al., 2008; Bisogno et al., 2005). A continuación se detallará cómo están compuestos los endocannabinoides y evidencias conductuales de sus efectos sobre funciones cognitivas.

#### **2.1.1 Los Endocannabinoides**

Los endocannabinoides son moléculas lipídicas derivadas de ácidos grasos poliinsaturados como las amidas y los ésteres de los eicosanoides (Ameri, 1999). Funcionan como neuromoduladores de diversos sistemas de neurotransmisión, en el sentido de que modulan la liberación de algunos neurotransmisores (ver el apartado, *2.1.2 El receptor CB1; Transducción de señales del CB1*). Los endocannabinoides

presentan algunas similitudes pero también algunas diferencias con los neurotransmisores. Por ejemplo, la liberación de ambos es parecida, debido a que es estimulada por la despolarización de la membrana y la entrada de calcio al interior de la neurona (Di Marzo & Deutsch, 1998). Sin embargo, existen diferencias en su almacenamiento, los endocannabinoides no han sido localizados en vesículas sinápticas (como los neurotransmisores), ya que debido a su naturaleza lipídica traspasarían rápidamente las membranas vesiculares; sino más bien, se generan a partir de sus precursores (fosfolípidos de membrana) y son liberados "a demanda" cuándo y dónde son necesarios (Di Marzo & Deutsch, 1998). Además, se les considera mensajeros retrógrados porque se sintetizan y se liberan de la postsinapsis y ejercen su acción en la presinapsis (Ameri, 1999).

El primer endocannabinoide que se caracterizó fue la anandamida en 1992, a partir de cerebro de cerdo (Devane et al., 1992). Su nombre se compone de la palabra sánscrita *Ananda*, que significa "portadora de felicidad interior y tranquilidad" y *amida*, que se refiere a la naturaleza química del compuesto (Ameri, 1999). La anandamida se deriva del ácido araquidónico unido a una etanolamina (Méndez-Díaz et al., 2008). La anandamida se aisló y se cuantificó en diversos tejidos *post-mortem* de humanos y ratas encontrándose una amplia distribución en el cerebro y en la periferia (citado en Ameri, 1999). En el cerebro de ambas especies, los más altos niveles de anandamida se encontraron en zonas con alta densidad de receptores a cannabinoides, como el hipocampo, el estriado, el cerebelo y la corteza cerebral (Ameri, 1999). También se ha encontrado en la periferia, en ratas la anandamida está presente en el bazo, donde hay altos niveles del receptor CB2, y en piel. Mientras que en humanos se ha descrito en el corazón y en plasma (Ameri, 1999).

Murillo-Rodríguez et al. (1998) administraron intracerebroventricularmente anandamida (3.6 *nmoles*) a ratas sanas para conocer sus efectos en el ciclo sueño-vigilia y en la memoria a corto (15 minutos) y a largo plazo (24 horas). La memoria se evaluó a través del paradigma de evitación pasiva. Los autores encontraron que la anandamida indujo un aumento en el sueño de ondas lentas en fase 2 y en el sueño de movimientos

oculares rápidos en comparación con ratas controles. Asimismo, la anandamida deterioró la memoria a largo plazo pero no la memoria a corto plazo. Los autores concluyeron que la anandamida participa en la regulación del ciclo sueño-vigilia y de la memoria.

Posteriormente, se caracterizó otro cannabinoide endógeno: el 2-AG. El cual está formado por ácido araquidónico unido por un enlace éster a glicerol. El 2-AG fue aislado inicialmente en intestino de perro, y posteriormente, en bazo y páncreas (Mechoulam et al., 1995). Más tarde fue identificado en cerebro, donde alcanza concentraciones más altas que las de anandamida; así mismo, posee una actividad agonista más potente para el receptor CB1 que la anandamida (Méndez-Díaz et al., 2008; Bisogno et al., 2005). La distribución del 2-AG en cerebro adulto de rata presenta las máximas concentraciones en el tallo cerebral, el estriado y el hipocampo, y las más bajas en corteza, diencéfalo y cerebelo (Bisogno et al, 1999). Es importante mencionar que los endocannabinoides no siempre presentan el mismo patrón de distribución en el cerebro que los receptores CB1 (Bisogno et al., 1999). Por ejemplo, existen regiones como la médula espinal y el tallo cerebral donde hay niveles relativamente altos de endocannabinoides y una baja densidad de receptores CB1; o regiones como el cerebelo, donde la densidad de receptores es alta, pero los niveles de endocannabinoides son bajos. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la existencia de algún endocannabinoide todavía no caracterizado, con diferencias en la eficacia de la activación de los receptores según regiones (Bisogno et al., 1999) o probablemente con las variaciones diurnas de expresión entre los ligandos y los receptores (Murillo-Rodríguez, Désarnaud & Prospéro-García, 2006).

En 1995 otro endocannabinoide fue aislado, esta vez en el fluido cerebroespinal de gatos, la oleamida (Cravatt et al., 1995). Su ácido graso es el ácido oleico. La particularidad del descubrimiento de esta amida fue que se encontró en el líquido cerebroespinal de gatos privados de sueño (Cravatt et al., 1995). Herrera-Solís et al. (2010) mostraron que la administración intracerebroventricular crónica de oleamida

(durante 15 días) aumentó el sueño de movimientos oculares rápidos en ratas normales.

Hasta ahora se han descrito a los ligandos endógenos del sistema endocannabinoide, es decir, aquellas sustancias que se fabrican en el organismo y que de manera natural se unen al receptor. Así mismo, se ha evidenciado que participan en procesos fundamentales para los seres vivos, como es la memoria y el ciclo sueño-vigilia. Sin embargo, es importante mencionar que también existen cannabinoides exógenos. Ejemplos de ellos se encuentran en la planta de marihuana. Además, una vez que se conoció la estructura del receptor CB1 se empezaron a diseñar una serie de agonistas y antagonistas que sirvieron para conocer mejor la transducción de señales de estos receptores y las funciones que desempeñan los cannabinoides. Así, se ha descrito que entre los efectos que provocan los cannabinoides están la analgesia, hipomotilidad, hipotermia (Guzmán, 2003), estimulación del apetito y deficiencias en funciones cognitivas, principalmente en la atención y en la memoria (Hashimotodani et al., 2007). Los datos descritos acerca de estos tres endocannabinoide nos aportan evidencia de la gran importancia que poseen

A continuación se describirá el receptor CB1, cómo es su transducción de señales y cómo está distribuido en el cerebro. Debido a que el receptor CB1 es una variable experimental de la presente investigación, es que nos centramos en él, restringiendo la información y discusión del receptor CB2.

### **2.1.2 El receptor CB1**

Desde que se describieron los receptores a cannabinoides se encontraron en diversas especies, en mamíferos, aves, peces y reptiles (Méndez-Díaz et al., 2008). Su preservación a lo largo de la evolución manifiesta la importancia básica que poseen estos receptores en la fisiología de algunos organismos (Méndez-Díaz et al., 2008).

Ambos receptores, CB1 y CB2, son receptores metabotrópicos acoplados a una proteína G inhibidora (Gi; Hashimotodani, Ohno-shosaku & Kano, 2007). Se considera que el receptor CB1 se expresa primordialmente en el sistema nervioso central, mientras

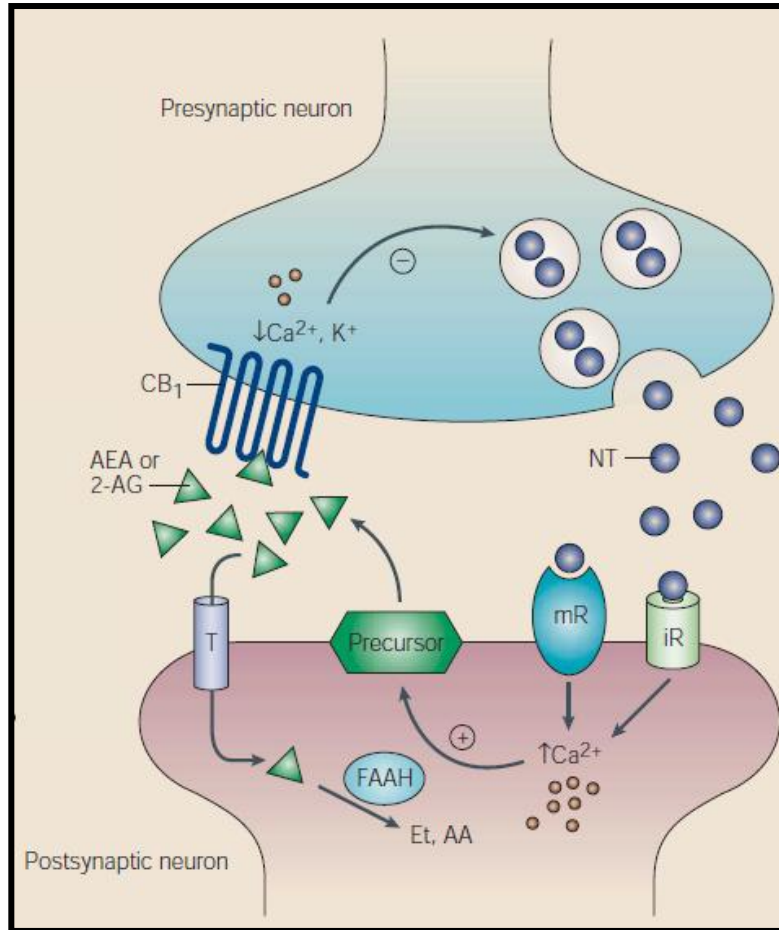
que el receptor CB2 se expresa principalmente en el sistema inmunológico (Svíženská et al., 2008; Méndez-Díaz et al., 2008). El receptor CB1 se encuentra predominantemente en las terminales presinápticas (glutamatérgicas y GABAérgicas, Méndez-Díaz et al., 2008) encontrándose escasamente en las terminales postsinápticas y en la glía (Svíženská et al., 2008).

### *Transducción de señales del receptor CB1*

Se ha descrito que cuando los cannabinoides (endógenos o exógenos) activan al receptor CB1, la proteína  $G_i$  inhibe la actividad de la adenilato ciclasa y, consecuentemente, disminuye la producción de Adenosin Monofosfato cíclico (AMPC, Devane et al., 1988); esto impide la activación de la proteína cinasa A (PKA) y, por lo tanto, no ocurre la fosforilación de los canales de  $K^+$  tipo A. La proteína  $G_i$  también activa a los canales de  $K^+$  rectificadores de corriente y a la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK; Ameri, 1999). Adicionalmente, también la proteína  $G_i$  inhibe a los canales de  $Ca^{++}$  dependientes de voltaje y el bloqueo de la entrada de  $Ca^{++}$  a la neurona en la terminal presináptica (Twichell, Brown & Mackie, 1997). En general, estos mecanismos producen una disminución de la probabilidad de liberación del neurotransmisor, como por ejemplo de glutamato, dopamina, GABA y acetilcolina (Méndez-Díaz et al., 2008; Egerton, Allison, Brett & Pratt, 2006, *figura 1.*). En este contexto, se ha propuesto que los endocannabinoides funcionan como neuromoduladores, debido a que actúan reduciendo la liberación de ciertos neurotransmisores durante periodos de estimulación intensa (Egerton et al., 2006).

También, los cannabinoides pueden activar a la fosfolipasa A2 que conduce a la liberación de ácido araquidónico y probablemente también a la formación de 2-AG (Wartmann, Campbell, Subramaniam, Burstein & Davis, 1995). Este ácido graso puede ser utilizado para la formación de diversos eicosanoides, como las prostaglandinas y los leucotrienos (Wartmann et al., 1995). Los eicosanoides son sustancias que producen

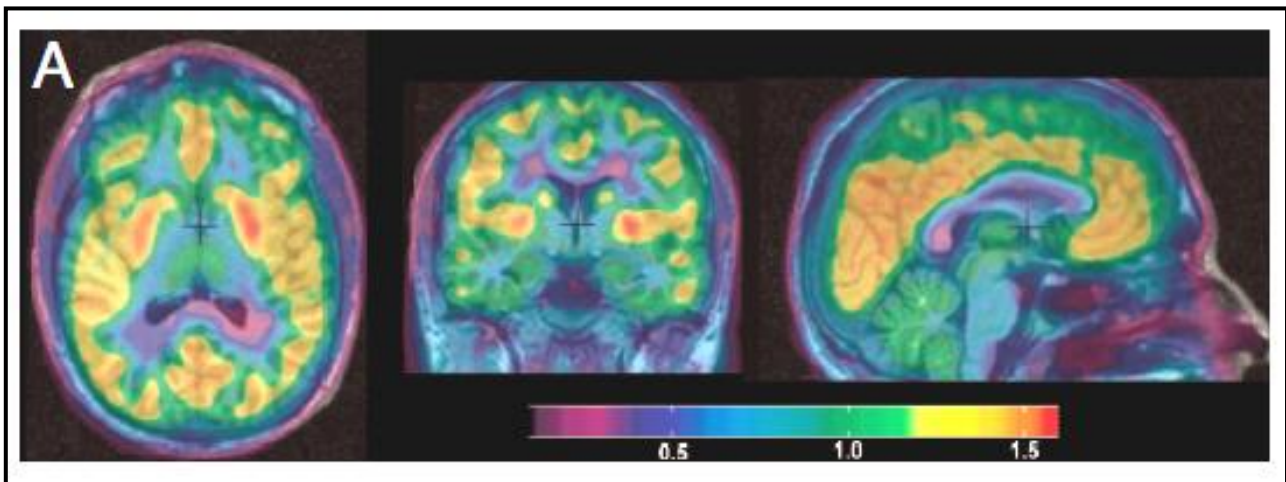
diversos efectos sobre el organismo. Entre ellos se encuentra el aumento del ritmo cardiaco, la alteración en la percepción del tiempo, y el "high" subjetivo que aparece en humanos tras el consumo de *cannabis* (citado en Wartmann et al., 1995).



**Figura 1.** En la figura se muestra la neuromodulación que ejercen los endocannabinoides sobre los sistemas de neurotransmisión. En la membrana postsináptica se sintetizan los precursores para la formación de endocannabinoides cuando hay un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, por ejemplo, después de que el neurotransmisor (NT) se pegó a sus receptores, ya sean metabotrópicos (mR) o inotrópicos (iR). Una vez formados los endocannabinoides (por ejemplo, anandamida –AEA– o 2-AG) son liberados hacia la presinapsis, actuando así, como mensajeros retrógrados. El receptor  $\text{CB}_1$  localizado en la presinápsis recibe a los endocannabinoides provocando esta unión la inhibición de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y de los canales de  $\text{K}^+$ . Esta despolarización de la membrana provoca una disminución de la probabilidad de liberación del neurotransmisor, como por ejemplo de glutamato o dopamina, afectando así, algunas funciones cognitivas como la memoria, el aprendizaje o el movimiento, según sea el caso. La regulación neuromoduladora de los endocannabinoides termina cuando son degradados por la enzima **FAAH**, o bien, podría terminar por un sistema de recaptura mediante un transportador (T) específico. Tomada de Guzmán, 2003, página 747.

### Distribución del receptor CB1

El receptor CB1 se encuentra extensamente distribuido en el sistema nervioso central, tanto de ratas como de humanos. Su concentración es más abundante en la corteza frontal, estriado, cerebelo, hipocampo y en regiones del cerebro medio: sustancia negra y área tegmental ventral (Egertova & Elphick, 2000; Pattij, Wiskerke & Schoffelmeer, 2008; Burns et al., 2007, *figura 2*).



**Figura 2.** La imagen muestra un registro de Tomografía por emisión de Positrones (PET, por sus siglas en inglés) en el que se observa el pegado del agonista [ $^{18}\text{F}$ ] MK-9470 al receptor CB1 en tres diferentes cortes de cerebro humano (horizontal, coronal y sagital). La gama de colores nos indica qué tanto se pegó el marcador [ $^{18}\text{F}$ ] MK-9470 al receptor, lo que indicaría la cantidad de CB1 expresado en esa zona. Los colores cálidos indican la máxima presencia del receptor y los fríos la mínima. Se describieron tres tipos de expresión, alta, media y baja. En el corte horizontal y coronal se observa la mayor expresión del receptor CB1 en el estriado, la corteza frontal y el cíngulo posterior; mientras que en la vista sagital se observa una expresión intermedia en el cerebelo y la menor expresión de CB1 se observa en el tálamo e hipocampo. Tomada de Burns et al., 2007, página 9802.

Svíženská et al. (2008) llevaron a cabo una revisión de artículos que describen la distribución del receptor CB1 en las diferentes estructuras del sistema nervioso central (Tabla 1); realizaron una clasificación de las estructuras según la intensidad en que en ellas se expresa el receptor (de manera arbitraria dividieron la densidad en alta, moderada y baja).



**Tabla 1.** Estructuras del sistema nervioso central de los mamíferos clasificadas según la intensidad en que se expresa el receptor CB<sub>1</sub> (densidad alta, densidad moderada y densidad baja). Transcrita de Svíženská et al. (2008), página 504.

DENSIDAD	LOCALIZACIÓN
<b>ALTA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Capas II, III y IV de la corteza somatosensorial</li> <li>-Capa II de la corteza cingulada</li> <li>-Capas II y IV de la corteza entorrinal</li> <li>-Capa III de la corteza piriforme</li> <li>-Regiones corticales de asociación del lóbulo frontal</li> <li>-Hipocampo:               <ul style="list-style-type: none"> <li>-Capa molecular del giro dentado</li> <li>-Campos del cuerno de Ammón CA<sub>1</sub>, CA<sub>2</sub> y CA<sub>3</sub></li> </ul> </li> <li>-Globo pálido interno</li> <li>-Núcleo caudado y putamen</li> <li>-Sustancia negra</li> <li>-Sustancia gris periacueductal</li> <li>-Capa molecular del cerebelo</li> <li>-Cuerno dorsal y lámina X de la médula espinal</li> </ul>
<b>MODERADA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Capa V de la corteza somatosensorial</li> <li>-Corteza de asociación temporal</li> <li>-Corteza somatosensorial secundaria</li> <li>-Corteza motora</li> <li>-Corteza visual y auditiva</li> <li>-Capa polimórfica de la superficie dentada en el hipocampo</li> <li>-Segmentos exteriores del globo pálido y de la estría terminalis</li> <li>-Núcleos intralaminares del tálamo</li> <li>-Núcleo lateral y paraventricular del hipotálamo</li> <li>-Núcleo del tracto solitario</li> </ul>
<b>BAJA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Corteza motora primaria</li> <li>-Corteza somatosensorial</li> <li>-Corteza visual y auditiva</li> <li>-Capa de células granuladas de la circunvolución dentada</li> <li>-Núcleo accumbens</li> <li>-Núcleo subtalámico</li> <li>-Área tegmental ventral</li> </ul>

La abundante expresión del receptor CB<sub>1</sub> en áreas involucradas en la memoria, la evidencia de que modula la liberación de otros neurotransmisores implicados también en la memoria y los hallazgos encontrados con usuarios de marihuana respecto a que su

uso afecta la memoria de trabajo (Ranganathan & D'Souza, 2006), la atención, tanto selectiva como sostenida y la flexibilidad mental (Pattij et al., 2008) me hace pensar que este sistema podría estar involucrado en la variabilidad de la capacidad de memoria que se manifiesta entre las personas. A continuación se detallarán algunas evidencias de los efectos del  $\Delta 9$ -THC sobre la memoria y la atención, tanto en humanos como en ratas.

## **2.2 Efectos del $\Delta 9$ -THC en la atención y la memoria**

### **2.2.1 Estudios con humanos**

D'Souza et al. (2004) realizaron una investigación con 22 individuos sanos, los cuales habían consumido *cannabis* alguna vez en su vida, sin embargo, nunca habían sido diagnosticados con un trastorno de abuso de esta sustancia. Evaluaron diversos efectos conductuales antes y después de 10, 80 y 200 minutos. Así mismo, evaluaron efectos cognitivos 30 minutos después de la administración de 0.0 (vehículo), 2.5 y 5.0 mg de  $\Delta 9$ -THC por vía intravenosa. Los datos conductuales se obtuvieron a través de un cuestionario que evalúa los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia (*Positive and Negative Symptom Scale*, PANSS) y de una escala de alteraciones perceptuales (*Clinician Administered Dissociative Symptoms Scale*, CADSS). Las tareas cognitivas evaluaron a la atención sostenida (el alertamiento y la distracción hacia estímulos visuales, *Continuous Performance Task*, CPT) y a la memoria de trabajo (*Delayed Match to Sample task*, esta tarea se realizó en dos versiones, una fácil y otra difícil). En los cuestionarios, se encontró que el  $\Delta 9$ -THC provoca, a los diez minutos posteriores de la administración de las dos dosis en comparación con el vehículo, síntomas similares a los que se presentan en la esquizofrenia (positivos: desconfianza, paranoia, delirios de grandeza, desorganización conceptual, percepción sensorial distorsionada, percepción corporal alterada, sentimientos de irrealidad, extrema desaceleración del tiempo e ilusiones; y negativos: afecto aplanado, comportamiento antisocial, falta de espontaneidad, retraso psicomotor y aislamiento emocional). Estos síntomas disminuyeron conforme pasaba el tiempo; a los 200 minutos después de la administración ya no existían diferencias entre los sujetos del grupo experimental y del

grupo control. Así mismo, en la escala de alteraciones preceptuales se encontró un aumento en la ansiedad y síntomas de percepción alterada (distorsión de la percepción del tiempo, sentimientos de irrealidad y percepción corporal alterada) a los diez minutos después de la administración de ambas dosis igualmente llegando a la basal a los 200 minutos. En la tarea de memoria de trabajo, el  $\Delta 9$ -THC redujo significativamente el número de respuestas correctas en la tarea fácil de manera dosis dependiente, sin incrementar el tiempo de reacción. Sin embargo, el  $\Delta 9$ -THC no redujo el número de respuestas correctas en la tarea difícil y tampoco hubo una diferencia en los tiempos de reacción. Mientras que en la tarea de atención sostenida se encontró un efecto significativo del  $\Delta 9$ -THC sobre la distracción, también a manera dosis dependiente, pero no sobre el alertamiento. Estos autores concluyeron que la memoria de trabajo y la atención se deterioraron significativamente después del consumo de  $\Delta 9$ -THC.

Por otro lado, Ilan et al. (2004) estudiaron los efectos electrofisiológicos del  $\Delta 9$ -THC sobre la memoria de trabajo espacial en usuarios casuales de marihuana medidos en una condición placebo y otra bajo la administración de cigarros con marihuana. En este estudio, usuarios casuales se definió como aquellos sujetos que reportaron fumar marihuana cuando menos una vez cada mes hasta una vez por semana a lo largo del último año. Los sujetos se evaluaron antes de fumar (línea base) y después de fumar un cigarro de marihuana con un contenido de 3.45% de  $\Delta 9$ -THC o un cigarro placebo con un contenido de 0.006% de  $\Delta 9$ -THC. La memoria de trabajo espacial se midió con la tarea *N back* (ver página 51), a través de dos niveles de complejidad (fácil y difícil). Se encontró que el  $\Delta 9$ -THC, en comparación con la condición placebo, disminuyó el porcentaje de respuestas correctas sólo en la condición difícil de la tarea *N back*. El tiempo de reacción aumentó después de fumar marihuana en ambas complejidades, sin embargo, no hubo diferencias entre los dos niveles de complejidad.

En cuanto a los resultados electrofisiológicos, Ilan et al. (2004) encontraron que la administración de  $\Delta 9$ -THC disminuyó la amplitud de diversos componentes de los

potenciales relacionados a eventos (PREs<sup>1</sup>). Específicamente, se encontró que el  $\Delta 9$ -THC disminuyó la amplitud de los componentes N100, P200 y P300 durante la tarea de memoria de trabajo, con respecto a la condición placebo. Estos resultados sugieren que la marihuana genera que las personas obtengan menos respuestas correctas y sean más lentas para contestar una tarea de memoria de trabajo. Además, demuestran que en el cerebro, bajo el efecto agudo de  $\Delta 9$ -THC, disminuye la amplitud de componentes asociados a la capacidad de atención y a la codificación de la información en la memoria de trabajo.

Kanayama et al. (2004) evaluaron la actividad cerebral (medida indirectamente a través del consumo de oxígeno hecho por las células cerebrales) registrada por Imágenes de Resonancia Magnética funcional (IRMf) de 10 sujetos controles y de 12 consumidores fuertes de cannabis. Los evaluaron mientras realizaban una tarea de memoria de trabajo espacial llamada paradigma de *Sternberg* entre 6 y 36 horas después de que reportaron su último consumo. Estos sujetos debieron haber fumado al menos 5000 veces en toda su vida, y al momento de llevar a cabo el experimento fumaban por lo menos siete veces por semana. Por otro lado, no sufrían de abuso o dependencia del alcohol (medido a través del DSM-IV) ni habían consumido algún otro tipo de droga ilícita más de 100 veces en toda su vida. La media de veces que consumieron cannabis fue de 19,200 veces en toda su vida, con un rango de 5,100 a 54,000 veces. Se encontró que los consumidores de *cannabis* fueron igualmente de eficientes que los controles; sin embargo, presentaron un aumento en la activación de regiones del cerebro que normalmente son utilizadas en tareas de memoria de trabajo espacial en comparación con personas controles. Estas regiones cerebrales fueron: los giros frontales inferiores y superiores unilateralmente, el giro frontal medial de manera

---

<sup>1</sup> Los PREs son una técnica electrofisiológica en donde se registran, colocando electrodos sobre el cuero cabelludo o intracorticalmente, los cambios de voltaje concomitantes a un estímulo o evento, p. ej., un tono o una imagen (Núñez-Peña, Corral & Escera, 2004). Los PREs se obtienen promediando varias épocas registradas en un electroencefalograma mientras se presenta un mismo estímulo o categorías de estímulos (Núñez-Peña et al., 2004). Los PREs se nominan de acuerdo a sus características de polaridad y latencia (Núñez-Peña et al., 2004). En cuanto a la polaridad, los componentes pueden ser positivos o negativos, en función de hacia dónde se genere la onda. Mientras que la latencia se mide tomando el tiempo en milisegundos desde la presentación del estímulo hasta el punto de máxima o mínima amplitud dentro de una ventana de latencia concreta.

bilateral, la circunvolución temporal superior derecha, la circunvolución cingulada anterior de manera bilateral, el giro precentral derecho, el caudado de manera bilateral y el putamen unilateralmente. Estos resultados sugieren un efecto de compensación cerebral (exhortando a otras regiones del cerebro a responder a las demandas de la tarea) en los cerebros de los usuarios fuertes de cannabis.

Jager et al. (2006) evaluaron la función cerebral a través de IRMf de diez usuarios frecuentes de cannabis (de 2 a 17 cigarrillos por semana), después de una semana de abstinencia, en comparación con diez sujetos controles al ejecutar una tarea que mide memoria de trabajo verbal (paradigma de *Sternberg*) y otra que mide atención selectiva viso-auditiva (*visuo-auditory oddball detection task*). La mediana reportada para el consumo de cannabis en toda su vida fue de 1,300 veces con un rango de 675 a 5,400; mientras que la mediana del uso de cannabis en el último año fue de 350 veces con un rango de 75 a 900 veces. Se realizaron dos versiones de la tarea de memoria de trabajo: una tarea de práctica y una tarea nueva. La diferencia entre una y otra es que en la tarea de práctica el primer conjunto de consonantes fue el mismo en todos los ensayos, pues su único fin era que los sujetos entendieran las instrucciones. Mientras que en la tarea nueva, el conjunto de consonantes a memorizar fue diferente en todos los ensayos. Ambos grupos de sujetos realizaron la tarea de práctica antes y mientras fueron medidos en el resonador. Los consumidores de cannabis y los controles realizaron con la misma eficiencia ambas tareas. Además, a diferencia de los resultados del grupo de Kanayama et al. (2004), se encontró que los usuarios de cannabis en general no difirieron de los controles en las regiones activadas. Para la tarea de memoria de trabajo se activó el giro fusiforme izquierdo, la corteza prefrontal dorsolateral izquierda, la corteza anterior del cíngulo y la corteza parietal superior izquierda y derecha (área de Brodmann (AB) 7). Sin embargo, un dato interesante que se reporta en esta investigación es que después de la tarea de práctica, los controles disminuyen significativamente el uso de su corteza parietal superior izquierda conforme siguen ejecutando la tarea nueva mientras que en los usuarios de marihuana esto no ocurre. Se ha reportado que esta área desempeña un papel en el almacenamiento a corto plazo y

en la recuperación de la información, generalmente de palabras (Jonides et al., 1998; Jansma et al., 2001 citados en Jager et al., 2006). Así mismo, se sabe que una lesión en esta área afecta importantemente a la memoria a corto plazo (Warrington et al., 1971; Saffran & Marín, 1975 citados en Jager et al., 2006). Por otro lado, en la prueba de atención se activó la corteza auditiva primaria y secundaria (derecha e izquierda), el giro frontal inferior derecho, la corteza prefrontal dorsolateral derecha y la corteza anterior del cíngulo.

Con este estudio, Jager et al. (2006) mostraron que no hay deterioro en la memoria de trabajo ni en la atención selectiva en los usuarios de *cannabis* después de una semana de abstinencia. Sin embargo, sus resultados indican que el consumo frecuente de marihuana, de 2 a 17 cigarros por semana, genera una diferencia en la activación de la corteza parietal superior izquierda impidiendo que se comporte como la de los controles, sugiriendo un efecto de compensación en los usuarios aún estando en abstinencia.

El por qué los resultados del estudio de Kanayama et al. (2004; que un gran número de áreas se activen más en los usuarios de cannabis que en los controles) difieren del estudio de Jager et al. (2006; que sólo un área se active más en los usuarios de cannabis que en los controles) quizá pueda explicarse por las diferencias que los participantes presentan en la historia de consumo y en las condiciones en que son medidos (de 6 a 36 horas después del consumo *vs.* abstinencia); si revisamos a detalle la cantidad de veces que los participantes de ambas investigaciones han consumido marihuana en toda su vida, notaremos que los participantes de la investigación de Kanayama et al. (2004) han consumido marihuana en mayor proporción que los participantes de la otra investigación. En general, estas dos circunstancias generan una diferencia inherente en las investigaciones con usuarios de marihuana, debido a que muchas veces este tipo de variables no son fáciles de controlar y, por lo tanto, no permite hacer comparaciones entre los estudios. Otra hipótesis importante que podría explicar estas diferencias es con relación a los paradigmas que utilizan en cada investigación. Kanayama et al. (2004) evaluaron a la memoria de trabajo espacial

mientras que Jager et al. (2006) a la memoria de trabajo verbal. En un apartado posterior abordaremos las diferencias entre las áreas cerebrales implicadas en el procesamiento de la memoria de trabajo verbal y espacial, y será entonces cuando podamos entender por qué la corteza parietal superior izquierda está implicada en la ejecución de una tarea de memoria de trabajo verbal pero no espacial.

Los estudios discutidos en este apartado nos muestran que efectivamente la marihuana está provocando efectos en la función cognitiva, de nuestro interés, particularmente sobre la memoria de trabajo. Si bien, los efectos parecen depender de diversas variables como la historia y frecuencia de consumo de la droga, es importante resaltar que estos estudios nos muestran un efecto de compensación que realiza el cerebro humano ante la administración de un agonista canabinérgico; este efecto sugiere una pérdida de homeostasis en el sistema de los endocannabinoides. Estudios con animales de experimentación que se expondrán en el siguiente apartado nos permitirán ampliar esta afirmación.

### **2.2.2 Estudios con ratas**

Los efectos de los cannabinoides sobre la memoria de trabajo espacial en ratas han sido investigados utilizando distintas tareas de laberinto. Jentsch et al. (1997) administraron sistémicamente una única dosis de  $\Delta 9$ -THC a ratas que previamente habían sido entrenadas en una tarea de elección alternada retrasada en un laberinto en T. Esta tarea consiste en que las ratas deben elegir dirigirse al lado opuesto del ensayo previo para obtener el reforzador. La evaluación de los animales después de la administración de  $\Delta 9$ -THC mostró un aumento en el número de errores en la resolución del laberinto, en comparación con el grupo control a quienes se les administró un vehículo. Además, se observó un aumento en la liberación de dopamina en la corteza prefrontal, pero no en el núcleo accumbens o en el estriado dorsal. Esto indica que a pesar de que el  $\Delta 9$ -THC probablemente llegó a todo el cerebro, puesto que la administración fue sistémica, no lo afectó de la misma manera, sino que afectó principalmente a la corteza prefrontal. La relevancia de este resultado radica en que la

corteza prefrontal participa en los procesos involucrados en la memoria de trabajo.

Por otro lado, Pistis et al. (2002) reportaron que la administración intravenosa de 1 mg/kg de peso de  $\Delta$ 9-THC a ratas produjo una disminución en los niveles de GABA extracelular, y un aumento de los niveles de dopamina y glutamato extracelulares en la corteza prefrontal, con respecto a la línea base; estos efectos fueron revertidos al administrar un antagonista cannabinérgico (SR141716A). Los resultados de Pistis et al. (2002) indican que están ocurriendo modificaciones en la forma en que se liberan estos tres neurotransmisores en la corteza prefrontal ante la administración intravenosa de un agonista cannabinérgico. Es posible que de manera natural los endocannabinoides también provoquen estos cambios, una vez que son liberados de la neurona postsináptica y, que entonces, participen en la modulación de alguna función cognitiva.

Dado que es bien sabido que la corteza prefrontal está involucrada en el procesamiento de la memoria de trabajo (Baddeley, 1996), Silva de Melo et al. (2005) examinaron si la administración intracortical de  $\Delta$ 9-THC a ratas en la región medial de la corteza prefrontal tenía un efecto (en función de cuatro diferentes dosis de: 0.0, 32.0, 100.0 ó 180.0  $\mu$ g), sobre la resolución de un laberinto radial (tarea que evalúa memoria de trabajo espacial). Estos investigadores encontraron un número de errores significativamente mayor en las ratas a las que se les administró 100  $\mu$ g de  $\Delta$ 9-THC en comparación con el vehículo y también con las otras dosis (32.0 ó 180.0  $\mu$ g). Por lo tanto, el  $\Delta$ 9-THC administrado directamente en la corteza prefrontal medial deterioró la ejecución de una tarea de memoria de trabajo espacial sólo a altas dosis.

Hasta aquí se ha evidenciado que el sistema endocannabinoide participa en los procesos de atención y memoria. Fundamentalmente, por la alta densidad de receptores CB1 localizados en la corteza prefrontal y parietal, sitios claves para que ocurra el proceso de memoria de trabajo, y, porque este sistema es un modulador de otros sistemas de neurotransmisión involucrados también con la memoria (Egerton et al., 2006); particularmente este hecho evidenciado en la corteza prefrontal. Para un mejor entendimiento de la relación entre el sistema endocannabinoide y la memoria de



trabajo, a continuación describiremos a detalle en qué consiste el constructo de memoria de trabajo, cómo se evalúa y qué zonas cerebrales están implicadas en este proceso.

## **2.3 Memoria de trabajo**

La memoria de trabajo puede definirse como un almacén temporal de capacidad limitada que lleva a cabo la integración de elementos de información separados y opera cuando se debe mantener y manipular la información a fin de dar una respuesta (Baddeley, 2003; Linden, 2007). En los seres humanos se considera fundamental para la comprensión del lenguaje, la resolución de problemas, el razonamiento, la capacidad para planificar acciones futuras e hilvanar pensamientos e ideas (Baddeley, 2003). Sin embargo, no es una función exclusiva de los seres humanos, sino que también esta función se puede observar en animales no humanos (Jentsch et al., 1997). La memoria de trabajo es fundamental para la realización de cualquier actividad durante la vigilia, ya que es la que nos ayuda a recordar qué es lo que hicimos hace apenas unos segundos u horas, y también es la que se encarga de recordarnos para qué lo estamos haciendo; dicho de otra manera, es la que se encarga de mantener información a corto plazo, relacionarla con la información de largo plazo, además de manipularla, actualizarla y dirigirla, con el único propósito de que podamos realizar alguna actividad (orientada a un objetivo), sea por ejemplo, comer, leer, platicar o mirar una película. El concepto de memoria de trabajo fue introducido por Baddeley y Hitch en 1974 (citado en Baddeley, 2003), éste se ha ido modificando a lo largo de los años y se le ha encontrado sustento experimental.

### **2.3.1 Modelo de memoria de trabajo de Baddeley y Hitch**

El constructo de memoria de trabajo evolucionó a partir de modelos de memoria que postulaban la existencia de diferentes almacenes de memoria. Un modelo muy influyente fue el de Atkinson y Shiffrin (1968; citado en Baddeley 2000) que proponía que la memoria depende del tiempo en que puede permanecer. Este modelo sugiere la existencia de tres sistemas: la memoria sensorial, la memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo. La memoria sensorial es el almacén que mantiene por milisegundos la

información y es pre-atentivo; la memoria a corto plazo, gracias a la atención, recibe la información de los distintos almacenes sensoriales y es la que transfiere la información a la memoria a largo plazo; tiene una duración de unos cuantos minutos (sin que sea claro cuántos); por último, la memoria a largo plazo es la que mantiene por horas, días e incluso, durante toda la vida la información. Hasta la fecha, no se ha podido mostrar que un recuerdo haya desaparecido por completo o que dure toda la vida. Un postulado posterior cobró mucha más importancia debido a que amplió el concepto pasivo que se tenía de la memoria a corto plazo (como el escalón que sirve sólo para pasar una información reciente a la memoria a largo plazo), a un sistema activo de memoria que proporciona la base para habilidades cognitivas complejas (Repovš & Baddeley, 2006). Este postulado es el modelo multicomponente de Baddeley y Hitch (1974, citado por Baddeley, 2003) y actualizado por Baddeley (2000 y 2003), que consta de un sistema de control: el ejecutivo central, y de tres almacenes a corto plazo: la agenda visoespacial, el circuito fonológico y el *buffer* episódico.

Este modelo multicomponente hace uso de la metáfora de la computadora (analogía ampliamente utilizada en Psicología Cognitiva), ofreciendo un modelo excepcional para pensar sobre la naturaleza y estructura de la memoria de trabajo (Smith & Kosslyn, 2008). El término *buffer*, es una palabra utilizada en informática para referirse a un almacén de memoria de capacidad limitada, se emplea de manera análoga a los sistemas subsidiarios de la memoria de trabajo, lo que implica que estos tres sistemas son almacenes de memoria de capacidad limitada y de contenido independiente.

El Ejecutivo Central o sistema de control es el que se encarga de dirigir el curso general del procesamiento de la información y de supervisar a los sistemas subordinados de memoria a corto plazo (Baddeley, 1996). El ejecutivo central es el que "trabaja" en la memoria de trabajo.

El sustento neurofisiológico del ejecutivo central se ha evidenciado a través de técnicas de neuroimagen que evalúan la actividad cerebral durante la resolución de tareas que miden a la memoria de trabajo (Owen et al., 2005; Postle & D'Esposito, 2000;

Cerasa et al., 2008). Se ha mostrado que diversas regiones de la corteza prefrontal participan en el mantenimiento y la manipulación de la información, ambas tareas coordinadas, por el ejecutivo central. Por ejemplo, Cerasa et al. (2008) encontraron que en el mantenimiento de la información (tareas en las que la información sólo tiene que almacenarse brevemente y después recordarse) existe una gran actividad de regiones ventrolaterales de la corteza prefrontal, mientras que cuando la información se manipula (cuando la información almacenada también se tiene que transformar mentalmente de algún modo p. ej., realizar una operación aritmética mentalmente) las regiones dorsolaterales de la corteza prefrontal son las que están involucradas. Estos resultados se corresponden con los reportes de pacientes con daño prefrontal quienes presentan graves alteraciones en este tipo de memoria (Owen et al., 1990; Baddeley, 1996).

Por otro lado, la agenda visoespacial es el componente encargado de almacenar información de tipo visual y espacial. Baddeley (2003) y Repovš & Baddeley (2006) han sugerido que ambos tipos de información se almacenan en dos subcomponentes independientes, uno visual y otro espacial, que ejecutan los mecanismos de mantenimiento y manipulación por separado. Esto se sabe por los datos obtenidos de personas que realizan tareas de interferencia (Della-Sala et al., 1999). Estas tareas consisten en pedirle al sujeto que realice dos tareas consecutivas; primero, se le pide que solamente mantenga una información, ya sea espacial o visual. Antes de pedirle que dé una respuesta sobre esta información, se le presenta la segunda tarea, en la cual se le pide que mantenga y ejecute una respuesta con otra información la cual será visual o espacial también, esta segunda tarea funciona como interferencia cuando la información a mantener es del mismo tipo que se utilizó en la primer tarea, pero no así, cuando la información es de otro tipo. Así mismo, se ha reportado que la memoria de trabajo visual está estrechamente relacionada con la percepción de imágenes visuales y que la memoria de trabajo espacial muestra una estrecha conexión con la atención y la acción (movimiento, Repovš & Baddeley, 2006). También se ha demostrado que este tipo de almacén visoespacial se relaciona con la activación de zonas occipito-temporales y occipito-parietales (Smith et al., 1995).

El circuito fonológico es el componente responsable de almacenar información lingüística. Al igual que la agenda visoespacial, se ha propuesto que el circuito fonológico también involucra dos subcomponentes independientes: un almacén fonológico y un proceso de repetición articuladora (Baddeley, 2003). Cuando se codifica la información verbal presentada visualmente, la información se transforma en un código basado en el sonido o código "auditivo-fonológico". Para prevenir que la información decaiga por completo, un proceso activo mantiene la información: la repetición articuladora, en donde se pronuncian internamente los sonidos que se han escuchado también internamente. El proceso parece muy similar a nuestra capacidad de repetir subvocal y rápidamente algo que acabamos de oír, con independencia de que lo entendamos o no, lo que nos habla de un indicio de que el circuito fonológico puede estar involucrado en el aprendizaje de un idioma (Smith & Kosslyn, 2008) o de cualquier elemento verbal novedoso.

El circuito fonológico es el sistema de almacenamiento de información de la memoria de trabajo que más se ha investigado; probablemente porque este subsistema es de tipo verbal y gran parte de la cognición parece basarse en el lenguaje (Smith & Kosslyn, 2008). Se ha descrito que el circuito fonológico está controlado por la corteza parietal inferior izquierda, mientras que la repetición articuladora está relacionada con la corteza frontal inferior izquierda (Vallar & Papagno, 1995; citados en Smith & Kosslyn, 2008). Según los datos anatómicos de la localización de este sistema, parecería lógico que el circuito fonológico estuviera implicado en el procesamiento del lenguaje, ya que está integrado tanto por los sistemas de producción como por los de comprensión del lenguaje. Se ha demostrado que este sistema es esencial para el aprendizaje de palabras nuevas (Baddeley, Gathercole & Papagno, 1998). Puede ser que la evolución nos haya dotado de una pericia específica para repetir lo que escuchamos, incluso si no lo entendemos inicialmente; esta forma de imitación es algo que incluso los niños pequeños pueden hacer y puede proporcionar un medio para ayudarnos a aprender nuevas palabras, estableciendo un vínculo entre sonido y significado (Smith & Kosslyn, 2008).

Entre las variables que intervienen en el rendimiento en tareas de memoria de trabajo verbal se ha encontrado que el tiempo de pronunciación del estímulo afecta a la velocidad de la repetición articuladora, que requiere de un procesamiento basado en el habla; por ejemplo, Cowan et al. (1992) pidieron a sujetos que memorizaran listas de palabras, la mitad de ellas eran palabras cortas en pronunciación y la otra mitad eran largas, ambas en el idioma inglés; las personas recordaron más palabras de pronunciación corta que de pronunciación larga. De allí que, cuando se requiere medir la capacidad de memoria de trabajo verbal, es indispensable que los estímulos sean equiparables fonológicamente, es decir, que no difieran en el tiempo de pronunciación.

Y por último, el *buffer* episódico almacena información autobiográfica por un periodo de tiempo limitado y vincula la información del circuito fonológico y la agenda visoespacial con la información almacenada a largo plazo en una representación episódica unitaria (Baddeley, 2000; Baddeley, 2003).

Después de la postulación de este constructo, resultó sumamente importante construir paradigmas que lo exploraran experimentalmente. En la actualidad existen diversas tareas para medir a la memoria de trabajo, en diferentes modalidades (verbales, espaciales, auditivas, etc.) y con diferentes tipos de estímulos; a continuación se detalla esta información.

### **2.3.1 ¿Cómo medir a la Memoria de Trabajo?**

Mientras que en ratas el procedimiento más efectivo para evaluar la memoria de trabajo es a través de diferentes tipos de laberintos, en sujetos humanos el procedimiento que más se ha empleado para investigar las bases neuronales de la memoria de trabajo es el paradigma "*N back*" (Gevins & Cutillo, 1993). Debido a que esta tarea involucra a las tres características de la memoria de trabajo: el mantenimiento, la manipulación y la actualización de la información, a diferencia de muchos otros, los cuales únicamente miden una de estas características (p. ej., el paradigma de *Sternberg* solamente mide el mantenimiento de la información). Otro de los atributos que posee este paradigma es que a través de estudios con neuroimagen se ha evidenciado que

demanda más actividad al cerebro en contraste con otras tareas que implican a sólo uno de los componentes de la memoria de trabajo.

El paradigma *N back* consiste en presentar a los sujetos una sucesión continua de estímulos, que pueden ser verbales o no verbales, y se les pide que decidan, a medida que se presenta cada estímulo, si el estímulo que están percibiendo en ese momento es igual o diferente al que se le presentó *N* ensayos atrás. Por lo tanto, esta tarea se compone de dos tipos de estímulos, *target* y *non-target*. Se define un estímulo como *target* cuando el estímulo actual es igual al presentado *N* ensayos atrás; mientras que un estímulo *non-target* es cuando el estímulo actual es diferente al presentado *N* ensayos atrás. Por lo regular, estos estímulos siempre están dispuestos de manera semialeatoria a lo largo de un bloque de estímulos. A medida que aumenta el valor de *N*, aumenta la complejidad de la tarea, debido a que se necesita mayor capacidad en el almacén para poder realizar el constante monitoreo, actualización y manipulación de la información. *N* por lo general es igual a cero, uno, dos, tres o más ensayos anteriores; cero es una condición control en la que no hay un proceso de memoria de trabajo (D'Esposito et al., 1998). Por ejemplo, en la Tabla 2 se ilustra cómo va disminuyendo el porcentaje de respuestas correctas a medida que aumenta la dificultad de la tarea, estos datos son tomados de una investigación realizada por Schmidt et al. (2009).

**Tabla 2.** Puntaje obtenido en tres niveles de dificultad en la tarea *N back* (datos tomados de Schmidt et al., 2009).

		COMPLEJIDAD DE LA TAREA		
		1 BACK	2 BACK	3 BACK
% DE RESPUESTAS	CORRECTAS	100%	88.57%	70.56%

Owen et al. (2005) realizaron un meta-análisis incluyendo 24 investigaciones que evalúan a través de técnicas de neuroimagen a la memoria de trabajo en el paradigma *N*

*back*, mostraron que seis regiones corticales están constantemente activas en todas ellas, estas regiones son: la corteza parietal posterior medial de forma bilateral, incluyendo al precuneus y a los lóbulos parietales inferiores (aproximadamente el AB 7, 40), la corteza premotora de manera bilateral (AB 6, 8), la corteza premotora cingulada dorsal y medial, incluyendo área motora suplementaria (AB 32, 6), la corteza prefrontal rostral de forma bilateral (AB 10), la corteza prefrontal dorsolateral de forma bilateral (AB 9, 46) y la corteza prefrontal ventrolateral de forma bilateral (AB 45, 47). Además del cerebelo medial.

Específicamente, se ha interpretado que la activación de la corteza prefrontal dorsolateral (AB 9, 46) se asocia con el mantenimiento de la información espacial en línea, el control y la manipulación de la memoria de trabajo, la respuesta de selección, la aplicación de estrategias para facilitar la memoria, la organización del material antes de la codificación, la verificación y la evaluación de la información que se ha recuperado de la memoria a largo plazo (Owen et al., 2005). Mientras que la corteza prefrontal ventrolateral en su región medial (AB 45, 47) ha sido implicada específicamente en la selección, comparación y resolución del mantenimiento de los estímulos a corto y a largo plazo, el mantenimiento de la información no espacial en línea y la selección de estímulos (Owen et al., 2005).

En cuanto al nivel de complejidad, en los estudios de neuroimagen de personas que realizan la tarea *N back* se ha reportado que la actividad cerebral en la corteza prefrontal lateral, así como en la corteza parietal, aumenta de forma lineal con el valor de la *N*, pero como estos procesos de almacenamiento requieren asimismo procesos ejecutivos o de control, se sabe que también la actividad del ejecutivo central aumenta con el valor de la *N* (Braver et al., 1997).

En la presente tesis se evaluó la tarea *N back* en modalidad espacial (puntos ubicados dentro de una matriz) y verbal (letras del alfabeto en español). La importancia de evaluar diferentes tipos de estímulos es que se ha demostrado que cada tipo de estímulo activa diferentes áreas cerebrales (Owen et al., 2005). Aunque en esta tesis no

se registró la actividad cerebral de los sujetos, es probable que conductualmente se puedan ver diferencias entre el tipo de modalidad. Esto indicaría que las diferencias no dependen del ejecutivo central, sino más bien de los sistemas subordinados, dependiendo de la modalidad con la que se trabaje. Además, recordemos que en el modelo de memoria de trabajo de Baddeley y Hitch (1974), dos de los componentes del modelo son el circuito fonológico y la agenda visoespacial; componentes que Baddeley (2003) considera independientes.

Es por eso que dedicamos los siguientes apartados para describir a detalle cómo se ha evaluado el paradigma *N back* con estímulos verbales y espaciales. Así como qué áreas se han visto implicadas en la ejecución de estos paradigmas y las diferencias existentes entre ellos.

### **2.3.2.1 Paradigma *N back* verbal**

En la modalidad verbal casi siempre los estímulos son letras, las cuales pueden ser presentadas una a la vez, formando monosílabos con o sin sentido, o bien, formando palabras.

Resulta un poco complicado reportar datos conductuales obtenidos en el paradigma *N back* (sin distinción entre el verbal y el espacial) debido a que se han analizado de una manera muy diversa y en cierto sentido controversial (Jonides et al., 1997; Carlson et al., 1998; Cerasa et al., 2008). Se han propuesto tantas maneras de analizar el paradigma que cada una de ellas nos brinda información diferente y, en algunos casos, no tan fehaciente; lo cual dificulta que los datos existentes en materia sean consistentes. Por ejemplo, Schmidt et al. (2009) evaluaron a 50 participantes sanos con el fin de conocer si existían diferencias de sexo al resolver una tarea *N back* verbal con tres niveles de complejidad: 1, 2 y 3 *back*. No encontraron diferencias significativas en la ejecución por sexo. La manera en que miden la ejecución es a través de tres mediciones independientes: el porcentaje de respuestas correctas, los errores de comisión (estos errores ocurren cuando la persona responde que el estímulo sí estuvo *N* ensayos atrás, pero no fue así) y los errores de omisión (son errores causados por la



ausencia de respuesta). Esta manera de analizar los resultados de la tarea *N back* no es la más adecuada, debido a que no se están tomando en cuenta todas las posibles respuestas que pueden existir en la habilidad del sujeto para la detección del estímulo. Esto se deriva de la teoría de detección de señales que argumenta que la detección de una señal (estímulo) está compuesta por dos procesos separados: la sensibilidad del sujeto al estímulo y la estrategia o criterio del sujeto para la toma de decisiones (Baird & Noma, 1978, citado en Matlin & Foley, 1996). Los investigadores pueden conocer la sensibilidad del sujeto mediante el análisis de sus respuestas a ensayos que contengan un estímulo *target* y a ensayos que no lo contengan. De tal manera que se puedan conocer las cuatro respuestas posibles de este método (Tabla 3): 1) una respuesta correcta (cuando la persona responde que el estímulo *target* estuvo *N* ensayos atrás y efectivamente fue así), 2) un error (cuando la persona responde que el estímulo *target* no estuvo *N* ensayos atrás, cuando sí fue así), 3) una falsa alarma (cuando la persona responde que el estímulo *target* sí estuvo *N* ensayos atrás cuando no fue así), y 4) una rechazo correcto (cuando la persona responde que el estímulo *target* no estuvo *N* ensayos atrás y en realidad no ocurrió). Es posible que los sujetos no respondan, pero esto no se considera una respuesta.

**Tabla 3.** Cuatro posibles respuestas a un estímulo según la Teoría de detección de señales.

		EL SUJETO RESPONDIÓ QUE EL ESTÍMULO TARGET...	
		Sí estuvo presente	No estuvo presente
EL ESTÍMULO TARGET ESTUVO...	Presente	Acierto (correcto)	Error (incorrecto)
	Ausente	Falsa Alarma (error)	Rechazo correcto (acierto)

En la investigación de Schmidt et al. (2009) cuantifican por separado las respuestas correctas, los errores de comisión y omisión, lo cual hace que el resultado sea

incompleto debido a que la evaluación no nos está dando un puntaje total sino más bien porciones de lo que podría ser la ejecución total. Además, cuando ellos miden el porcentaje de respuestas correctas, están incluyendo a las respuestas *target* y a las *non-target*, lo cual también hace que el resultado sea erróneo, puesto que podría ser un resultado sobreestimado o inflado. Por ejemplo, si el participante por alguna razón no entendió las instrucciones y contesta a todos los ensayos que el estímulo *target* se presentó *N* ensayos atrás, su porcentaje de ejecución correcta sería igual al total de *targets*, sin embargo, eso no nos está indicando su nivel de discriminación entre el estímulo *target* y el *non-target*, ya que tendría el 100% de respuestas incorrectas para los estímulos *non-target*. Por lo tanto, no tiene una memoria de trabajo eficiente.

Entonces, cuando evaluamos la ejecución de esta manera existe cierto grado de incertidumbre acerca de la ejecución del participante. Sin embargo, existe una manera de evaluar el paradigma *N back* propuesta por Abi-Dargham et al. (2002) en que se realiza un ajuste de las puntuaciones obtenidas tanto para los estímulos *target* como para los *non-target*. Este ajuste se llama **Tasa de Aciertos Ajustada (TAA**, es la traducción del inglés: *Adjusted Hit Ratio*) y se calcula restando la proporción de aciertos menos la proporción de falsas alarmas. La proporción de aciertos se calcula dividiendo las respuestas correctas para el estímulo *target* entre el total de *targets*. Y la proporción de falsas alarmas se calcula dividiendo las respuestas incorrectas para el estímulo *target* sobre el total de *non-targets*. De esta forma, la TAA tiene un rango de -1 a +1: +1 indica que el sujeto ejecutó todas las respuestas correctas; mientras que un valor de -1 indica que el sujeto ejecutó todas las respuestas de manera incorrecta (Abi-Darham et al., 2002).

Cuando se analiza la tarea *N back* a través de este ajuste, las puntuaciones finales resultan más certeras debido a que se descarta la probabilidad de cuantificar como aciertos aquellas respuestas que el sujeto haya acertado por casualidad (debido a que conocemos la proporción de estímulos *target* y *non-target*) y no como consecuencia del ejercicio de memoria de trabajo que demanda la tarea.

Ahora bien, para describir las áreas cerebrales que están involucradas en este paradigma, primero referiré aquellas que están implicadas en un paradigma de memoria

de trabajo verbal que sólo demanda mantener la información: la tarea *Item Recognition Task* y después describiré las áreas cerebrales implicadas en el paradigma *N back* verbal. El propósito de empezar a describir los resultados obtenidos en el otro paradigma es para hacer notoria la diferencia que existe entre las diferentes tareas que miden memoria de trabajo, no sólo por cómo involucran a los componentes del modelo de Baddeley y Hitch (1974), sino también en términos de las áreas cerebrales implicadas en resolverlas.

Awh et al. (1996) midieron el metabolismo cerebral a través de la técnica Tomografía por Emisión de Positrones (*PET*, por sus siglas en inglés *Positron Emission Tomography*) mientras los sujetos resolvían dos paradigmas diferentes de memoria de trabajo verbal. En el primer experimento analizaron la actividad del cerebro al ejecutar el paradigma *Item Recognition Task*, y encontraron que el mayor metabolismo cerebral ocurrió en el hemisferio izquierdo, específicamente en la corteza parietal posterior izquierda (AB 40), la corteza parietal superior izquierda (AB 7), el área de Broca (AB 44), el área premotora izquierda (AB 6), el área motora suplementaria izquierda (AB 6), la corteza insular y el tálamo (ambos únicamente en el hemisferio izquierdo). Mientras que en el hemisferio derecho el metabolismo cerebral ocurrió en el cerebelo y en la línea media del cíngulo anterior (AB 32). En el segundo experimento analizaron el paradigma *2 back*. Awh et al. (1996) encontraron que en el hemisferio izquierdo se activó otra área cerebral, además de las ya descritas: el cerebelo. Mientras que en el hemisferio derecho encontraron una activación de la corteza parietal superior (AB 7), el área premotora (AB 6), el área motora suplementaria (AB 6), además de las descritas en el primer paradigma. Dicho de otra manera, en la tarea *N back* se encontró una activación bilateral para muchas de las áreas que en la tarea *Item Recognition Task* únicamente se encontraron en el hemisferio izquierdo. Los autores sugieren que estas nuevas activaciones pueden reflejar la mayor demanda que ejecuta el cerebro ante el procesamiento del paradigma *2 back*.

Jonides et al. (1997) además de describir qué áreas están participando en la resolución del paradigma *N back* verbal mostraron, a través de PET cómo, a medida que aumenta la dificultad de la tarea (de 0 a 3 *back*), aumenta la activación de las áreas

cerebrales reclutadas para la resolución de las tareas. Los resultados conductuales mostraron que entre más difícil era la tarea aumentaba el número de errores y los tiempos de reacción. Estos resultados sugieren que a medida en que aumentan los estímulos a mantenerse, manipularse, y actualizarse, al cerebro le toma más tiempo y le es más difícil responder de manera correcta. Así mismo, Jonides et al. (1997) mostraron que si bien ocurre una mayor activación de un número de áreas, también existen otras regiones cerebrales que se desactivan, dando como resultado una mayor actividad global cerebral en las tareas con mucha carga de memoria (*3 back*) a diferencia de aquellas que requieren poca carga de memoria (*1 back*). En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos por Jonides et al. (1997) y se contrasta la activación en 0, 1, 2 y 3 *back*.

**Tabla 4.** Descripción de la activación y deactivación de las áreas cerebrales al contestar la tarea *N back* verbal en las complejidades: 0, 1, 2 y 3 (tomada de Jonides et al., 1997, páginas 466-467).

CARGA DE MEMORIA MENOS LA TAREA CONTROL	HEMISFERIO		ÁREA CEREBRAL	ÁREA DE BRODMAN
0 <i>BACK</i> - CONTROL	IZQUIERDO	ACTIVACIÓN	Ínsula	
		DEACTIVACIÓN	---	
	DERECHO	ACTIVACIÓN	---	
		DEACTIVACIÓN	Corteza parietal posterior	39
	LÍNEA MEDIA	ACTIVACIÓN	Cerebelo	
		DEACTIVACIÓN	Giro frontal superior	8
1 <i>BACK</i> - CONTROL	IZQUIERDO	ACTIVACIÓN	Corteza premotora	6
		DEACTIVACIÓN	Giro frontal anterior	8
			Corteza parietal posterior	39
			Área temporal media	20
	Área temporal anterior		38	
	DERECHO	ACTIVACIÓN	Corteza occipital	19
		DEACTIVACIÓN	---	
	LÍNEA MEDIA	ACTIVACIÓN	Cerebelo	
		DEACTIVACIÓN	Giro frontal superior	8
			Giro del cíngulo posterior	23/30
Giro frontal anterior			10	
Giro del cíngulo anterior	32			
2 <i>BACK</i> - CONTROL	IZQUIERDO	ACTIVACIÓN	Área motora suplementaria	6
			Corteza parietal superior	7
			Corteza parietal posterior	40
			Área premotora	6
			Área de Broca	44
			Cerebelo	
	DEACTIVACIÓN	Giro frontal superior	8	
		Corteza parietal posterior	39	
			Giro frontal inferior	47
			Región temporal media	20
			Giro temporal anterior	38

	DERECHO	ACTIVACIÓN	Área motora suplementaria Corteza parietal posterior Área frontal anterior Tálamo Cerebelo	6 40 9/10	
		DEACTIVACIÓN	<i>Región temporal media</i> <i>Giro temporal anterior</i>	21 38	
	LÍNEA MEDIA	ACTIVACIÓN	Giro del cíngulo anterior Tálamo Cerebelo	32	
		DEACTIVACIÓN	<i>Giro frontal superior</i> <i>Giro del cíngulo posterior</i> <i>Giro frontal anterior</i>	8 23 10	
	3 BACK- CONTROL	IZQUIERDO	ACTIVACIÓN	Área motora suplementaria Corteza premotora Corteza parietal superior Corteza parietal posterior Área de Broca Corteza frontal dorsolateral Área premotora Ínsula Cerebelo	6 6 7 40 44 46 6
			DEACTIVACIÓN	<i>Giro frontal superior</i> <i>Corteza parietal posterior</i> <i>Giro frontal inferior</i> <i>Región temporal media</i> <i>Giro temporal anterior</i>	8 39 47 20 21/38
DERECHO		ACTIVACIÓN	Área motora suplementaria Corteza parietal posterior Giro frontal anterior Área premotora Área de Broca Corteza frontal dorsolateral Ínsula Giro orbito-frontal Cerebelo	6 40 9 6 44 46/10 11	
		DEACTIVACIÓN	<i>Región temporal media</i> <i>Giro temporal anterior</i> <i>Cerebelo</i>	21/28 38	
LÍNEA MEDIA		ACTIVACIÓN	Giro del cíngulo anterior Tálamo Núcleo rojo Cerebelo	32	
		DEACTIVACIÓN	<i>Giro frontal superior</i> <i>Giro frontal anterior</i> <i>Giro del cíngulo posterior</i> <i>Giro frontal anterior</i> <i>Giro del cíngulo anterior</i>	8 9/8 23/30 10 32	

Los estudios descritos muestran que en el paradigma *N back* en modalidad verbal existe una activación cerebral que cambia en función de la dificultad de la tarea. Si bien existen áreas que permanecen activas en todos los niveles de complejidad (1, 2 y 3 *back*) y que aumentan concomitantemente a la complejidad, por ejemplo, la corteza premotora, la corteza parietal posterior, el área temporal media, el giro temporal anterior, el cerebelo y el giro frontal superior; también hay regiones que se activan

exclusivamente en cada nivel de complejidad, por ejemplo, en 1 *back* está activa la corteza occipital, en 2 *back* el tálamo y en 3 *back* la corteza frontal dorsolateral. Así mismo, en los niveles de dificultad 1 y 2 *back* se activan el giro del cíngulo anterior y posterior, en 2 y 3 *back* existe una activación del área motora suplementaria, corteza parietal superior, área de broca y giro frontal inferior (Jonides et al., 1997).

### 2.3.2.2 Paradigma *N back* espacial

Para evaluar este paradigma usualmente se utilizan como estímulos puntos presentados en diversas posiciones de la pantalla de una computadora, pero también se han utilizado formas geométricas regulares o irregulares y letras, las cuales también se ubican en distintas posiciones espaciales.

Jonides et al. (1993) determinaron, a través de PET, qué áreas cerebrales estaban involucradas en la resolución del paradigma *Item Recognition Task* con estímulos espaciales. Encontraron que todas las activaciones fueron significativas en el hemisferio derecho en contraste con los estímulos verbales, las cuales ocurren en el hemisferio izquierdo. Las áreas de activación fueron el giro prefrontal inferior (AB 47), la corteza parietal posterior (AB 40), la corteza occipital anterior (AB 19) y el área premotora (AB 6).

En contraste, Carlson et al. (1998) evaluaron a través de IRMf una tarea *N back* espacial, en tres niveles de dificultad 0, 1 y 2 *back*. Se analizaron los tiempos de reacción y las respuestas incorrectas. Los tiempos de reacción fueron significativamente diferentes entre las condiciones 0 y 1 *back*, 0 y 2 *back* y 1 y 2 *back*, es decir, encontraron que a medida que aumentaba la dificultad de la tarea, aumentaban también los tiempos de reacción. En el porcentaje de respuestas incorrectas encontraron una diferencia significativa entre 2 y 0 *back*, pero no entre 1 y 0 *back*, ni en 2 y 1 *back*. Los resultados que se encontraron en la resonancia magnética funcional fueron los siguientes:

- La diferencia entre **2 y 0 *back*** mostró una activación bilateral del giro frontal medial (AB 46, 9), de la corteza prefrontal (específicamente en el giro frontal superior, AB 6 y 8), del polo frontal (AB 10), del giro precentral, de la corteza parietal posterior (incluyendo el precúneo), de áreas visuales de asociación (el

giro occipital lateral y el giro lingual y fusiforme) y de la corteza del cíngulo anterior y posterior (Carlson et al., 1998).

- La diferencia entre **1 y 0 back** mostró que la activación se encuentra unilateralmente en el polo frontal y en áreas visuales de asociación (el giro occipital lateral y el giro lingual y fusiforme). Es importante resaltar que no hubo activación de las mismas áreas que se emplean para resolver *2 back*, por ejemplo, de la corteza prefrontal ni del cíngulo anterior ni posterior (Carlson et al., 1998).
- La diferencia de activación entre **2 y 1 back** mostró una activación del giro frontal medial (AB 46, 9), de la corteza prefrontal (específicamente en el giro frontal superior, AB 6 y 8) y del polo frontal (AB 10, estas tres áreas de manera bilateral), aunque en menor medida que en la diferencia de 2 y 0 *back*. Así mismo, se activaron la corteza parietal posterior, las áreas visuales de asociación y la corteza del cíngulo, únicamente en su porción anterior (Carlson et al., 1998).

El paradigma *N back* en modalidad espacial al igual que en la verbal muestra una activación cerebral que cambia en función de la dificultad de la tarea. Por ejemplo, en 1 y 2 *back* están activas las áreas visuales de asociación y el polo frontal. Pero en 2 *back* existe una activación del giro frontal medial, de la corteza prefrontal, del giro precentral, de la corteza parietal posterior y de la corteza del cíngulo anterior y posterior, además de las ya descritas.

### **2.3.2.3 Similitudes y Diferencias entre *N back* espacial y verbal**

Ya hemos descrito la actividad del cerebro en cada una de las modalidades del paradigma *N back* por separado. Ahora es el turno de analizar qué se ha encontrado en los estudios que han medido ambas modalidades.

D'Esposito et al. (1998) evaluaron la tarea *N back* en dos modalidades, espacial y verbal, con el objetivo de contrastar las diferencias conductuales y de activación cerebral, a través de IRMf, entre ellas. No encontraron diferencias significativas entre las dos modalidades de la tarea *N back*, ni a nivel conductual, ni a nivel de activación cerebral. Las áreas cerebrales reportadas para ambas tareas fueron la corteza prefrontal

dorsal derecha (AB 46), el área motora suplementaria, la corteza premotora lateral y la corteza parietal posterior.

En esa misma investigación, D'Esposito et al. (1998) realizaron una revisión de 24 estudios en donde analizaron a través de PET o de IRMf las áreas implicadas en tareas de memoria de trabajo espacial, verbal y ambas. Encontraron que únicamente cinco estudios hacen un contraste entre tareas espaciales y verbales; de los cuales sólo dos comprueban la *hipótesis dorsal-ventral*. Esta hipótesis propone que la corteza prefrontal mantiene diferente tipo de información; la región dorsal se encarga de información espacial, mientras que una región más ventral, de información verbal. En los otros tres estudios no encuentran esta disociación pero sí una especialización hemisférica; la activación del hemisferio derecho fue mayor durante la realización de tareas espaciales; mientras que el hemisferio izquierdo tuvo mayor activación en tareas verbales.

Owen et al. (2005) en su meta-análisis analizaron qué áreas cerebrales están implicadas en la ejecución de tareas que incluyen estímulos verbales en contraste con estímulos no verbales (p. ej., caras, fotos, olores, tonos o figuras geométricas); sin embargo, ninguna de estas tareas fue espacial. Los investigadores reportaron que existe una activación relativamente mayor en la corteza prefrontal ventrolateral izquierda, en la corteza premotora medial bilateralmente, en la corteza parietal posterior medial bilateralmente y el tálamo en tareas verbales en comparación con tareas no verbales. En este mismo estudio, compararon las áreas cerebrales implicadas en tareas espaciales en contraste con tareas no espaciales (es decir, las que presentan los estímulos en la misma posición sin que necesariamente los estímulos fueran verbales), y se reportó que la corteza prefrontal dorsolateral derecha, la corteza premotora lateral y la corteza parietal posterior medial derecha están implicadas en la localización de estímulos mientras que la corteza premotora medial y el cíngulo dorsal participan en las tareas que no demandan localizar estímulos espacialmente.

Estudios de pacientes con lesiones cerebrales nos permiten afirmar que el recuerdo verbal y espacial, son anatómicamente independientes aunque pueden formar parte del mismo sistema funcional que mantiene la información por un tiempo limitado.



Darlington (1999) reportó el caso de un paciente que había sufrido una extensa lesión en el hemisferio izquierdo y presentaba dificultades para recordar información verbal, pero no para recordar información espacial. También reportó el caso de un paciente quien sufrió una lesión en el área perisilviana lateral en el hemisferio derecho y manifestaba grandes dificultades para recordar información espacial, sin presentar ninguna alteración para recordar información verbal.

En síntesis, si bien existe un consenso respecto a que la memoria de trabajo está constituida por múltiples componentes, aún no es claro cómo funciona específicamente cada uno de ellos. El por qué no se encuentran diferencias a nivel conductual quizá sea porque en las investigaciones reportadas analizan distintas mediciones y de manera independiente (p. ej., respuestas incorrectas, correctas, errores de omisión y comisión). Esto impide que se pueda comparar a nivel conductual las distintas modalidades de la tarea *N back*. Sin embargo, a nivel de actividad cerebral, podemos concluir que diferentes circuitos neurales están modulando a la memoria de trabajo verbal y a la espacial; esta última más lateralizada al hemisferio derecho, mientras que la primera lo está al hemisferio izquierdo. Sin embargo, para la corteza prefrontal, en quien recaen las funciones del ejecutivo central, se han demostrado actividades específicas, por ejemplo, que el mantenimiento de la información ocurre en regiones ventrolaterales mientras que la manipulación implica regiones dorsolaterales; también para el tipo de información a mantener se han descrito características específicas: la región dorsal de la corteza prefrontal se encarga de mantener información espacial, mientras que una región más ventral, de información verbal.

## **2.4 ¿Qué explica la eficiencia de las personas en su capacidad de memoria de trabajo?**

La memoria de trabajo se manifiesta en todos los humanos y no sólo eso, sino que también está presente, como ya lo dijimos, en animales no humanos. Sin embargo, aunque todos la poseemos, existen diversos matices en esta capacidad entre las personas sanas. ¿Por qué las personas diferimos en la capacidad de memoria de trabajo?

La respuesta a esta pregunta quizá implique las decisiones que la persona fue tomando a lo largo de su exposición al ambiente y por lo tanto, entonces, la repercusión sobre sus genes.

Una aproximación para indagar en qué proporción los genes y el medio ambiente están participando en la expresión de un rasgo, por ejemplo, en la capacidad de memoria de trabajo, es calculando el índice de heredabilidad ( $h^2$ ) para el rasgo. Este índice se utiliza para describir la proporción de varianza fenotípica total de un rasgo debida a la variación genética (Klug, Cummings & Spencer, 2006). Una forma de evaluar la heredabilidad es a través de medir algún rasgo en parejas de gemelos monocigotos (que son 100% idénticos en la estructura de su ADN) y gemelos dicigotos (que son 50% idénticos en la estructura del ADN, Novo, 2007). Entonces, cuando la  $h^2$  es igual a 1, significa que la varianza de ese rasgo se explica más por factores genéticos que por factores ambientales; mientras que si el valor se acerca más a cero significa que la varianza de ese rasgo se explica más por factores ambientales que por factores genéticos.

Blokland et al. (2008) realizaron un estudio para conocer la heredabilidad de la memoria de trabajo y de la actividad cerebral al contestar una tarea *N back* en gemelos jóvenes monocigotos ( $n=29$ ) y dicigotos ( $n=31$ ), todos criados juntos. Los autores reportaron que para la ejecución de la tarea de memoria de trabajo existe una  $h^2=0.72$ , que fue muy similar a la obtenida en la habilidad cognitiva general (medida a través del CI),  $h^2=0.73$  y al de la sustancia gris,  $h^2=0.69$ . Mientras que para la actividad cerebral los autores reportaron una  $h^2=0.30$  en el giro frontal medial izquierdo y de  $h^2=0.14$  en el giro angular derecho. En sentido estricto, apegándonos a esta aproximación, los índices de  $h^2$  nos indicarían que en algunas mediciones los factores genéticos más que los factores ambientales, están explicando la capacidad de las personas al ejecutar una tarea de memoria de trabajo. Sin embargo, es importante mencionar que desde hace ya algún tiempo esta postura no es válida para algunos científicos, pues ante la evidencia de epigenesis sería imposible conocer estas proporciones, hasta incluso pensar que existen

y que pueden expresarse en un dato numérico tal y como lo es el porcentaje.

### **2.4.1 Contribución genética**

En la actualidad se ha tratado de investigar qué genes podrían estar asociados con la modulación de distintas funciones cognitivas, entre ellas de la memoria de trabajo (Cerasa et al., 2008; Brehmer et al., 2009). No sólo es importante conocer qué genes están asociados con la variabilidad en la expresión de la memoria de trabajo, sino también cómo variaciones puntuales en los genes pueden provocar cambios funcionales en las proteínas y, por lo tanto, probablemente un cambio en la expresión de la eficiencia en la memoria.

Un gen es la porción mínima del ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifica para una proteína, sea ésta de tipo estructural (p. ej., colágeno y queratina) o de tipo funcional (p. ej., una hormona o una enzima). Todo rasgo (p. ej., la forma del cabello) depende de la acción **de cuando menos un gen** con dos copias homólogas, que se denominan alelos. Un alelo es cada una de las formas alternativas de un gen, que se diferencian en su secuencia de bases nitrogenadas. Los mamíferos diploides (los cuales poseen un número doble de cromosomas) tienen dos alelos de cada gen, uno de ellos heredado de su padre y el otro de su madre. Si el sujeto hereda el mismo alelo tanto de su padre como de su madre se dice que es homocigoto para ese gen. Si hereda alelos diferentes de cada padre, entonces se dice que es heterocigoto para ese gen. Por ejemplo, el gen que regula la forma del cabello que tendrá un individuo presenta dos alelos. Uno, heredado de su madre, determina que el cabello sea lacio. El otro, heredado de su padre, determina que sea rizado. En este caso el sujeto de nuestro ejemplo expresará la forma del cabello que domine. Cada par de alelos se ubica en un mismo lugar del cromosoma. Por regla general, se conocen varias formas alélicas de cada gen, el alelo expresado con mayor frecuencia en una población se denomina *alelo normal*, o *silvestre*, mientras que los otros más escasos, se conocen como *alelos mutantes* (Plomin, DeFries, McClearn & McGuffin, 2001).

La molécula de ADN, que se encuentra en el núcleo de todas las células a

excepción de los eritrocitos, está compuesta por nucleótidos. Los nucleótidos a su vez, se componen de tres elementos; una de cuatro bases nitrogenadas (adenina, guanina, timina o citosina), una desoxirribosa (un azúcar) y un grupo fosfato. En la población mundial existen variaciones a lo largo de las secuencias de los genes, esto es, en el orden en que están dispuestos los nucleótidos a lo largo del ADN. Estas variaciones constituyen diferentes polimorfismos (múltiples formas de un mismo gen). Un polimorfismo, por ejemplo, puede consistir en el intercambio de un nucleótido por otro, que puede provocar un cambio de aminoácido en la proteína final (p. ej., un intercambio en la primera letra del triplete AUG que codifica para metionina, por GUG, que codifica para valina), a esta variación genética se le llama polimorfismo de un solo nucleótido (por sus siglas en inglés, SNP, *single nucleotide polymorphism*). Otra posibilidad, es que este SNP genere un polimorfismo silente, es decir, en el que no se produzca un cambio en la proteína puesto que el intercambio de los nucleótidos codifica para el mismo aminoácido (p. ej., intercambio del triplete AAA por AAG, ambos tripletes codifican para lisina). Otro polimorfismo ocurre por el número de veces en que se repite una secuencia determinada de ADN, constituyendo minisatélites o microsatélites; p. ej., las repeticiones del codón AAT o CAG. En algunos casos, estas repeticiones pueden tener un efecto funcional importante en el individuo (p. ej., más de 20 repeticiones de CAG en el locus 4p63 se asocia con la presencia de enfermedad de Huntington).

A los cambios poco frecuentes de la secuencia de bases en el ADN en una población no se les llama polimorfismo, sino más bien mutación (Plomin et al., 2001). Para que verdaderamente pueda considerarse como un polimorfismo, la variación debe aparecer al menos en el 1% de la población (Plomin et al., 2001). La importancia de estas variaciones es sustancial, debido a que ocurren en diferentes sitios a lo largo del ADN y es gracias a estas variaciones que la especie humana es tan diferente. Son las responsables de que en todo el mundo no existan genéticamente dos personas iguales a menos de que sean gemelos homocigotos.

No solamente se ha estudiado cómo diversos genes modulan la expresión de rasgos fenotípicamente visibles, sino que también se ha documentado la asociación de

variantes genéticas con variaciones en los rasgos cognitivos. A continuación se describirá evidencia sobre algunas variaciones de genes que se han asociado con variaciones en la capacidad de la memoria de trabajo entre las personas.

### *Gen Catecol-Orto-Metil-Transferasa (COMT)*

La degradación de la dopamina y de la noradrenalina extracelular en el cerebro, pero particularmente en la corteza prefrontal, está mediada principalmente por la enzima COMT (Mattay et al., 2003). Se ha detectado un SNP de la COMT ubicado en la región 22q11 en el humano (Mannisto & Kaakkola, 1999). Este SNP está en el codón 158, en donde ocurre la sustitución de una A por una G. Como consecuencia, esta sustitución genera que el codón, en lugar de codificar para una Metionina (Met, que es la variación silvestre), codifique para una Valina (Val, que es la variación infrecuente). Cuando un sujeto es homocigoto Val para la COMT la actividad de la enzima es cuatro veces mayor con respecto a un sujeto homocigoto para Met (Mannisto & Kaakkola, 1999); en consecuencia, las catecolaminas, particularmente la dopamina, están menos tiempo disponibles en la sinapsis para ser utilizadas por sus receptores.

Egan et al. (2001) compararon la actividad cerebral, a través de IRMf, de sujetos sanos homocigotos de alelos Val con homocigotos Met de la COMT al ejecutar una tarea de memoria de trabajo, se observó que los portadores de Val mostraron una mayor activación de la corteza prefrontal en comparación con los portadores de Met, sin que su eficiencia conductual fuera diferente. Lo cual nos permite pensar que existe un efecto compensador en los cerebros de los sujetos homocigotos para Val.

Mattay et al. (2003) administraron a sujetos con diferente polimorfismo de la COMT (Val/Val, Met/Met y Val/Met) una anfetamina (dextroanfetamina, que es un fármaco que permite que la dopamina esté disponible por más tiempo en las sinapsis) para comprobar si la modificación de la cantidad de dopamina disponible tenía un efecto en la eficiencia de la memoria de trabajo (tarea *N back* con tres niveles de complejidad). Además, se midió la activación cerebral en estos sujetos. Los resultados mostraron que en los sujetos homocigotos Val no hubo diferencias significativas en la

ejecución en ninguno de los niveles de complejidad entre la condición placebo y cuando se les administró el fármaco. Sin embargo, encontraron que la activación de la corteza prefrontal en estos sujetos disminuyó significativamente cuando se les administró el fármaco en comparación con el placebo al ejecutar los niveles de complejidad altos (2 y 3 *back*). En los homocigotos Met se encontró que disminuyeron su eficiencia únicamente al ejecutar la tarea más difícil (3 *back*) cuando se les administró la droga en comparación con la condición placebo; así mismo, se encontró un incremento significativo de la actividad de la corteza prefrontal solamente para este nivel de complejidad bajo el efecto del fármaco; esta actividad de la corteza prefrontal es similar a la que presentan los homocigotos Val en la condición placebo. Estos resultados indican cómo farmacológicamente se puede mover de la homeostasis a las personas en función del polimorfismo que porten de la COMT. De tal forma que a los homocigotos Val se les restituye la función cerebral mientras que a los homocigotos Met el fármaco les genera un desbalance que deteriora su funcionamiento a nivel cerebral y conductual.

#### Gen del receptor a Dopamina 2 (DRD2)

El gen que codifica para el receptor D2 se llama DRD2 y está ubicado en el cromosoma 11 humano (locus 23q, Bertolino et al., 2010).

Zhang et al. (2007) analizaron la ejecución y la actividad cerebral medida a través de IRMf de personas sanas en una tarea de memoria de trabajo (*N back* en nivel de complejidad 0 y 2 *back*) según su genotipo de DRD2 en dos SNP's, uno localizado en el intron 5 (rs2283265, en donde ocurre un intercambio de una G por una T) y otro localizado en el intron 6 (rs1076560, igualmente, ocurre un intercambio de una G por una T), este último asociado a un ensamblaje alternativo del ARNm. Los grupos de personas para cada SNP fueron independientes. En la ejecución, encontraron que las personas con genotipo G/T para el SNP rs2283265 tuvieron una ejecución menor en comparación con las personas G/G en la tarea 2 *back*. No se encontraron resultados conductuales significativos para el SNP rs1076560. En la IRMf encontraron que las personas con genotipo G/T para el SNP rs2283265 tuvieron una mayor activación en el

caudado, en el giro frontal inferior, en el giro temporal superior izquierdo y en el cíngulo posterior derecho en comparación con las personas G/G. Para el SNP rs1076560 encontraron que las personas G/T tuvieron mayor activación que las personas G/G en el caudado de manera bilateral, en el giro frontal medial izquierdo, en el giro precentral izquierdo, en el giro del cíngulo anterior izquierdo, en el tálamo izquierdo y en el giro frontal superior izquierdo. Estos resultados sugieren que los dos SNP's intrónicos: el rs2283265 y el rs1076560, están asociados con el ejercicio de la memoria de trabajo. El primero asociado a nivel conductual y a nivel de actividad cerebral en donde ser portador de G/T se traduce en una menor ejecución y una mayor demanda en la actividad cerebral. Y el segundo, aunque no se asocia con los resultados conductuales, demanda a las personas heterocigotas más actividad cerebral especialmente en el estriado, sugiriéndonos un efecto de compensación en el cerebro de estas personas.

#### *Gen del transportador a dopamina 1 (SLC6A3)*

Brehmer et al. (2009) investigaron qué efecto tiene el entrenamiento en la capacidad de memoria de trabajo según el genotipo del DAT1 (transportador a dopamina 1) de personas jóvenes. Ellos dividieron a la muestra en dos grupos: uno incluyó a todos los que tuvieran al menos un alelo 9 y se compararon con los homocigotos para el alelo 10. El entrenamiento consistió en resolver siete tareas diferentes de memoria de trabajo (visuales y verbales) durante 25 minutos por cuatro semanas. Antes del entrenamiento ambos grupos ejecutaron igual. Después del entrenamiento ambos grupos ejecutaron igual únicamente en la primera y en la segunda semana de entrenamiento. En la tercera y cuarta semana se observó un cambio significativo a favor del grupo de portadores del alelo 9, solamente en las tareas de memoria de trabajo espacial. Esto significa que, si bien el genotipo antes del entrenamiento no estaba asociado con la conducta, posteriormente, solamente en este genotipo se plasma la contribución del medio ambiente mejorando la eficiencia en la memoria de trabajo. La relevancia de esta investigación radica en que existen casos en los que el genotipo por sí mismo no está asociado con la variabilidad en la capacidad de memoria de trabajo, sin embargo, cuando el medio ambiente interactúa con el genotipo

(por ejemplo, a través de un entrenamiento), éste es fundamental para que la influencia del medio pueda surgir.

#### *Gen de la Mono Amino Oxidasa A (MAO-A)*

Cerasa et al. (2008) compararon la ejecución y la actividad cerebral de un grupo de 30 hombres sanos en una tarea de memoria de trabajo espacial (*N back*) según su genotipo de MAO-A (enzima que degrada a las monoaminas). Los resultados mostraron que ambos grupos, portadores del alelo MAO-A de alta y baja actividad no difieren en la ejecución de la tarea. Sin embargo, existe una diferencia significativa entre ambos grupos en la actividad de la corteza prefrontal ventrolateral durante la ejecución de la tarea. Los individuos que portan la variante alélica MAO-A de alta actividad muestran una reducción en la actividad de la corteza prefrontal ventrolateral comparados con los sujetos portadores de la variante alélicas MAO-A de baja actividad.

#### *Gen del Receptor a Cannabinoides 1 (CNR1)*

El gen CNR1 codifica para el receptor CB1 y está ubicado en el cromosoma 6 humano (locus 6q14–q15; Zhang et al., 2004). Se han encontrado diversos polimorfismos en el gen CNR1 en el humano. Uno de ellos consiste en la repetición del triplete AAT. En la actualidad aún no se sabe qué es lo que hace este polimorfismo en términos funcionales sobre el receptor, sin embargo, se cree que podría estar involucrado en la traducción del ARNm y en la estabilidad de la proteína (Shen et al., 1999; Zhang et al., 2004), modificando probablemente, la expresión de un rasgo particular. Son escasas las investigaciones que se han hecho al respecto de su asociación con la función cognitiva; en humanos, hasta donde es de nuestro conocimiento, sólo existe un estudio (efectuado con adictos a drogas de abuso) en el cual se evidencia el efecto de este polimorfismo del gen CNR1 sobre la atención (Johnson et al., 1997). Johnson et al. (1997) utilizaron PREs en sujetos con adicción a diversas drogas (p. ej., alcohol, anfetaminas, marihuana, ácido lisérgico, heroína, cocaína), a fin de detectar cómo es la respuesta del componente P300 (asociado a la respuesta de atención) en función del número de repetidos del codón AAT del CNR1 que portaban los sujetos. Estos investigadores encontraron que los



sujetos adictos homocigotos con 5 o más repetidos del triplete AAT ( $AAT \geq 5$ ) tuvieron un decremento en la amplitud del componente P300, principalmente en los electrodos frontales, en comparación con los sujetos portadores de al menos un alelo con menos de 5 repetidos ( $AAT < 5$ ). Si bien este marcador electrofisiológico -P300- sugiere que existe una disminución en la capacidad de atención, esto no ha sido corroborado conductualmente. Estos hallazgos sugieren que la eficiencia o la deficiencia en la atención puede estar asociada con este polimorfismo del gen CNR1, al menos en personas con adicción. Así mismo, nos lleva a sugerir que este polimorfismo del gen CNR1 también está involucrado en la modulación de la memoria de trabajo, debido a que se ha documentado que el componente P300 es un reflejo de la actividad cerebral durante la codificación de la información de la memoria de trabajo (Linden, 2005; Bledowski et al., 2006; Otero, Pliego-Rivero, Porcayo-Mercado & Mendieta-Alcántara, 2008).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque la memoria de trabajo es una capacidad compartida por todos los seres humanos, existen variaciones en la manera en que cada individuo manifiesta esta capacidad. En la actualidad, se han asociado diversas variaciones genéticas con las variaciones en la capacidad de memoria de trabajo entre los individuos. Por ejemplo, el polimorfismo AATn del gen CNR1 se ha asociado con variaciones en la capacidad de atención en sujetos adictos a drogas de abuso (Johnson et al., 1997), por esto, podríamos suponer que existe una asociación de este polimorfismo del gen CNR1 con las variaciones en la eficiencia de memoria de trabajo, debido a que la atención es necesaria para que ocurra la memoria de trabajo. Este supuesto también se sustenta con las múltiples evidencias que indica que el uso del  $\Delta 9$ -THC en humanos y en ratas afecta a la memoria de trabajo (p. ej., Jentsch et al. 1997; Bolla et al., 2002; Ilan et al., 2004; Egerton et al., 2006; Curran et al., 2002). Y también, por la abundante expresión del receptor CB1 en estructuras involucradas con procesos de memoria de trabajo, como la corteza prefrontal (p. ej., Egertova & Elphick, 2000; Pattij et al., 2008; Svíženská et al., 2008). Así mismo, el hecho de que el procesamiento de la información verbal y espacial activen diferentes zonas cerebrales al resolver una tarea de memoria de trabajo (Owen et al., 2005), apunta a que el polimorfismo del CNR1 pueda asociarse diferencialmente con cada sistema de memoria, *verbal y espacial*, debido quizá a la distribución diferencial del receptor CB1 (Svíženská et al., 2008; Burns et al., 2007). Por ello, la problemática que deseamos resolver es si el polimorfismo AATn del gen CNR1 está asociado con la variación en la capacidad de memoria de trabajo que poseen las personas y si así fuera, si existen diferencias en su asociación con la memoria de trabajo espacial y verbal.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:**

¿Existe una asociación entre el polimorfismo AATn del gen CNR1 y la eficiencia de la memoria de trabajo espacial y verbal en humanos jóvenes?

#### **5. HIPÓTESIS:**

Los portadores de al menos un alelo con menos de 5 repetidos del triplete AAT (AAT<5) del gen CNR1 tienen una eficiencia mayor en su memoria de trabajo (verbal y espacial), en contraste con los sujetos homocigotos con más de 5 repetidos del triplete AAT.

El genotipo de los sujetos se asocia diferencialmente con la eficiencia en la memoria de trabajo verbal y la memoria de trabajo espacial.

##### *Objetivos:*

Conocer si el polimorfismo AATn del gen CNR1 se asocia con la memoria de trabajo en jóvenes sanos.

Determinar si el polimorfismo AATn del gen CNR1 se asocia diferencialmente con la memoria de trabajo espacial y verbal.

## 6. MÉTODO

### 6.1 Participantes

Participaron 94 jóvenes de entre 21 y 30 años de edad ( $\bar{x} \pm DE = 23.77 \pm 2.72$ , 48 fueron hombres). Todos los participantes cubrieron los siguientes criterios de inclusión: no haber consumido alguna droga ilícita en toda su vida (ver el apartado *Cuestionario sobre el consumo de Sustancias Psicoactivas*), no consumir actualmente algún tipo de droga o medicamento que altere al sistema nervioso central, salvo nicotina, cafeína o alcohol; no estar o haber estado diagnosticados con algún tipo de enfermedad neurológica o psiquiátrica, o tener a algún familiar en línea directa (padres o hermanos) con algún antecedente neurológico o psiquiátrico; ser diestro (obtener un puntaje mayor o igual a +40, evaluado a través del Inventario de Edimburgo); tener como mínimo 12 años de estudio; tener una visión normal o corregida; tener un puntaje equivalente a un coeficiente intelectual (CI) normal homologado a través de la subescala verbal de la Escala de Inteligencia para Adultos de Wechsler para población mexicana en su versión revisada WAIS-R; ausencia de depresión (evaluada a través del Inventario de Depresión de Beck) y de ansiedad (valorada a través del Inventario de Ansiedad de Beck) al momento de llevar a cabo los experimentos.

### 6.2 Instrumentos

#### *Cuestionario de Datos generales*

Es un cuestionario utilizado para recabar datos del sujeto como nombre completo, edad, fecha de nacimiento, teléfono -local y celular-, dirección, dirección de correo electrónico, escolaridad, carrera, número total de años de estudio, también se le pregunta si en él o en sus familiares directos se ha presentado alguna patología neurológica o psiquiátrica. En este cuestionario se registró la fecha y el horario en que el sujeto acudió al experimento. El día de la sesión experimental se anotó el peso y la estatura del sujeto.

### *Cuestionario sobre el consumo de Sustancias Psicoactivas*

Es un cuestionario que sirve para explorar el consumo de diversas drogas a lo largo de la vida de una persona. Las drogas exploradas fueron: estimulantes, cocaína, narcóticos, alucinógenos, inhalantes, marihuana, tranquilizantes u otras sustancias de abuso. El sujeto únicamente respondió "SÍ" o "NO" en cada grupo de drogas. Las personas que respondieron positivamente a cualquier droga, excepto marihuana, fueron descartadas del estudio. Únicamente se permitió haber consumido marihuana máximo en tres ocasiones en toda su vida y no haberla consumido en los últimos 12 meses previos a su participación en esta investigación.

### *Inventario de Edimburgo*

Este inventario se compone de 10 preguntas que evalúan qué región del cuerpo, si derecha o izquierda, se utiliza preferentemente para realizar diversas actividades. Por ejemplo se le pregunta al sujeto: ¿con qué mano te lavas los dientes? o ¿con qué pie pateas un balón? La persona debe contestar a cada una de las preguntas eligiendo de entre cinco opciones, la que más se ajuste a su uso preferente: derecha muy preferente, derecha preferente, lado indiferente, izquierda preferente e izquierda muy preferente. Para obtener el grado de preferencia manual se realiza la siguiente operación aritmética: sumatoria de las respuestas seleccionadas para la mano derecha menos la sumatoria de las respuestas seleccionadas para la mano izquierda, el resultado se divide entre la sumatoria de las respuestas seleccionadas para la mano derecha menos la sumatoria de las respuestas seleccionadas para la mano izquierda. El resultado de la división se multiplica por 100. Obtener un puntaje menor o igual a -40 indica que el sujeto es totalmente zurdo. Un puntaje entre -39 y +39 indica que el sujeto es ambidiestro. Y un puntaje de +40 indica que el sujeto es totalmente diestro. Las personas que obtuvieron puntajes que indican ser ambidiestros o zurdos se excluyeron del estudio.

*Subescala verbal de la Escala de Inteligencia de Wechsler para Adultos (WAIS) para población mexicana, en su versión revisada, WAIS-R*

El WAIS se divide en dos escalas: escala verbal y escala de ejecución (no-verbal), cada una de ellas se subdivide y se evalúa con diferentes subescalas. En la escala verbal existe una subescala que hace referencia al vocabulario que posee el sujeto. Esta subescala se correlaciona con el Coeficiente Intelectual General del WAIS y con otras pruebas de inteligencia. En la presente investigación se aplicó únicamente la subescala de vocabulario, debido a que nos da información similar al Coeficiente Intelectual General del WAIS. Solamente las personas que puntuaron arriba de 7 en la escala normalizada (equivalente a un rango de coeficiente intelectual entre 90 y 110) fueron incluidas en el estudio.

*Inventario de Depresión de Beck*

Es un instrumento de lápiz y papel autoaplicable, diseñado para evaluar la severidad con que se presentan las categorías sintomáticas y conductuales de la depresión en un sujeto: ánimo, pesimismo, sensación de fracaso, insatisfacción, sentimientos de culpa, sentimientos de castigo, autoaceptación, autoacusación, ideación suicida, llanto, irritabilidad, aislamiento, indecisión, apetito, pérdida de peso, preocupación somática y pérdida del interés sexual. Se compone de 21 grupos de frases, cada grupo posee cuatro oraciones que evalúan un síntoma. Dentro de cada grupo, la persona debe escoger la oración que se apegue más a cómo se ha sentido en las últimas dos semanas incluyendo el día de la aplicación. A cada frase le corresponde una puntuación (el número anotado al principio de cada frase) entre 0 y 3 puntos; cero significa ausencia del síntoma y 3, la máxima severidad. Para calificar el inventario únicamente se suma el puntaje dado en cada frase. Una persona sin rasgos depresivos obtiene un puntaje máximo de nueve puntos. Sumar 10 o más puntos indica presencia de rasgos depresivos en las últimas dos semanas. Las personas que obtuvieron un puntaje de 10 o más se excluyeron de la investigación.

### Inventario de Ansiedad de Beck

Este inventario también es de lápiz y papel y es autoaplicable. Se compone de 21 reactivos que describen diversos síntomas somáticos relacionados con la ansiedad, por ejemplo: parestesias, calor, dificultad para relajarse, terror, sensación de ahogo, miedo a morir e indigestión. Cada reactivo se puntúa entre 0 y 3; 0 significa una frecuencia de "poco o nada"; 1 significa "más o menos"; 2 "moderadamente" y 3 "severamente". El sujeto debe responder a los síntomas que ha experimentado durante la última semana, incluyendo el día mismo de la aplicación. La puntuación total es la suma de todos los reactivos. Un puntaje equivalente a ocho o más indica la presencia de rasgos de ansiedad en los sujetos. Para este estudio las personas con un puntaje mayor o igual a ocho fueron descartadas de la investigación.

### **6.3 Materiales y aparatos**

Los experimentos se realizaron en una computadora laptop Acer Aspire 5920 Core Duo con 1.2 GHz. Los estímulos y la adquisición de las respuestas se controlaron con el Software E-Prime v.1.2 (Psychology Software Tools, Inc). La adquisición de las respuestas se hizo a través de dos cajas de respuestas conectadas a la laptop vía puerto USB, una caja fue para que el sujeto respondiera con la mano derecha y la otra para que respondiera con la mano izquierda. Las cajas de respuesta son prismas rectangulares de plástico color gris de 3 cm de ancho x 9 cm de largo x 2 cm de altura, cada una posee dos botones adaptados para colocar el dedo índice y el dedo medio de cada mano. De tal manera que un botón está dispuesto más arriba que otro en cada caja. Los botones son cuadrados de 5 mm por lado de color negro, con una separación entre cada botón de un centímetro.

### **6.4 Procedimiento**

El procedimiento se dividió en dos sesiones: a) Entrevista inicial (para determinar que los participantes cubrieran los criterios de inclusión); b) Sesiones experimentales (se realizaron dos sesiones experimentales porque los sujetos respondieron a un total de

siete tareas, incluyendo las que se reportan en la presente tesis. El orden de las siete tareas se contrabalanceó entre los sujetos a fin de evitar un efecto de orden que pudiera explicar los resultados). A continuación se describe cada una de las sesiones:

**a) *Entrevista inicial:*** consistió en realizar una entrevista estructurada en donde se aplicaron diversos instrumentos: Cuestionario de Datos generales, Cuestionario sobre el consumo de sustancias psicoactivas, Inventario de Edimburgo y la subescala de vocabulario del WAIS-R. Si el participante cubría los criterios de inclusión se le pedía que firmara una Carta de Consentimiento Informado, en la cual se especificaba claramente en qué consistía su participación en la investigación; y también, se le indicaba que sería necesaria una donación de una muestra de ADN (que sería a través de sangre o de saliva). También, en esta carta de consentimiento se le indicaba que su participación en el estudio era completamente voluntaria, que sus datos tendrían un uso confidencial y únicamente serían usados con fines de investigación para reportes en congresos, en artículos originales y en Tesis. Una vez que el participante estuvo de acuerdo con lo estipulado en la carta y aceptaba participar, se concertaba una cita para la realización de las sesiones experimentales.

**b) *Sesiones experimentales:*** Las sesiones experimentales se llevaron a cabo en dos días consecutivos, en el mismo horario cada una (en uno de tres turnos diferentes: 10, 13 y 16 hrs), con una duración aproximada de 120 minutos, en un cuarto de experimentación aislado, sin ruido y con luz tenue, en el Laboratorio de Neurogenómica Cognitiva (ubicado en el No. 5 del sótano del edificio C de la Facultad de Psicología de la UNAM). Las dos tareas experimentales de memoria de trabajo (versión verbal y versión espacial de la tarea *N back*) evaluadas en la presente tesis se realizaron un día diferente cada una. La versión de la tarea *N back* así como el nivel de complejidad se contrabalanceó entre los participantes. En la segunda sesión experimental los participantes donaron una muestra de ADN. Antes de iniciar con la primera sesión experimental, se aplicaron los Inventarios de Depresión y Ansiedad de Beck. Si el participante cubría los criterios para iniciar con



el experimento, entonces, se le pedía que ingresara al cuarto experimental. Ahí, el sujeto se colocó cómodamente en una silla de respaldo alto a una distancia de 1 m del monitor para contestar a las tareas en computadora. A continuación se describen las dos versiones de la tarea *N back*.

Tarea *N back* verbal:

La tarea se realizó en tres diferentes niveles de complejidad (0, 2 y 3 *back*).

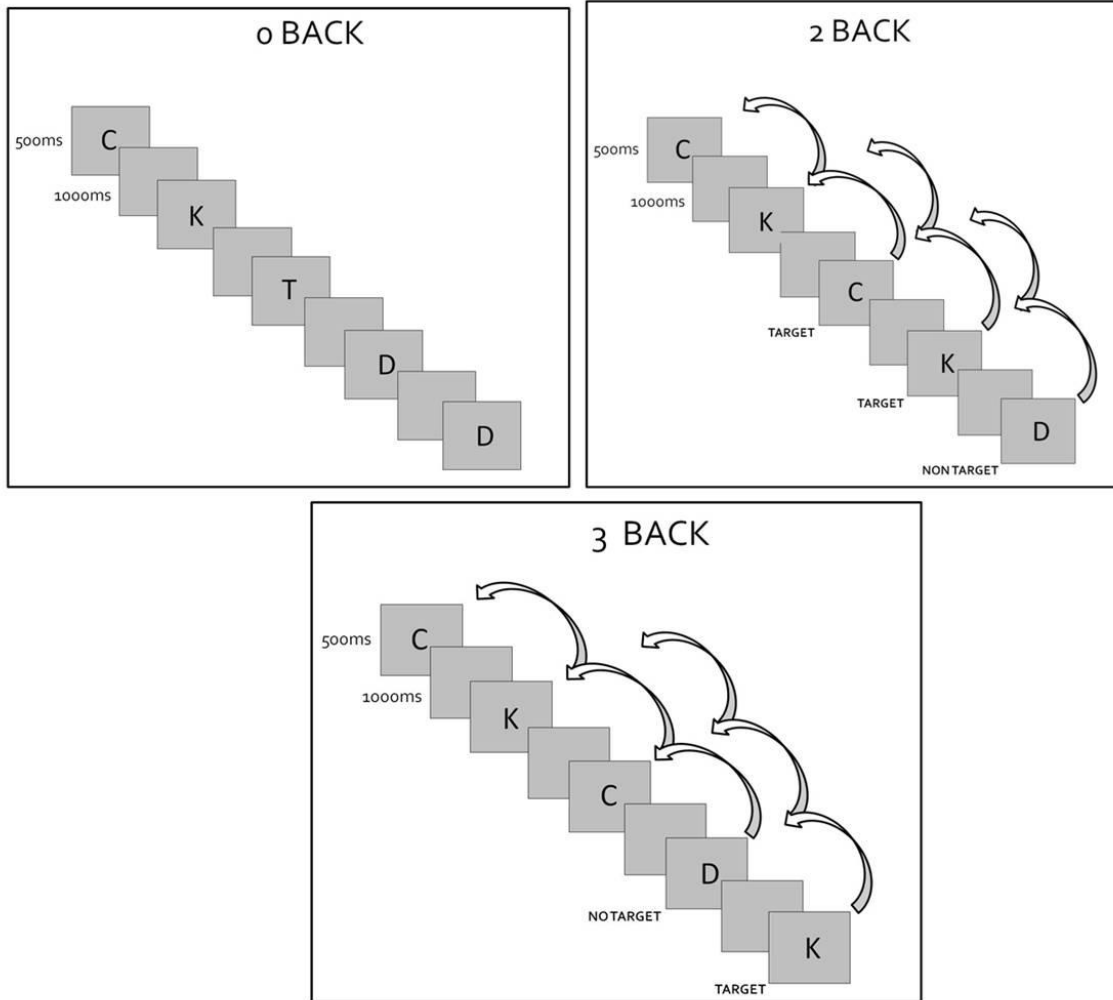
**Estímulos.** Los estímulos utilizados fueron ocho letras del alfabeto en español con un solo fonema: B, C, D, G, K, P, Q y T, a fin de que los estímulos fueran fonológicamente comparativos. Todas las tareas iniciaban con las instrucciones. Inmediatamente después, se presentaba una letra de color gris oscuro por 500 msec en el centro de la pantalla sobre un fondo gris claro. Posteriormente aparecía una pantalla vacía del mismo tono gris, por 1000 msec, de tal manera que el participante tenía 1500 msec para ejecutar su respuesta; el conjunto de la presentación de la letra seguida por la pantalla en gris claro conformaba un ensayo. Entre cada ensayo, había un intervalo de tiempo, que variaba según la complejidad de la tarea.

- a) **Cero *back*.** El participante debía responder a través de las cajas de respuesta inmediatamente después que detectara la aparición de la letra sobre la pantalla (*figura 3*). Este nivel representa una tarea de tiempo de reacción simple, en que se detecta el tiempo que tarda un sujeto en responder ante la presentación de un estímulo. En esta tarea no se involucra la capacidad de memoria de trabajo, ya que al sujeto no se le está indicando que mantenga, manipule o actualice la información. Esta tarea se compuso de 120 ensayos, el intervalo entre cada uno de ellos fue aleatorio (1500 msec en promedio), a fin de que no hubiera una habituación del sujeto para predecir la presentación del siguiente ensayo. El participante respondió el 50% de los ensayos con el dedo índice izquierdo y el otro 50% con el dedo índice derecho.
- b) **Dos *back*.** Se presentaron las letras de la misma manera que en el nivel *cero back*, con la diferencia de que el participante contestó en cada ensayo si la letra que estaba viendo en ese momento era igual o diferente a dos letras atrás (*figura 3*).

En esta tarea también fueron 120 ensayos. El intervalo entre ensayos fue de 1000 mseg. Para este nivel (y para el siguiente nivel de complejidad) se presentaron dos diferentes tipos de estímulos, *target* y *non-target*. Los estímulos *target* fueron aquellos en que la letra del ensayo actual fue igual a la presentada dos ensayos atrás; mientras que los ensayos *non-target* fueron aquellos en que la letra del ensayo actual fue diferente a la presentada dos ensayos atrás. Se presentaron 24 ensayos *target* y 96 *ensayos non-target* dispuestos de manera semialeatoria. De manera contrabalanceada entre los sujetos, el 50% de ellos respondió al *target* con la mano derecha mientras que el otro 50% lo hizo con la mano izquierda.

- c) **Tres *back***. Esta tarea fue igual que la tarea 2 *back*, a excepción de que el sujeto debió contestar si la letra que estaba viendo en ese momento era igual o diferente a *tres* letras atrás (*figura 3*).

# TAREA N BACK



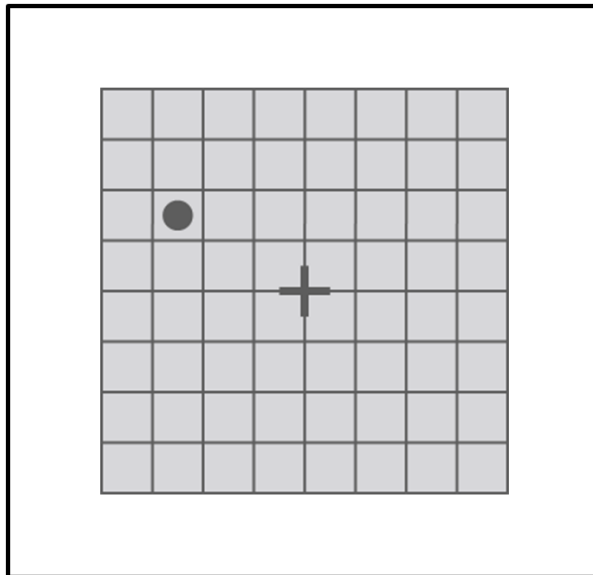
**Figura 3.** Tarea N back verbal. Consiste en presentarle al sujeto una sucesión de letras. En la tarea 0 back el sujeto contestó inmediatamente después de que apareció la letra. En los niveles de complejidad 2 y 3 back la tarea del sujeto fue decidir si la letra del ensayo actual fue igual (target) o diferente (no-target) que la letra que vio N ensayos atrás.

## Tarea N back espacial:

Igualmente se emplearon tres diferentes niveles de complejidad (0, 2 y 3 back).

**Estímulos.** El estímulo fue un punto ubicado dentro de una matriz de 8x8 casillas, de tal manera que había un total de 64 casillas. En medio de las cuatro casillas centrales (2x2) había una cruz que funcionó como punto de fijación, indicando a

los sujetos que mantuvieran su mirada fija en él (*figura 4*). La manera en que el punto se ubicó dentro de la matriz tuvo tres restricciones, la primera fue que el punto únicamente se podía ubicar en 60 casillas de las 64 disponibles (las cuatro casillas que rodeaban el punto de fijación no se ocuparon), la segunda fue que el punto únicamente se ubicaría dos veces en la misma casilla (de las 60 disponibles) a lo largo de toda la tarea, esto ocurrió de manera semi-aleatoria; y la última restricción fue que el punto que precede a otro punto no podía estar en las seis casillas circundantes. Todas estas restricciones tuvieron la finalidad de evitar confusiones para los sujetos.



**Figura 4.** Matriz de 8x8 casillas en la que se presentaron los estímulos de la tarea *N back* espacial.

a) **Cero, dos y tres *back*.** La manera de responder y la manera en que se presentaron los ensayos fue igual que en la tarea *N back* verbal.

En las dos versiones de la tarea *N back* se registraron los tiempos de reacción y el porcentaje de respuestas correctas para cada participante. Además, se calculó la tasa de aciertos ajustada (TAA; por sus siglas en inglés, *AHR*, *Adjusted Hit Ratio*, Abi-Darham et al., 2001; ver página 35).

## 6.5 Análisis genético

La muestra de saliva para la genotipificación de los sujetos se procesó a través del Kit de recolección de DNA-Genotek (Oragene-DNA, Inc.). En el caso de la muestra de sangre se emplearon tubos BD Vacutainer con K3 EDTA. Todas las muestras fueron sometidas a purificación, a análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*), a secuenciación del ADN y a análisis de fragmentos.

### *a) Purificación*

Lo primero que se hizo fue purificar el ADN a través de sangre o de saliva, es decir, se aisló el ADN de todas las demás sustancias que existen en la sangre y en la saliva. Esto se hizo de la siguiente forma: se incubó la muestra a 50°C en baño maría o incubadora mínimo 1 hora; después se dividieron los 4 *ml* de muestra en cuatro alícuotas de 1 *ml* y se adicionaron 40 *ml* por tubo de *Oragene Purifier* y se mezcló por inversión. Posteriormente se incubaron los tubos durante 10 minutos en hielo y después se centrifugaron los tubos 3 minutos a 15000 x g (13000 *rpm*); después se tomó el sobrenadante de cada tubo y se colocó en otro tubo de 15 *ml* y se adicionaron 4 *ml* de etanol al 95% y se mezcló por inversión; luego se invirtió cinco veces más y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron por 10 minutos a 1100 x g (3500 *rpm*); luego se desechó el sobrenadante sin perder la pastilla de ADN que se almacenó en el fondo de la alícuota y se quitó el mayor etanol posible. Una vez retirado todo el etanol, se disolvió la pastilla de ADN en 500 *ml* de buffer TE © (de ADN rehidratado de 20-200 *ng/ml*); para disolver el ADN totalmente se agitó en el vórtex y posteriormente se incubó durante una hora mínimo. Por último, se realizó la cuantificación del ADN y se revisó la calidad del mismo por dos métodos distintos, a través del corrimiento de geles de agarosa y a través del espectrofotómetro *Nano Drop ND-1000*. Para conocer la concentración de ADN se realizaron los siguientes pasos: se sacó la muestra del refrigerador y se colocó en el vórtex. Después se prendió y limpió el *Nano Drop*, y se registró el número de la muestra (p. ej., 1001), con una pipeta se

tomaron 2  $\mu$ l de solución y se colocaron en el aparato. Inmediatamente después, el *Nano Drop* indica el resultado. Además de informar la concentración de ADN (ng/ $\mu$ l), el *Nano Drop* indica cuál es el pico máximo de absorción del ADN en cada una de las muestras. Una característica universal del ADN es que absorbe de 230 a 290, siendo su pico máximo de absorción de 260nm. Este dato es muy importante porque podemos identificar a través de él que el ADN está en condiciones óptimas para realizar cualquier análisis posterior (p. ej., PCR o análisis de fragmentos).

Después de medir la concentración de ADN en cada una de las muestras se realizó una PCR para amplificar nuestra región de interés (el gen CNR1). También se realizó el método de análisis de fragmentos y una reacción de secuenciación, ambos para analizar los genotipos del polimorfismo AATn del gen CNR1. A continuación se describe para qué se utilizaron y en qué consiste la PCR y la técnica de reacción de secuenciación. Los análisis de fragmentos no se describen debido a que se realizan igual que una PCR normal con la única diferencia de que se utiliza un *primer* marcado y a que los resultados obtenidos fueron iguales a los de la reacción de secuenciación, de hecho esos resultados se validan con los resultados obtenidos en la secuenciación, debido a que esta última técnica es un estándar de oro.

*b) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)*

La PCR es una técnica de biología molecular que sirve para amplificar un fragmento de ADN particular. La utilidad de realizar esta amplificación, es que resulta mucho más fácil identificar con una alta probabilidad una región específica del ADN, en el caso de la presente tesis, realizar la PCR nos permite aislar y amplificar el gen CNR1 para posteriormente poder analizar los polimorfismos del gen.

Para realizar una PCR se requieren los siguientes reactivos:

- I. Tubos o placas para PCR.
- II. Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs). Son el sustrato para polimerizar nuevo ADN.
- III. Dos cebadores (o *primers*). Son oligonucleótidos que delimitan la zona de ADN a amplificar. Cada uno de ellos es complementario a una de las dos hebras del ADN (5' a 3' y 3' a 5'). El *primer forward* (FWD) delimita en dónde se empezará a amplificar y el *primer reward* (RWD) delimita dónde debe terminar la amplificación.
- IV. Iones divalentes. Se suele usar cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), o algún otro catión divalente. Funciona como cofactor de la ADN polimerasa.
- V. Una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- VI. ADN polimerasa. Enzima que sirve para incorporar los nucleótidos. La más común es la Taq polimerasa.
- VII. Una muestra de ADN a analizar.
- VIII. Un termociclador. Aparato que sirve para mantener y ciclar las diferentes temperaturas necesarias para realizar la PCR.

Para realizar una PCR se necesita preparar una placa para PCR, en la que se colocan todos los reactivos mencionados. Debido a que la concentración de ADN fue distinta en todas las muestras, se aplicó la siguiente fórmula ( $[C1][V1]=[C2][V2]$ , donde: C1= concentración uno, V1= volumen uno, C2= concentración dos, V2= volumen dos) para conocer qué cantidad de ADN se necesitaba y qué cantidad de agua (que se utiliza para diluir el ADN) se requería para igualar las concentraciones de ADN en todas las muestras.

Las condiciones PCR que utilizamos se muestran en la Tabla 5 (Columna 2, 1X [25 µl]). Se inició con un volumen de 25 uL para estandarizar la reacción y no desperdiciar tantos reactivos, una vez que se observó que esta primer PCR salía bien entonces se decidió duplicar el volumen de reacción para obtener mayores rendimientos de amplificación (Columna 3 de tabla 5, 1x [50 µl]). Es importante notar que la cantidad de la Taq polimerasa no se duplica debido a que es una enzima muy eficiente y resiste el

doble de cantidad para realizar eficientemente su trabajo. Estas cantidades son las necesarias para realizar una sola muestra, como fueron 94 muestras, calculamos la cantidad necesaria para ellas (Columna 4 de tabla 5, 94x [50 µl]).

Después de calcular las condiciones para la PCR se preparó la placa de PCR para meterla al termociclador. La placa se preparó de la siguiente manera: se colocó en cada uno de los pozos de la placa la cantidad correspondiente de nuestra mezcla 94x (50µl) con su cantidad correspondiente de ADN. Esto se hizo para cada una de las muestras, de tal manera que utilizamos 94 pozos de los 96 que tiene la placa.

**Tabla 5.** Condiciones para la PCR, la columna 3 muestra las cantidades necesarias para realizar una muestra, mientras que en la columna 4 se muestran las cantidades para las 94 muestras del presente estudio.

ELEMENTO	CANTIDAD 1X (25 µl)	1x (50 µl)	94x (50 µl)
Buffer (10 x)	2.5 µl	5 µl	470 µl
Cloruro de magnesio (MgCl 50 mM)	0.75 µl	3 µl	282 µl
DNTP's 10 mM	0.5µl	4 µl	376 µl
PRIMERS FWD	1.25µl	2.5 µl	235 µl
PRIMERS RWD	1.25µl	2.5 µl	235 µl
ADN	Variable	-	-
Taq polimerasa	0.2 µl	0.2 µl	18.8 µl
Agua	14.3 µl	28.8 µl	2707.2 µl
Volumen final de la reacción	25 µl	50 µl	4324 µl

En cuanto estuvo lista la placa se selló con mica adherente y la metimos al termociclador. Las condiciones que utilizamos en la PCR fueron: 95 °C 10 min, 30 ciclos de 95 °C 45 segundos, 56 °C 45 segundos, 72 °C 1 minuto y un ciclo de 72°C 7 minutos. Lo que le sucede a la muestra cuando está dentro del termociclador es que se separa la cadena de ADN (desnaturalización), los *primers* (FWD y RWD) hibridan una región específica de cada una de estas cadenas (alineamiento) y la Taq polimerasa une cada uno de los dntp's (desoxinucleótidos) con el nucleótido complementario



correspondiente al ADN original (elongación). Estos tres pasos ocurren a diferentes temperaturas, es el ciclo de temperaturas a las cuales está programado el termociclador de tal manera que estos ciclos se repiten periódicamente.

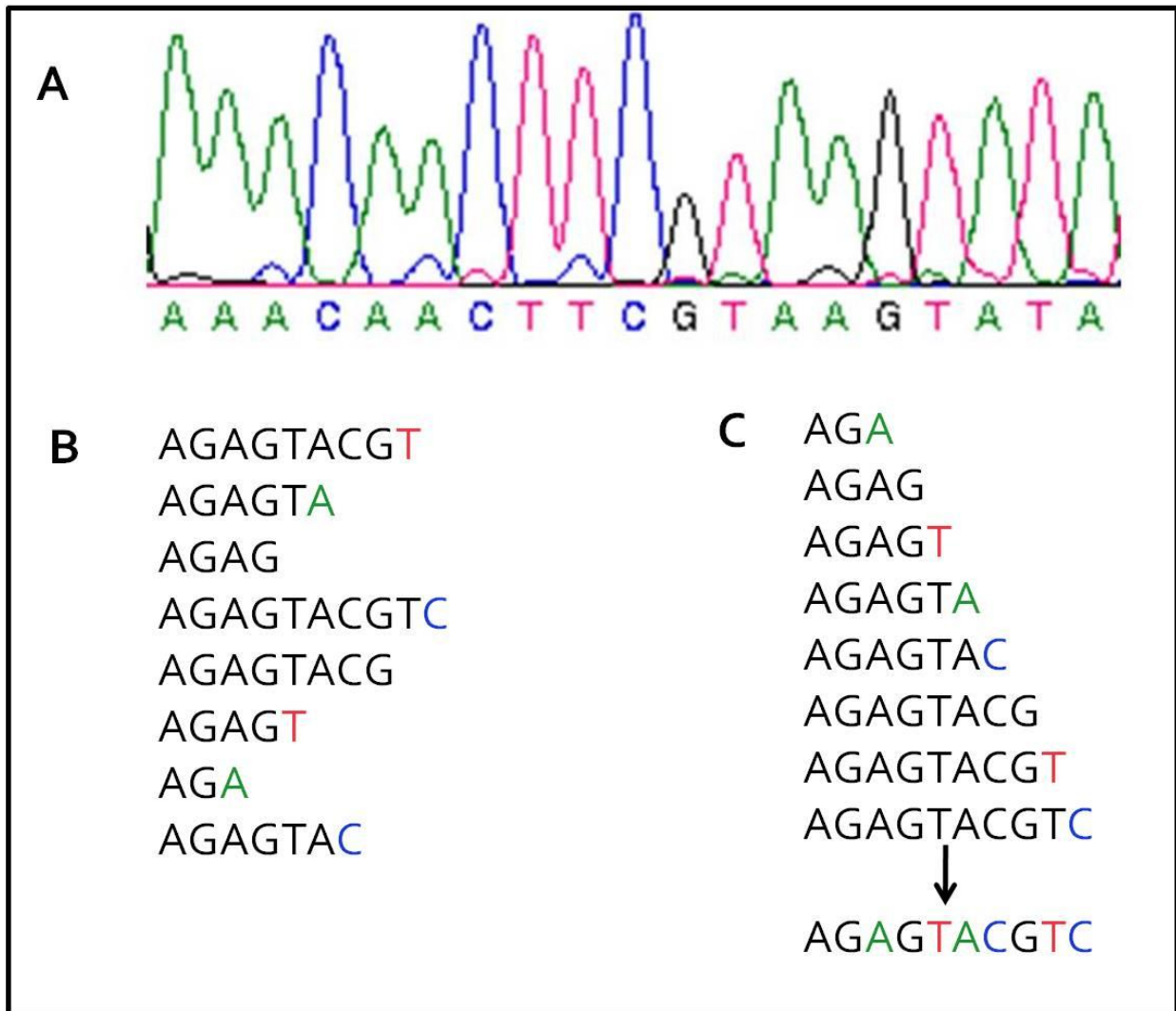
Después de realizar la PCR se corrió un gel de Agarosa que nos indicó el peso molecular del ADN que amplificamos. Es muy importante realizar este paso porque nos permite corroborar que verdaderamente el gen de nuestro interés se encuentra entre el fragmento amplificado. Esto lo sabemos porque previamente investigamos el número de pares de bases que contiene el gen de interés, entonces se hace una comparación de los pesos moleculares de ambos.

### *c) Secuenciación del gen amplificado*

Esta técnica nos revela el orden específico de nucleótidos que conforman al gen, a través de un electroferograma (*figura 5*). El método está basado en el uso de didesoxinucleótidos (ddNTP) que se diferencian de los desoxinucleótidos (dNTP) en que carecen del grupo OH en el carbono 3' de la desoxiribosa. Es en el grupo OH en posición 3' donde se incorpora el siguiente nucleótido de la cadena que se está sintetizando, formando enlace fosfodiéster entre el 3' OH y 5' OH del nuevo. Al no existir en los ddNTP el grupo OH en 3', no permite la incorporación de un nuevo nucleótido y la elongación en la PCR se detiene. Adicionalmente a la carencia del 3'OH, los ddNTP's tienen acoplado un fluorocromo particular dependiendo del nucleótido.

Entonces, durante la reacción, los ddNTPs compiten con los dNTPs por unirse a una de las bases que conforman las cadenas de ADN que se están duplicando, si es un ddNTPs el que se pega en la cadena, esa cadena finalizará su replicación, debido a que ya no habrá un grupo OH en 3' para permitir la incorporación de un nuevo nucleótido. De esta manera, al finalizar el procedimiento tendremos bastantes fragmentos de ADN con diferentes longitudes, según en donde las hayan terminado los ddNTPs. Cada fragmento tendrá un color determinado dependiendo de la base que esté en la posición terminal (verde para adenina, azul para citosina, negro para guanina y rojo para timina, *figura 5, B*). Posteriormente, los fragmentos se separan por electroforesis capilar. El

equipo que se utilizó posee 96 capilares, los cuales tienen en un extremo un electrodo negativo y al otro extremo del equipo hay un electrodo positivo. Lo que hace el equipo es inyectar automáticamente cierta cantidad de muestra, tomada de los pozos de la placa ingresada, a un capilar previamente cargado con un polímero (el cual propicia que se lleve a cabo la separación del ADN). Esta inyección ocurre en el extremo donde los capilares tienen electrodos negativos o cátodos (se llaman así porque atraen a los cationes). Posteriormente la muestra migra en dirección dependiente de su carga, y como el ADN está cargado negativamente, migrará hacia el ánodo, que es el electrodo positivo localizado al otro lado de los capilares y que se llama así porque recibe a los aniones (moléculas de carga negativa). Los fragmentos originados en la reacción de secuenciación que sean menos pesados son los primeros en llegar al lado positivo, mientras que los fragmentos más largos son los que se tardarán más. A una altura determinada del capilar, el láser detecta la fluorescencia emitida por cada cadena sencilla de ADN y traduce esta emisión de fluorescencia en la secuencia correspondiente (*figura 5, C*). Las 96 muestras se secuencian simultáneamente (en 1 hora aproximadamente) debido a que hay 96 capilares. En síntesis, el secuenciador hace dos cosas: separa los fragmentos por tamaño y detecta la luminosidad que emiten los fluorocromos cuando son excitados por un láser; de tal manera que los colores son utilizados para determinar la secuencia específica de bases que conforma el producto de secuenciación. La principal ventaja de esta técnica es la automatización completa de todo el proceso, y la rapidez en el análisis de cada muestra.



**Figura 5.** En A se muestra un Electroferograma obtenido por un secuenciador automático. La amplitud de los picos no indican una magnitud per se, salvo que en esa posición se detectó la fluorescencia del ddNTP. Cada color indica la presencia de una base específica en la secuencia. La adenina se grafica en verde, la citosina en azul, la guanina en negro y la timina en rojo. En B se muestran los diferentes tamaños de los fragmentos que se generan en el tubo de la reacción de secuenciación. Y en C se muestran estos mismos fragmentos pero separados por electroforesis en el equipo de secuenciación. Nótese como los fragmentos se van acomodando de menor a mayor longitud puesto que las cadenas menos pesadas son las primeras en llegar. También, nótese que la letra terminal de los distintos tamaños de los fragmentos generados por los ddNTP's están marcadas con un color distinto, dependiendo de la base nitrogenada que sea; de manera que cuando se empalman todos los fragmentos se obtiene la secuencia específica de bases que conforma el gen.

Una vez descrita la técnica, precisaré el procedimiento utilizado en esta tesis. Para realizar la técnica de secuenciación del ADN primero realizamos una PCR, para aislar y

amplificar el gen CNR1. Posteriormente se purificó el producto de la PCR (la purificación es un paso ineludible porque mediante ella se eliminan todos los componentes innecesarios presentes en la muestra, por ejemplo, el cloruro de magnesio, primers o la Taq polimerasa). Después medimos la concentración de ADN en el *Nano Drop ND-1000*. Ajustamos todas las muestras a 10 ng/μl y se preparamos las condiciones para la secuenciación (Columna 1 de la tabla 6 [cantidad 1x]). Estas condiciones son muy parecidas a las condiciones de PCR, sólo que la diferencia la hace un elemento que se llama *BD Terminator*. Este elemento es una mezcla de cloruro de magnesio, Taq polimerasa, dNTP's y de ddNTP's. Estos últimos son los que hacen la diferencia entre una PCR y una reacción de secuenciación. Ellos están encargados de impedir que se sigan uniendo las bases, por la falta de un radical OH en el carbono 3. También, para este análisis se requiere que se coloquen por separado el *primer FWD* y el *primer RWD*. Por lo que tendremos el doble de pozos utilizados: 188 pozos. La importancia de meterlos por separado es que ofrecen un tipo de control, debido a que lo obtenido en el *primer RWD* debe ser lo complementario a lo obtenido en el *primer FWD*. De la misma manera que en las condiciones para PCR, se calculó la cantidad necesaria para las 96 muestras, 94 fueron muestras de los participantes, una funcionó como pozo control y la última se consideró sólo para tener solución de reacción para reserva si es que llegará a faltar por la pérdida que ocurre al pipetear (Columna 3 de la tabla 6 [cantidad 96x]).

**Tabla 6.** Condiciones para secuenciar el ADN de las 94 muestras.

ELEMENTO	CANTIDAD 1X	96x
<i>Buffer 5X</i>	1.0 μl	96 μl
<i>BD Terminator</i>	0.5 μl	96 μl
<i>PRIMER</i>	1.0 μl	96 μl
<i>DNA</i>	2.0 μl	Se pone de la muestra
<i>Agua</i>	1.5 μl	96 μl
<i>Volumen final de la reacción</i>	6.0 μl	384 μl

La placa de secuenciación se preparó colocando en cada uno de los pozos la cantidad correspondiente de la mezcla 96x con su cantidad correspondiente

de ADN. Los primeros 94 pozos fueron llenados con el *primer FWD*, seguidos del pozo control y los 94 pozos restantes fueron llenados con el *primer RWD*. Al terminar de llenar la placa, se selló con una mica adherente, se colocó en el vórtex y se centrifugó; después se metió al termociclador en estas condiciones: 25 ciclos de 96 °C 10 segundos, 50 °C 5 segundos y 60 °C 4 minutos. Una vez que la placa se sacó del termociclador se purificó.

Después de que se purificó la placa, se preparó el equipo de secuenciación (ABI 3730xl *DNA Analyzer Sequencer, USA, Applied Biosystem*. Primero fue necesario dar de alta las muestras a analizar. Para esto se registró el código de barras de la placa y posteriormente se ingresó la nomenclatura específica asignada a cada una de las muestras. Después se ajustaron algunas especificaciones del equipo, p. ej., temperatura, tipo de secuenciación, eso se determina según datos estandarizados de acuerdo al secuenciador. Después se colocó la placa dentro del equipo. El resultado se obtuvo después de dos horas. Las secuencias se analizaron con el software Lasergene v7.0.0 (DNASTAR, Inc.).

## **6.6 Análisis de datos**

Las variables dependientes que se analizaron en esta investigación fueron la TAA y los tiempos de reacción.

Se aplicó una  $\chi^2$  para conocer los alelos y genotipos más frecuentes de la muestra. El equilibrio de Hardy–Weinberg se calculó a través del software Arlequin V3.11 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>).

Para detectar la asociación del genotipo sobre la ejecución de los participantes en las tareas de memoria de trabajo, primero se dividió a la muestra en función de la mediana con base en el puntaje obtenido en la TAA en la tarea más complicada, sin tomar en cuenta la modalidad de la tarea (el promedio obtenido tanto de la modalidad verbal como la espacial en 3 *back*). De tal manera que tuvimos dos grupos, aquellas personas que puntuaron arriba de la mediana y debajo de ella. Posteriormente, se

detectaron si existían diferencias en la frecuencia genotípica entre los grupos. Para ello se utilizó el software CLUMP (Sham y Curtis, 1995). Este software calcula a través del método Monte Carlo diferentes chi-cuadradas ( $\chi^2$ ). La primera  $\chi^2$  (T1) que arroja es una  $\chi^2$  normal. Sin embargo, en nuestros datos algunas frecuencias genotípicas observadas son menores a cinco, lo que invalida los resultados de esta  $\chi^2$ . La segunda  $\chi^2$  (T2) que arroja este software evita esta violación, agrupando los valores de las siguientes columnas hasta cumplir con el supuesto de tener una frecuencia observada igual o mayor a cinco (Sham y Curtis, 1995).

Una vez identificados los genotipos, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) mixto. El factor entre grupos fue el *Genotipo*. Mientras que el factor para medidas repetidas fue la *Complejidad*.

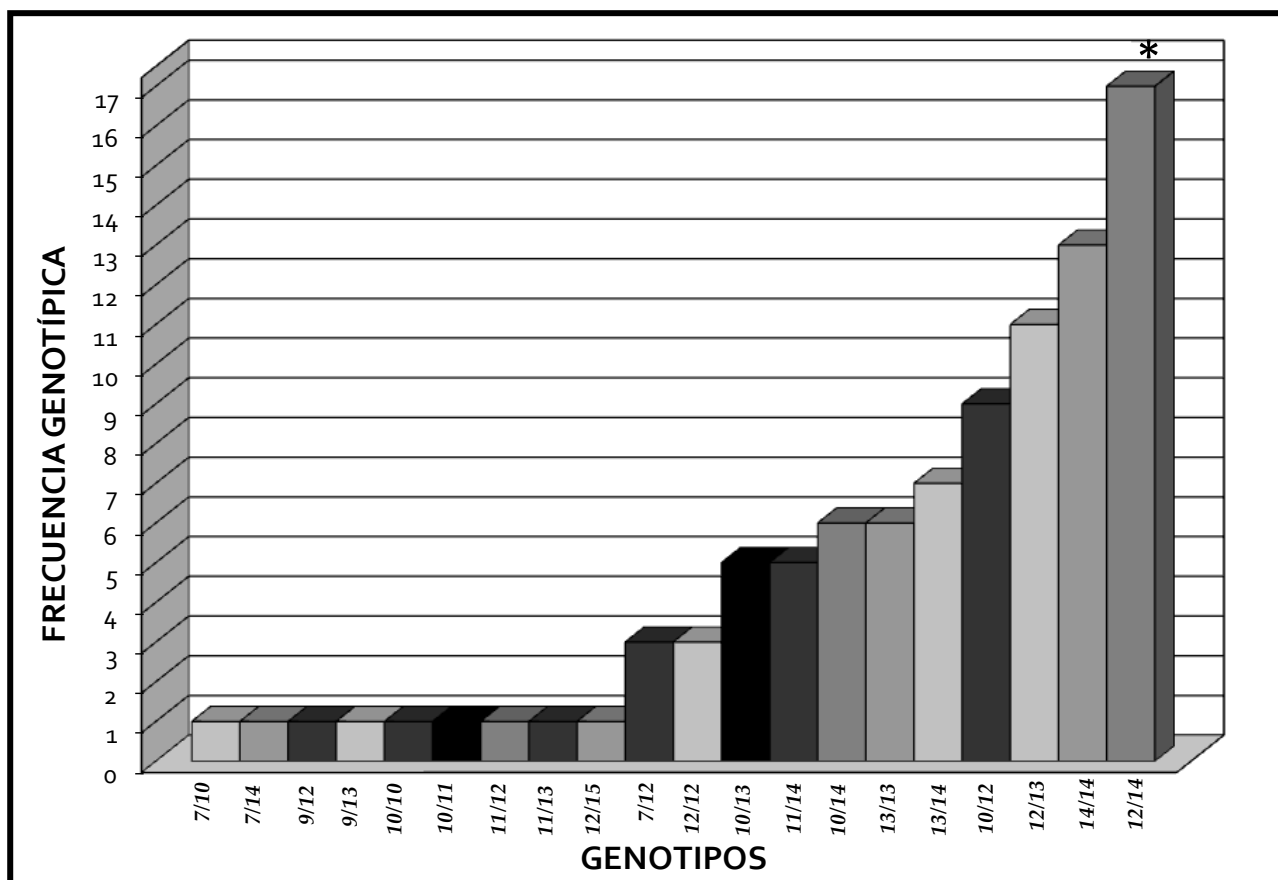
Para detectar si existía una diferencia en función del *Genotipo* y la modalidad de la tarea se realizó un ANOVA mixto. Los factores incluidos en el análisis fueron *Genotipo X Modalidad X Complejidad*. El factor entre grupos fue *Genotipo* y los factores para medidas repetidas fueron *Modalidad y Complejidad*.

A continuación, se realizaron ANOVAs mixtos para cada modalidad de la tarea *N back* verbal y espacial. Para incluir a la totalidad de la muestra se agregaron dos grupos, por lo que el factor entre grupos fue el *Genotipo*. El factor para medidas repetidas fue *Complejidad (2 vs. 3 back)*. Esto se calculó para la TAA y para los tiempos de reacción.

Se consideraron los resultados significativos con una  $P < 0.05$ . Se empleó la prueba post hoc de *Tukey Honest Significant Difference* (HSD) para detectar las interacciones significativas entre los factores.

## 7. RESULTADOS

La secuenciación del ADN y el análisis de fragmentos mostraron la existencia de ocho diferentes alelos en los 94 participantes. Los alelos van desde siete repetidos del triplete AAT hasta 15 repetidos, a excepción del alelo ocho. En la muestra encontramos 20 diferentes genotipos. La frecuencia genotípica de la muestra se ilustra en la Figura 6. Se encontraron diferencias significativas en la distribución alélica ( $\chi^2_5=87.68$ ,  $p<0.0001$ ). Los alelos más frecuentes fueron el alelo 12 y el alelo 14 en comparación con los otros seis alelos ( $p<0.001$ ). También se encontraron diferencias significativas en la distribución genotípica ( $\chi^2_8=20.51$ ,  $p=0.009$ ). El genotipo más frecuente fue el 12/14 en comparación con todos los demás. Los genotipos estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p=0.41$ ).



**Figura 6.** Frecuencia genotípica de los repetidos AATn del gen CNR1 de los 94 participantes. En la muestra se encontraron 20 diferentes genotipos del polimorfismo AATn. La frecuencia del genotipo 12/14 fue diferente al resto de los genotipos (\* $p=0.009$ ).

Para conocer la asociación del genotipo con la ejecución de los participantes en las tareas de memoria de trabajo, primero se dividió a la muestra en dos grupos a partir de la mediana, uno con los puntajes más altos y otro con los puntajes más bajos del promedio obtenido en la TAA, tanto en la modalidad verbal como en la espacial en 3 *back*. Se analizó a través del software CLUMP la frecuencia genotípica de cada grupo en función de la eficiencia en la memoria de trabajo. Se observaron diferencias significativas en la frecuencia genotípica entre grupos (CLUMP T2:  $\chi^2=6.19$ ,  $p=0.04$ ). Sin embargo, al analizar cada una de las frecuencias genotípicas entre grupos, no se observaron diferencias significativas.

Debido a que en nuestra muestra no encontramos los genotipos que se reportan en el antecedente más cercano a la presente investigación (portar al menos un alelo  $AAT \leq 5$  vs. portar al menos un alelo  $AAT > 5$ , Jonhson et al., 1997) tuvimos que implementar otras estrategias para analizar los datos. Una de ellas fue en función de si el alelo era corto o largo. Estas propiedades de los alelos fueron nominaciones arbitrarias en función de la longitud del número de repetidos hallados en la muestra. Los alelos encontrados van del 7 al 15, la mitad de esta escala es 11. Por lo que, todos aquellos alelos menores o iguales a 11 se nominaron como alelos cortos, mientras que los mayores a 11 como alelos largos. Ahora bien, como uno de los alelos más frecuentes fue el alelo 14, resultó imposible congregarse grupos de genotipos que no lo incluyeran. Por estas razones agrupamos a la muestra de la siguiente manera: Genotipo 1, portar un alelo 14 con otro alelo corto ( $14/\leq 11$ ,  $n=12$ ); Genotipo 2, portar un alelo 14 con otro alelo largo ( $14/> 11$ ,  $n=37$ ).

### *1. Genotipo (1 y 2) X Complejidad en TAA*

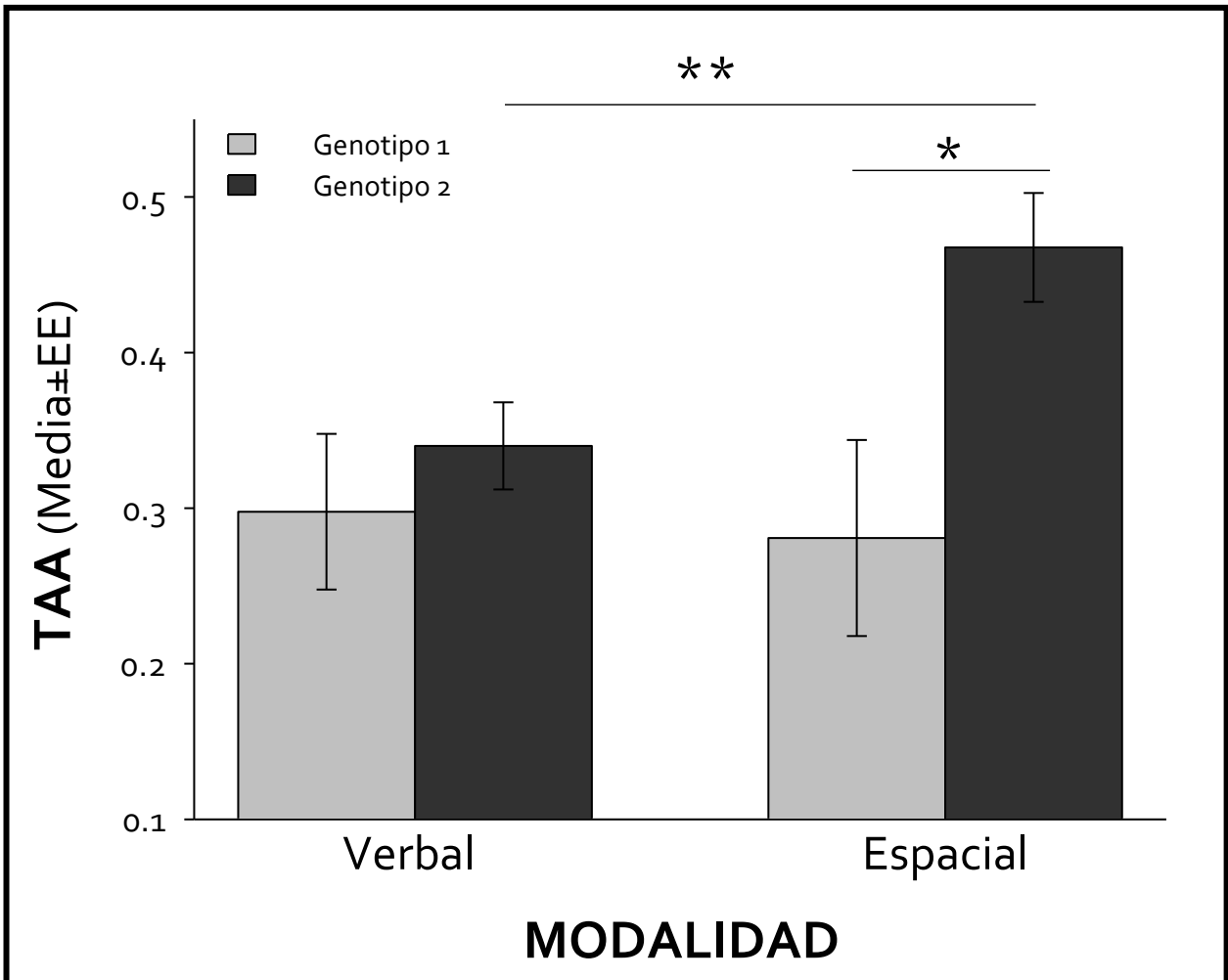
Para conocer cómo se comportaban los grupos en función del genotipo calculamos un promedio de los puntajes de la TAA obtenidos tanto en la modalidad verbal como en la espacial, en 2 y 3 *back*, dejando de lado el factor modalidad. Se realizó un ANOVA mixto, el factor entre grupos fue *Genotipo* (*Genotipo 1, 14/ $\leq 11$  vs. Genotipo 2, 14/ $> 11$* ). El factor para medidas repetidas fue la *Complejidad* (2 vs. 3 *back*).



Se observó una tendencia para el factor grupo en la TAA ( $F_{(1,47)}=3.96$ ,  $p=0.05$ ); revelando que los portadores de  $14/\leq 11$  fueron menos eficientes en su ejecución en comparación con los portadores de  $14/ > 11$ . No se encontraron diferencias en la interacción *Genotipo X Complejidad* ( $F_{(1,47)}=2.15$ ,  $p=0.15$ ).

## II. *Genotipo (1 y 2) X Modalidad X Complejidad en TAA*

Para conocer si existía un efecto en función del genotipo y la modalidad de la tarea se realizó un ANOVA mixto, el factor entre grupos fue *Genotipo* (*Genotipo 1, 14/ $\leq$ 11 vs. Genotipo 2, 14/ > 11*). Fueron dos factores para medidas repetidas con dos niveles cada uno: *Modalidad* (verbal vs. espacial) y *Complejidad* (2 vs. 3 back). En la TAA se encontró una tendencia para el factor *Genotipo* ( $F_{(1,47)}=3.96$ ,  $p=0.05$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para el factor *Modalidad* ( $F_{(1,47)}=2.99$ ,  $p=0.09$ ); pero sí para el factor *Complejidad* ( $F_{(1,47)}=51.91$ ,  $p<0.0001$ ). Se encontró una interacción significativa entre *Genotipo X Modalidad* ( $F_{(1,47)}=5.11$ ,  $p=0.03$ ; *figura 7*). Revelando que los portadores de  $14/\leq 11$ , *Genotipo 1*, tienen una TAA más baja en la modalidad espacial ( $\bar{x}\pm EE=0.2808\pm 0.06$ ) en comparación con los portadores de  $14/ > 11$ , *Genotipo 2*, ( $0.4676\pm 0.03$ ). Y que el *Genotipo 2, 14/ > 11* en la modalidad verbal tiene una TAA más baja ( $\bar{x}\pm EE=0.340\pm 0.02$ ) en comparación con la modalidad espacial ( $\bar{x}\pm EE=0.4676\pm 0.03$ , *figura 7*). No se encontraron diferencias significativas en las interacciones *Genotipo X Complejidad* ( $F_{(1,47)}=2.16$ ,  $p=0.14$ ); *Modalidad X Complejidad* ( $F_{(1,47)}=0.66$ ,  $p=0.41$ ), ni *Genotipo X Modalidad X Complejidad* ( $F_{(1,47)}=0.33$ ,  $p=0.56$ ).



**Figura 7.** Medias y errores estándar obtenidos en la TAA en la tarea N back verbal y espacial en función del genotipo. El Genotipo 2 ( $14/ > 11$ ,  $n=37$ ) tuvo una mayor TAA que el Genotipo 1 ( $14/ \leq 11$ ,  $n=12$ ;  $*p=0.03$ ). Además, el Genotipo 2 tuvo una mayor TAA en la modalidad espacial que en la verbal ( $**p=0.001$ ). No se observaron diferencias significativas en el Genotipo 1 en función de la modalidad.

### III. Genotipo (1 y 2) X Modalidad X Complejidad en Tiempos de reacción

En los tiempos de reacción no se encontraron diferencias significativas en función del *Genotipo* ( $F_{(1,47)}=1.46$ ,  $p=0.23$ ), ni para el factor *Modalidad* ( $F_{(1,47)}=3.59$ ,  $p=0.06$ ). Pero sí para el factor *Complejidad* ( $F_{(1,47)}=162.62$ ,  $p<0.001$ ). Se encontraron diferencias significativas sólo entre 0 *back* ( $\bar{x} \pm EE=331.86 \pm 7.64$ ) vs. 2 ( $667.01 \pm 22.60$ ) y 3 *back* ( $664.33 \pm 29.08$ ). No se encontraron diferencias significativas en las interacciones *Genotipo X Modalidad* ( $F_{(1,47)}=1.09$ ,  $p=0.30$ ); *Genotipo X Complejidad* ( $F_{(1,47)}=2.76$ ,

$p=0.06$ ); *Modalidad X Complejidad* ( $F_{(1,47)}=0.11$ ,  $p=0.90$ ), ni *Genotipo X Modalidad X Complejidad* ( $F_{(1,47)}=0.85$ ,  $p=0.42$ ).

#### IV. *Genotipo (1, 2, 3 y 4) X Modalidad X Complejidad en TAA*

Para incluir a la totalidad de la muestra se agregaron dos grupos más. Aquellos que tuvieran un alelo corto en combinación con un alelo de 10-13 (*Genotipo 3*,  $\leq 11/10-13$ ,  $n=24$ ) y aquellos que tuvieran alelos largos con exclusión del alelo 14 (*Genotipo 4*,  $>11/>11$ ,  $n=21$ ), de tal manera que en total fueron cuatro grupos (ver Tabla 7) en donde se incluye a la totalidad de la muestra. Se realizó un ANOVA mixto, el factor entre grupos fue *Genotipo* (1,  $14/\leq 11$  vs. 2,  $14/>11$  vs. 3,  $\leq 11/10-13$  vs. 4,  $>11/>11$ ). Fueron dos factores para medidas repetidas con dos niveles cada uno: *Modalidad* (verbal vs. espacial) y *Complejidad* (2 vs. 3 *back*). En la TAA no se encontraron diferencias significativas en el factor *Genotipo* ( $F_{(3,90)}=0.90$ ,  $p=0.50$ ). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas para el factor *Modalidad* ( $F_{(3,90)}=18.40$ ,  $p=0.00004$ ). Siendo la TAA más alta en la modalidad espacial ( $\bar{x} \pm EE = 0.3679 \pm 0.017$ ) que en la verbal ( $0.3247 \pm 0.017$ ). También se encontraron diferencias significativas para el factor *Complejidad* ( $F_{(3,90)}=112.4$ ,  $p=0.00004$ ). No se encontraron diferencias significativas en las interacciones *Genotipo X Modalidad* ( $F_{(3,90)}=2.40$ ,  $p=0.07$ ); *Genotipo X Complejidad* ( $F_{(3,90)}=2.10$ ,  $p=0.11$ ); *Modalidad X Complejidad* ( $F_{(3,90)}=0.80$ ,  $p=0.38$ ), ni *Genotipo X Modalidad X Complejidad* ( $F_{(3,90)}=0.60$ ,  $p=0.60$ ).

**Tabla 7.** Datos descriptivos de los cuatro diferentes grupos en que se dividió a toda la muestra. No se observaron diferencias significativas en las variables medidas entre los grupos (ANOVA de una vía).

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	P
<b>N</b>	12	37	24	21	--
<b>CNR<sub>1</sub> AAT<sub>n</sub></b>	14/7 14/10 14/11	14/12 14/13 14/14	10/10 10/11 10/12 10/13 11/12 11/13	12/12 12/13 12/15 13/13	--
<b>Sexo (H-M)*</b>	6 / 6	19 / 18	12 / 12	11 / 10	--
<b>Edad (Media<sub>±</sub>DE)</b>	23.08 <sub>±</sub> 2.67	23.91 <sub>±</sub> 2.60	23.66 <sub>±</sub> 2.53	24.04 <sub>±</sub> 3.23	0.77
<b>Años de estudio (Media<sub>±</sub>DE)</b>	15.70 <sub>±</sub> 1.71	16.82 <sub>±</sub> 1.81	16.34 <sub>±</sub> 1.77	16.40 <sub>±</sub> 2.04	0.32
<b>Inventario de Edimburgo (Media<sub>±</sub>DE)</b>	86.02 <sub>±</sub> 19.47	87.75 <sub>±</sub> 14.78	82.75 <sub>±</sub> 19.15	90.19 <sub>±</sub> 13.68	0.47
<b>WAIS-R** (Media<sub>±</sub>DE)</b>	11.25 <sub>±</sub> 1.36	12.00 <sub>±</sub> 1.64	11.54 <sub>±</sub> 1.14	11.47 <sub>±</sub> 0.98	0.27
<b>Inventario de Depresión de Beck (Media<sub>±</sub>DE)</b>	3.08 <sub>±</sub> 2.06	4.27 <sub>±</sub> 2.56	3.41 <sub>±</sub> 2.63	3.09 <sub>±</sub> 2.99	0.29
<b>Inventario de Ansiedad de Beck (Media<sub>±</sub>DE)</b>	2.5 <sub>±</sub> 2.46	3.48 <sub>±</sub> 2.02	3.33 <sub>±</sub> 2.05	3.47 <sub>±</sub> 2.24	0.55

\*H= Hombres, M=Mujeres

\*\*Escala de Inteligencia para Adultos de Wechsler para población mexicana en su versión revisada WAIS-R

#### V. Genotipo (1, 2, 3 y 4) X Modalidad X Complejidad en Tiempos de reacción

En los tiempos de reacción no se encontraron diferencias significativas en función del *Genotipo* ( $F_{(3,90)}=0.60$ ,  $p=0.60$ ). Pero sí para el factor *Modalidad* ( $F_{(3,90)}=11.00$ ,  $p=0.001$ ). Los tiempos de reacción fueron más elevados en la modalidad espacial ( $\bar{x} \pm EE = 579.48 \pm 12.86$ ) que en la verbal ( $546.9537 \pm 11.38$ ). También se encontraron

diferencias significativas para el factor *Complejidad* ( $F_{(3,90)}=415.20$ ,  $p=0.00004$ ). No se encontraron diferencias significativas en las interacciones *Genotipo X Modalidad* ( $F_{(3,90)}=1.00$ ,  $p=0.42$ ); *Genotipo X Complejidad* ( $F_{(3,90)}=1.30$ ,  $p=0.24$ ); *Modalidad X Complejidad* ( $F_{(3,90)}=0.50$ ,  $p=0.60$ ), ni *Genotipo X Modalidad X Complejidad* ( $F_{(3,90)}=0.80$ ,  $p=0.60$ ).

#### VI. *Genotipo (1, 2, 3 y 4) X Complejidad en TAA para la Modalidad Verbal*

Posteriormente, se realizaron dos análisis independientes por modalidad, verbal y espacial, para detectar si el genotipo hacía una diferencia en la eficiencia de la memoria de trabajo. Para analizar la tarea *N back* verbal se realizó un ANOVA mixto, donde el factor entre grupos fue *Genotipo* (1,  $14/\leq 11$  vs. 2,  $14/ > 11$  vs. 3,  $\leq 11/10-13$  vs. 4,  $> 11/ > 11$ ) y el factor para medidas repetidas fue *Complejidad* (2 vs. 3 *back*). No se encontraron diferencias en el factor *Genotipo* ( $F_{(3,90)}=0.270$ ,  $p=0.84$ ) ni en la interacción *Genotipo X Complejidad* ( $F_{(3,90)}=1.797$ ,  $p=0.15$ ).

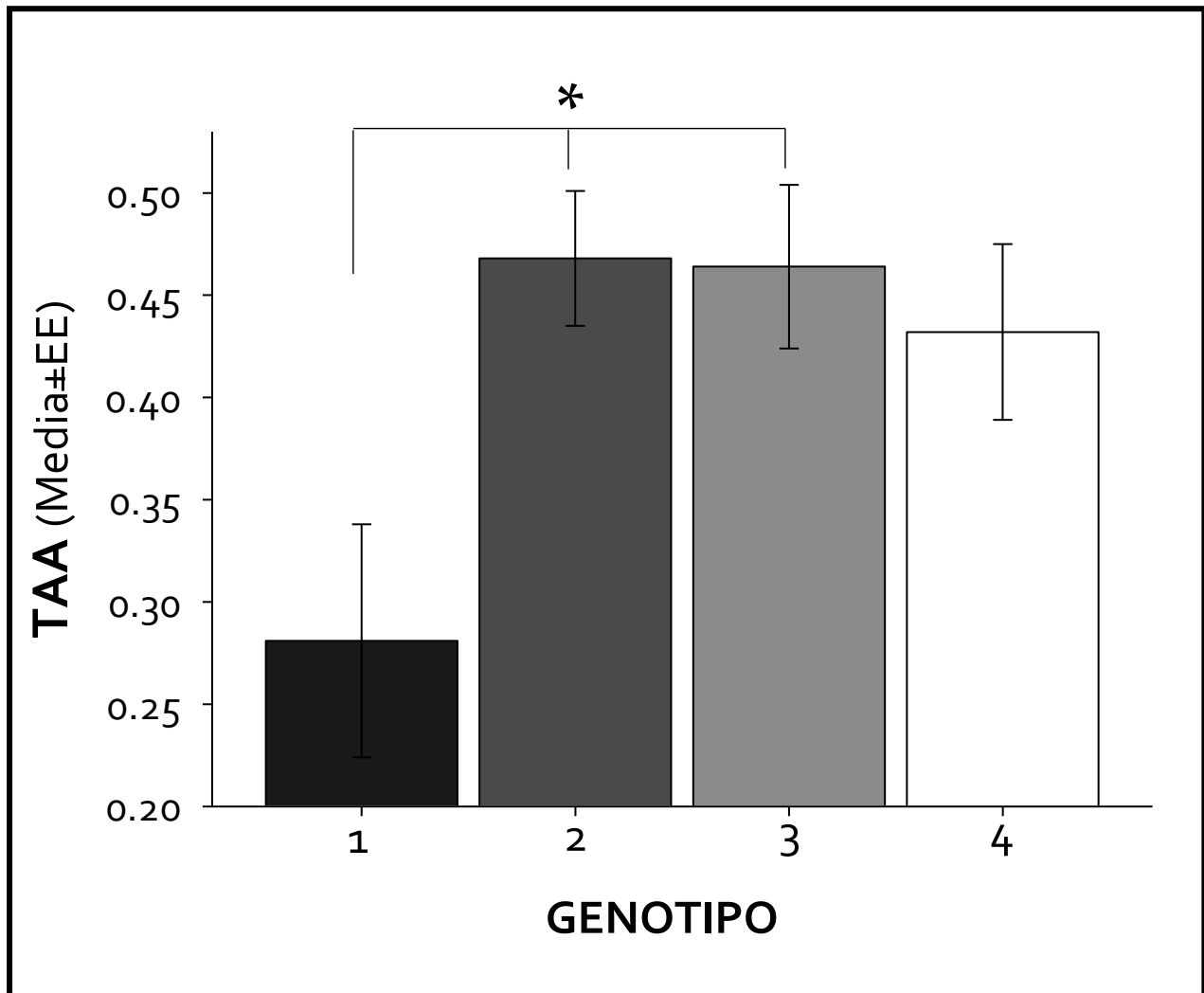
#### VII. *Genotipo (1, 2, 3 y 4) X Complejidad en Tiempos de reacción para la Modalidad Verbal*

Los tiempos de reacción también se analizaron con un ANOVA mixto, donde el factor entre grupos fue *Genotipo* con los cuatro niveles ya descritos. Mientras que el factor para medidas repetidas fue *Complejidad* (0 *back*, y las respuestas correctas para los *targets* en 2 y 3 *back*). No se encontraron diferencias significativas en el factor *Genotipo* ( $F_{(3,90)}=0.177$ ,  $p=0.91$ ). Para el factor *Complejidad* se encontraron diferencias significativas ( $F_{(3,90)}=309.94$ ,  $p=0.001$ ). El análisis *Tukey HSD* reveló diferencias significativas sólo entre 0 *back* ( $\bar{x} \pm EE = 317.99 \pm 4.52$ ) vs. 2 *back* ( $669.89 \pm 15.92$ ) y 3 *back* ( $683.86 \pm 20.11$ ). No hubo interacción significativa en *Genotipo X Complejidad* ( $F_{(3,90)}=0.871$ ,  $p=0.50$ ).

#### VIII. *Genotipo (1, 2, 3 y 4) X Complejidad en TAA para la Modalidad Espacial*

De igual manera, para analizar la tarea *N back* espacial se realizó un ANOVA mixto con los mismos factores empleados para la tarea en modalidad verbal. Se

encontraron diferencias significativas para el factor *Genotipo* ( $F_{(3,90)}=2.939$ ,  $p=0.04$ , *figura 8*). El análisis *Tukey HSD* reveló diferencias significativas entre el Genotipo 1,  $14/\leq 11$  ( $\bar{x}\pm EE=0.281\pm 0.057$ ) con el Genotipo 2,  $14/ > 11$  ( $0.468\pm 0.033$ ) y el Genotipo 3,  $\leq 11/10-13$  ( $0.464\pm 0.040$ ), pero no con el Genotipo 4,  $> 11/ > 11$  ( $0.432\pm 0.043$ ). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la interacción de *Genotipo X Complejidad* ( $F_{(3,90)}=0.566$ ,  $p=0.63$ ).



**Figura 8.** Medias y errores estándar obtenidos en la TAA en la tarea N back espacial en función del genotipo. Se muestran diferencias significativas entre el Genotipo 1 ( $14/\leq 11$ ,  $n=12$ ) vs. el Genotipo 2 ( $14/ > 11$ ,  $n=37$ ) y el Genotipo 3 ( $\leq 11/10-13$ ,  $n=24$ ).

*IX. Genotipo (1, 2, 3 y 4) X Complejidad en Tiempos de reacción para la Modalidad Espacial*

Así mismo, los tiempos de reacción se analizaron a través de un ANOVA mixto, de la misma manera en que se realizó el análisis de la modalidad verbal. No se encontraron diferencias significativas en el factor *Genotipo* ( $F_{(3,90)}=1.109$ ,  $p=0.35$ ). Pero sí en el factor *Complejidad* ( $F_{(3,90)}=286.96$ ,  $p=0.001$ ). El análisis *Tukey HSD* reveló diferencias significativas entre 0 *back* ( $\bar{x} \pm EE=341.03 \pm 5.61$ ) vs. 2 *back* ( $702.09 \pm 17.86$ ) y 3 *back* ( $714.75 \pm 21.13$ ). No hubo interacción *Genotipo X Complejidad* ( $F_{(3,90)}=0.332$ ,  $p=0.91$ ).

## 8. DISCUSIÓN

La pregunta de investigación de esta tesis fue ¿Existe una asociación entre el polimorfismo AATn del gen CNR1 con la eficiencia de la memoria de trabajo espacial y verbal en humanos jóvenes? Para responder a la pregunta de investigación, la primera hipótesis planteada se anuló debido a que en nuestra muestra no observamos alelos cortos similares a los observados por Johnson et al. (1997). Así pues, se plantearon otras formas de analizar los resultados agrupando de manera distinta a los participantes (ver Tabla 7).

Nuestros resultados indican que sí existe una asociación del número de repetidos AAT del gen CNR1 con la eficiencia de la memoria de trabajo espacial, pero no en la memoria de trabajo verbal de jóvenes sanos. Encontramos que el grupo de participantes que portan un alelo 14 en conjunción con un alelo corto ( $14/\leq 11$ ) tuvieron menor eficiencia para resolver la tarea de memoria de trabajo espacial en comparación con los participantes que portan un alelo 14 en conjunción con un alelo largo ( $14/ > 11$ ) y también contra aquellos participantes que portan un alelo corto en combinación con otro alelo diferente de 14 ( $\leq 11/10-13$ ). Pero no contra aquellos que portan ambos alelos largos ( $> 11/ > 11$ ).

Esta investigación es la primera en mostrar una asociación de un polimorfismo del gen CNR1 con la función cognitiva. En el mismo sentido, es la primera en describir cómo se expresa el polimorfismo AATn del gen CNR1 en una muestra de 94 jóvenes mexicanos neurológica y psiquiátricamente sanos, ni siquiera con algún antecedente en línea directa (padres y hermanos) con algún diagnóstico de estos trastornos ni con adicción a sustancias de abuso.

En la muestra evaluada encontramos la existencia de ocho alelos diferentes del gen CNR1 que se alejan mucho de los encontrados en otras poblaciones (p. ej., Zhang et al., 2004 y Ujike et al., 2002). Por ejemplo, Ujike et al. (2002) evaluaron a una muestra de 148 japoneses sanos en quienes se documentó la existencia de nueve alelos que van del



alelo 9 hasta el alelo 18, con exclusión del alelo 11. El alelo más frecuente fue el AAT<sub>15</sub> (34.8%), seguido del AAT<sub>16</sub> (28.7%), AAT<sub>14</sub> (16.9%) y del AAT<sub>17</sub> (7.1%). Posteriormente, Zhang et al. (2004), documentaron que en los Europeos-Americanos sanos el alelo más frecuente es el AAT<sub>12</sub> (36%) seguido del 15 (19.1%) y 16 (19.7%). Mientras que en los Africanos-Americanos sanos el alelo más frecuente también es el AAT<sub>12</sub> (38.5%), seguido del 13 (19.8%) y 11 (13.2%). Y en los japoneses, al igual que Ujike et al. (2002), describieron que el alelo más frecuente es el AAT<sub>15</sub> (34.5%), seguido del 16 (25.2%) y 14 (15.5%). Es interesante que el alelo más frecuente en población americana, europea, africana y mexicana (según nuestros datos), el AAT<sub>12</sub>, en población japonesa sea de los menos frecuentes (8.2%). En nuestra muestra el alelo más corto fue el 7 y el más largo fue el 15 mientras que en los estudios citados, el alelo menor es el 9 y el mayor 18. Los alelos mayores de 15 no se encontraron en nuestra muestra. Es importante enfatizar que aunque el alelo más frecuente cambia entre poblaciones, todos los alelos mencionados, son alelos largos. Sin embargo, en nuestro antecedente principal (Johnson et al., 1997) se reporta la existencia de alelos muy cortos (menos de cinco repetidos) en comparación con todos los estudios citados e incluso con los obtenidos en nuestra investigación. Un aspecto importante de resaltar, es que los participantes del estudio de Johnson et al. (1997) eran personas adictas a diversas drogas y de nacionalidad americana. Estos resultados nos indican que la distribución alélica y genotípica del polimorfismo del gen CNR1 difiere de manera sustancial entre las diferentes poblaciones.

El hecho de que los microsatélites del gen CNR1 difieran entre las poblaciones genera una incógnita por descubrir ¿qué consecuencia tiene ser portador de más o menos repetidos de este triplete? ¿Será que evolutivamente unas regiones geográficas necesitaron de más repetidos del triplete AAT que otras? Y si así fuera ¿para qué? La respuesta a ese nivel nos es imposible de abordar, pues sería necesario realizar un análisis de la variación de los microsatélites a lo largo de la evolución y, por supuesto, en las diferentes regiones del mundo. Sin embargo, lo que sí podemos afirmar es que existe una diferencia cognitiva importante que se ajusta al tipo de alelos que conforman nuestro genotipo, promoviendo una mayor ejecución en una habilidad tan

indispensable para el ser humano como lo es la memoria de trabajo. Específicamente, tener un alelo 14 en combinación con un alelo corto resulta en una menor ejecución de la tarea de memoria de trabajo espacial en comparación con tener un alelo 14 en conjunción con otro alelo largo. El por qué el alelo 14 se mantiene constante en los grupos, se justifica por su amplia frecuencia observada en la muestra, es decir, existen muy pocos participantes con genotipos que excluyan al alelo 14 (45 de 94, casi la mitad de la muestra, el 47.87% para ser exactos). Sin embargo, como ya ha sido mencionado, también se realizó el análisis incluyendo a los grupos de personas que poseen alelos cortos y largos con exclusión del alelo 14 (Grupo 3 y Grupo 4), y los resultados permanecieron igual (ver *figura 8*). Es decir, parece sustancial que sea el alelo 14 en combinación con un alelo corto, para que la asociación ocurra.

Un aspecto importante de resaltar es que los datos obtenidos fueron medidos con un método más riguroso, *la TAA*, en comparación con otras investigaciones (Jonides et al., 1997; Carlson et al., 1998) en las que miden las respuestas correctas y las respuestas incorrectas por separado, sin hacer distinción entre los estímulos *target* y *non-target*. La ejecución medida a través de la TAA resulta más certera en comparación con otras mediciones porque evaluamos la discriminación del sujeto hacia estímulos *target* y *non-target* evitando así, que sus respuestas fueran azarosas. Los índices de ejecución obtenidos por los participantes de nuestra investigación fueron confiables. La TAA en promedio fue de 0.38. Recordemos que este índice va de -1 a +1, lo que nos indica que nuestros resultados no están a nivel de azar, puesto que el nivel más bajo de este índice es de -1, que nos indica que las personas ejecutaron todas las respuestas de manera incorrecta. También, enfatizó que aunque el grupo 1 ( $14/\leq 11$ ) obtuvo una TAA menor que los otros grupos, sus puntajes indican que no contestaron azarosamente, pero sobre todo, que son puntajes altos por lo que son personas totalmente funcionales en el ejercicio de esta capacidad.

Ahora, en relación a que la asociación del genotipo sólo se encontró con la tarea de memoria de trabajo espacial y no en la verbal, podría deberse a una situación parecida a la ocurrida en el estudio de Brehmer et al. (2009) en el que prueban la

asociación del polimorfismo del DAT1 con siete diferentes tareas de memoria de trabajo visual y verbal, sin hallar diferencias significativas en la tarea de memoria de trabajo verbal pero sí en la espacial. Los autores argumentan que las funciones de la dopamina se han vinculado más firmemente con funciones visuo-espaciales que al procesamiento verbal (Luciana & Collins, 1997). Y que quizá sea esta la causa de la selectividad del gen hacia la memoria de trabajo espacial. Como ya lo mencionamos anteriormente, los endocannabinoides funcionan como neuromoduladores, disminuyendo la probabilidad de la liberación de algunos neurotransmisores; esta información nos permite especular que quizá la expresión del CB1, según el polimorfismo del gen CNR1 que lo codifique, module diferencialmente la liberación de dopamina y, por lo tanto, se asocie selectivamente con la memoria de trabajo espacial.

Otra explicación posible, podría ser que la expresión del CB1 sea mayor o menor en regiones involucradas en cada modalidad de la tarea. Por ejemplo, sabemos que ambas modalidades comparten ciertas áreas cerebrales, tal es el caso de la corteza prefrontal dorsolateral, el área motora suplementaria y la corteza premotora lateral (Jonides et al., 1997; Carlson et al., 1998). Es importante notar que el área en la que recae la función del ejecutivo central (la corteza prefrontal) no difiere en activación mientras se contestan las diferentes modalidades de la tarea de memoria de trabajo, verbal y espacial. Además, con los reportes de que existe una importante distribución del receptor CB1 en la corteza frontal (Egertova & Elphick, 2000; Pattij et al., 2008; Burns et al., 2007), puedo sugerir que el ejecutivo central (corteza prefrontal) no se ve alterado por el genotipo. Es decir, este sistema no está participando en la diferenciación que encontramos por el genotipo y la modalidad de la tarea. Sin embargo, los otros componentes del modelo de Baddeley y Hitch (1974), el circuito fonológico y la agenda visoespacial, parecería que sí lo están ejerciendo. Específicamente cómo lo hacen, no lo sabemos, pero podríamos pensar que la diferenciación ocurre porque en algunas áreas involucradas en la memoria de trabajo verbal existe una mayor expresión del receptor CB1 en comparación con las involucradas en la memoria de trabajo espacial. Esta diferencia en la expresión del receptor CB1 está en el cerebelo (en su porción derecha) y

en el tálamo (ver Tabla 1), áreas involucradas con la memoria de trabajo verbal pero no con la espacial. Si bien, no sabemos exactamente las diferencias en cantidad entre unas y otras áreas, ni de qué manera están ejerciendo los efectos diferenciales sí podemos sugerir que muy probablemente el genotipo de las personas está involucrado; sea por una mayor expresión del receptor, por una afinidad de él significativamente diferente entre las distintas áreas, o bien, porque la alta expresión del receptor CB1 en esas áreas, a través de su ejercicio de modulación, genere en el cerebro una diferente disponibilidad de neurotransmisor, ocasionando un menor desempeño en la ejecución de una tarea de memoria de trabajo.

Una limitación de la presente investigación fue que obtuvimos escasa frecuencia de algunos genotipos, lo que nos obligó a pensar en otras estrategias para agrupar a los participantes. Sin embargo, esta limitación conlleva un matiz innato, pues es imposible adivinar que genotipo tienen las personas, dicho de otra manera, la frecuencia genotípica encontrada es la naturaleza propia de la muestra analizada.

Otra limitación es que si bien existen investigaciones que tratan de relacionar los efectos del polimorfismo AATn del gen CNR1 con enfermedades, como la esquizofrenia o las adicciones o, como en nuestro caso, con la modulación de la función cognitiva, aún no se ha descrito qué hace el polimorfismo estudiado en términos funcionales. Es decir, no sabemos si provoca una sobreproducción de receptor CB1 o al contrario, la disminución de él, o bien, cualquier otra característica en la proteína, por ejemplo, que provoque un pegado con diferente afinidad sobre el receptor. De la misma manera, conocer cómo el genotipo modula o interviene en la respuesta conductual de la persona no nos dice específicamente que ocurre en su cerebro. Aún estamos alejados en comprender a nivel molecular por qué los portadores de un alelo 14 en conjunción con un alelo corto tienen más dificultades en resolver una tarea de memoria de trabajo espacial en comparación con los portadores de otros genotipos.

En la actualidad, ya existe bastante evidencia (Egerton et al., 2006; Murillo-Rodríguez et al., 1998; Méndez-Díaz et al., 2008) acerca de que el sistema

endocannabinoide tiene una función importante en el cerebro humano. No obstante, pese a toda esta abundante y manifiesta información del sistema endocannabinoide, siguen siendo escasos los estudios realizados con el gen CNR1; no sólo a nivel de conducta, sino también a nivel molecular. Esto fue una gran limitante para interpretar los resultados obtenidos, debido a que no contamos con los antecedentes necesarios para generar interpretaciones fisiológicas más dirigidas o más explicativas, quedándonos a un nivel descriptivo. Resulta sustancial la idea de que se investigue más al gen CNR1, así como que su estudio no repare en análisis con pacientes, sino que se empiece a investigar en personas sanas y a nivel molecular.

## 9. CONCLUSIÓN

Sí existe una asociación del polimorfismo del gen CNR1 (AATn) en la eficiencia de la memoria de trabajo espacial, pero no en la memoria de trabajo verbal en jóvenes mexicanos sanos. Específicamente, portar un alelo 14 en conjunción con un alelo corto ( $\leq 11$ ) se asocia con una menor eficiencia para resolver una tarea de memoria de trabajo espacial (*N back*).

Así mismo, los resultados nos permiten concluir que los genotipos encontrados en nuestra muestra son diferentes de los genotipos reportados en otras poblaciones.

## 10. REFERENCIAS

Abi-Dargham, A., Mawlawi, O., Lombardo, I., Gil, R., Martinez, D., Huang, Y., Hwang, D-R., Keilp, J., Kochan, L., van Heertum, R., Gorman, J.M. & Laruelle, M. (2002) Prefrontal Dopamine D1 Receptors and working memory in schizophrenia. *Journal of Neuroscience*. 22:3708-3719.

Ameri, A. (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*. 58:315-348.

Awh, E., Jonides, J., Smith, E.E., Schumacher, E.H., Koeppel, R.A. & Katz, S. (1996) Dissociation of storage and rehearsal in verbal working: Evidence from Positron Emission Tomography. *Psychological Science*. 7:125-131.

Baddeley, A. (1996) Exploring the Central Executive. *The Quarterly Journal of Psychology*. 1:5-28.

Baddeley, A.D., Gathercole, S. & Papagno, C. (1998) The phonological loop as a language learning device. *Psychological Review*. 105:158-173.

Baddeley, A. (2000) The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends in Cognitive Sciences*. 4:417-423.

Baddeley, A. (2003) Working Memory: Looking back and looking forward. *Nature Reviews Neuroscience*. 4:829- 839.

Bertolino, A., Taurisano, P., Pisciotto, N.M., Blasi, G., Fazio, L., Romano, R., Gelao, B., Bianco, L.L., Lozupone, M., Giorgio, A.D., Caforio, G., Sambataro, F., Niccoli-Asabella, A., Papp, A., Ursini, G., Sinibaldi, L., Popolizio, T., Sadee, W. & Rubini, G. (2010) Genetically Determined Measures of Striatal D2 Signaling Predict Prefrontal Activity during Working Memory Performance. *Plos one*. 5:1-10.

Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernandez-Ruiz J.J. & Di Marzo, V. (1999) Brain regional distribution of endocannabinoids: Implications for their biosynthesis and biological function. *Biochemistry Biophysical Research Communications*. 256:377-380.

Bisogno, T., Ligresit, A. & Di Marzo, V. (2005) The endocannabinoid signaling system: Biochemical aspects. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 81:224-238.

Blokland, G.A.M., McMahonb, K.L., Hoffmanb, J., Zhu, G., Meredith, M., Martin, N.G., Thompson, P.M., Zubicaray, G. & Wright, M.J. (2008) Quantifying the heritability of task-related brain activation and performance during the N-back working memory task: A twin fMRI study. *Biological Psychology*. 1:70-79.

Bolla, K.I., Brown, K., Eldreth, D., Tate, K. & Cadet, J.L. (2002) Dose-related neurocognitive effects of marijuana use. *Neurology*. 59:1337-1343.

Braver, T.S., Cohen, J.D., Nystrom, L.E., Jonides, J., Smith, E.E. & Noll, D.C. (1997) A parametric study of prefrontal cortex involvement in human working memory. *Neuroimage*.

5:49-62.

Brehmer, Y., Westerberg, H., Bellander, M., Fürth, D., Karlsson, S. & Bäckman, L. (2009) Working memory plasticity modulated by dopamine transporter genotype. *Neuroscience Letters*. 467: 117–120.

Burns, H.D., Van Laere, K., Sanabria-Bohórquez, S., Hamill, T.G., Bormans, G., Eng, W., Gibson, R., Ryan, C., Connolly, B., Patel, S., Krause, S., Vanko, A., Van Hecken, A., Dupont, P., De Lepeleire, I., Rothenberg, P., Stoch, S.A., Cote, J., Hagmann, W.K., Jewell, J.P., Lin, L.S., Liu, P., Goulet, M.T., Gottesdiener, K., Wagner, J.A., de Hoon, J., Mortelmans, L., Fong, T.M. & Hargreaves, R.J. (2007) [18F]MK-9470, a positron emission tomography (PET) tracer for in vivo human PET brain imaging of the cannabinoid-1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Science*. 104:9800-9805.

Carlson, S., Martinkauppi, S., Rämä, P., Salli, E., Korvenoja, A. & Aronen, H.J. (1998) Distribution of cortical activation during visuospatial n-Back tasks as revealed by Functional Magnetic Resonance Imaging. *Cerebral Cortex*. 8:743-752.

Cerasa, A., Gioia, M.C., Fera, F., Passamonti, L., Iguori, A., Lanza, P., Muglia, M., Magariello, A. & Quattrone, A. (2008) Ventro-lateral prefrontal activity during working memory is modulated by MAO A genetic variation. *Brain Research*. doi:10.1016/j.brainres.2008.01.048

Cowan, N., Day, L., Scott Saults, J., Keller, T., Johnson, T. & Flores, L. (1992) The Role of Verbal Output Time in the Effects of Word Length on Immediate Memory. *Journal of Memory and Language*. 31:1-17.

Cravatt, B.F., Prospéro-García, O., Siuzdak, G., Gilula, N.B., Henriksen, S.J., Boger, D. L. & Lerner, R.A. (1995) Chemical Characterization of a Family of Brain Lipids That Induce Sleep. *Science, New Series*. 268:1506-1509.

Curran, H.V., Brignell, C., Fletcher, S., Middleton, P. & Henry, J. (2002) Cognitive and subjective dose–response effects of acute oral Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) in infrequent cannabis users. *Psychopharmacology*. 164:61–70.

Darlington, M.P., Barceló, F., Fernández, C. & Rubia, F.J. (1999) Neurofisiología de la memoria operativa viso-espacial. *Psicothema*. 11:163-174.

Della-Sala, S., Gray, C., Baddeley, A.D., Allamano, N. & Wilson, L. (1999) Pattern span: a tool for unwelding visuo-spatial memory. *Neuropsychologia*. 37:1189–1199.

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*. 34:605-613.

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*. 258:1946-1949.

Di Marzo, V. & Deutsch, D.G. (1998) Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiological Disease*. 5: 386–404.



D'Esposito, M., Aguirre, G., Zarahn, E., Ballard, D., Shin, R. & Lease, J. (1998) Functional MRI studies of spatial and nonspatial working memory. *Cognitive Brain Research*. 7:1–13.

D'Souza, D.C., Perry, E., MacDougall, L., Ammerman, Y., Cooper, T., Wu, Y., Braley, G., Gueorguieva, R. & Krystal, J.H. (2004) The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. *Neuropsychopharmacology*. 29:1558–1572.

Egan, M.F., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Callicott, J.H., Mazzanti, C.M., Straub, R. E., Goldman, D. & Weinberger, D.E. (2001) Effect of COMT Val108/158Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Science*. 98: 6917-6022.

Egerton, A., Allison, C., Brett, R.R. & Pratt, J.A. (2006) Cannabinoids and prefrontal cortical function: Insights from preclinical studies. *Neuroscience and Behavioral Reviews*. 30:680-695.

Egertova, M. & Elphick, M.R. (2000) Localisation of Cannabinoid Receptors in the Rat Brain Using Antibodies to the Intracellular C-Terminal Tail of CB1. *The Journal of Comparative Neurology*. 422:159–171.

Gevins, A. & Cutillo, B. (1993) Spatiotemporal dynamics of component processes in human working memory. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 87:128-143.

Guzmán, M. (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nature Reviews*. 3:745-755.

Hashimotodani, Y., Ohno-shosaku, T. & Kano, M. (2007) Endocannabinoids and Synaptic Function in the CNS. *Neuroscientist*. 13:127-137.

Herrera-Solís, A., Guzmán, K. & Prospéro-García, O. (2010) Acute and subchronic administration of anandamide or oleamide increases REM sleep in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 95: 106–112.

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 Review*. 54:1161–202.

Ilan, A.B., Smith, M.E. & Gevins, A. (2004) Effects of marijuana on neurophysiological signals of working and episodic memory. *Psychopharmacology*. 176:214–222.

Jager, G., Kahn, R.S., Van Den Brink, W., Van Ree, J.M. & Ramsey, N.F. (2006) Long-term effects of frequent cannabis use on working memory and attention: an fMRI study. *Psychopharmacology*. 185: 358–368.

Jentsch, J.D., Andrusiak, E., Tran, A., Bowers, M.B. & Roth, R.H. (1997) Delta 9-tetrahydrocannabinol increases prefrontal cortical catecholaminergic utilization and

impairs spatial working memory in the rat: blockade of dopaminergic effects with HA966. *Neuropsychopharmacology*. 16:426–432.

Johnson, J.P., Muhleman, D., MacMurray, J., Gade, R., Verde, R., Ask, M., Kelley, J. & Comings, D.E. (1997) Association between the cannabinoid receptor gene (CNR1) and the P300 event-related potential. *Molecular Psychiatry*. 2:169-171.

Jonides, J., Smith, E.E., Koeppe, R.A., Awh, E., Minoshima, S. & Mintun, M.A. (1993) Spatial working memory in humans as revealed by PET. *Nature*. 363:623-625.

Jonides, J., Schumacher, E.H. & Smith, E.E. (1997) Verbal working memory load affects regional brain activation as measured by PET. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 9:462-475.

Kanayama, G., Rogowska, J., Pope, H.G., Gruber, S.A. & Yurgelun-Todd, D. A. (2004) Spatial working memory in heavy cannabis users: a functional magnetic resonance imaging study. *Psychopharmacology*. 176:239–247.

Klug, W. S., Cummings, M.R. & Spencer, C.A. (2006) *Conceptos de Genética*. Madrid: Pearson Education.

Linden, D.E.J. (2005) The P300: Where in the brain is it produced and what does it tell us? *Neuroscientist*. 11:563-576.

Linden, D.E.J. (2007) The Working Memory Networks of the Human Brain. *Neuroscientist*. 13:257-268.

Luciana, M. & Collins, P.F. (1997) Dopaminergic modulation of working memory for spatial but not object cues in normal humans. *Journal Cognitive Neuroscience*. 9:330–347.

Mannisto, P. & Kaakkola, S. (1999) Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology. *Pharmacological Review*. 51: 593–628.

Matlin, M.W. & Foley, H.J. (1996) *Sensación y percepción*. Tercera edición. México: Prentice Hall Hispanoamericana, S. A.

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*. 346:561-564.

Mattay, V.S., Goldberg, T.E., Fera, F., Hariri, A.R., Tessitore, A., Egan, M.F., Kolachana, B., Callicott, J.H. & Weinberger, D.R. (2003) Catechol O-methyltransferase val158-met genotype and individual variation in the brain response to amphetamine. *Proceedings of the National Academy of Science*. 100:6186-6191.

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., Grin, G., Bayewitch, M., Barg, J. and Vogel, Z. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*. 50:83-90.

Méndez-Díaz, M., Herrera-Solís, A., Soria-Gómez, E.J., Rueda, P.E. & Prospéro-García, O. (2008) Mighty cannabinoids: A potential pharmacological tool in medicine. En M.

Méndez Ubach y R. Mondragón-Ceballos (Eds.) *Neural Mechanisms of Action of Drugs of Abuse and Natural Reinforcers*. 137-157. India: Research Signpost. (pp. 137-157).

Munro, S., Thomas, K.L. & Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365:61-65.

Murillo-Rodríguez, E., Sánchez-Alavez, M., Martínez-González, D., Drucker-Colín, R. & Prospéro-García, O. (1998) Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Research*. 812:270-274.

Murillo-Rodríguez, E., Désarnaud, F. & Prospéro-García, O. (2006) Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sciences*. 79:30-37.

Novo Villaverde, F.J. (2007) *Genética humana. Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la genética en el campo de la Biomedicina*. Madrid: Pearson Education.

Núñez-Peña, M.I., Corral, M.J. & Escera, C. (2004) Potenciales evocados cerebrales en el contexto de la investigación psicológica: una actualización. *Anuario de Psicología*. 35:3-21.

Otero, G.A., Pliego-Rivero, B., Porcayo-Mercado, R. & Mendieta-Alcántara, G. (2008) Working memory impairment and recovery in iron deficient children. *Clinical Neurophysiology*. 119:1739-1746.

Owen, A.M., Downes, J.J., Sahakian, B.J., Polkey, C.E. & Robbins, T.W. (1990) Planning and spatial working memory following frontal lobe lesions in man. *Neuropsychologia*. 28:1021-1034.

Owen, A., McMillan, K., Laird, A. & Bullmore, E. (2005) N-Back Working Memory Paradigm: A Meta-Analysis of Normative Functional Neuroimaging Studies. *Human Brain Mapping*. 25:46 - 59.

Pattij, T., Wiskerke, J. & Schoffeleers, A.N.M. (2008) Cannabinoid modulation of executive functions. *European Journal of Pharmacology*. 585:458-463.

Pistis, M., Ferraro, L., Pira, L., Flore, G., Tanganelli, S., Gessa, G.L. & Devoto, P. (2002) Delta(9)-tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate and dopamine levels in the rat prefrontal cortex: An in vivo microdialysis study. *Brain Research*. 948:155-158.

Plomin, R., DeFries, J.C., McClearn, G.E. & McGuffin, P. (2001) *Behavioral Genetics*. Nueva York: Worth Publishers. 38-55.

Postle, B.R. & D'Esposito, M. (2000) Evaluating models of the topographical organization of working memory function in frontal cortex with event-related fMRI. *Psychobiology*. 28:132-145.

Ranganathan, M. & D'Souza, D.C. (2006) The acute effects of cannabinoids on memory in humans: a review. *Psychopharmacology*. 188:425-444.

Repovš, G. & Baddeley, A. (2006) The multi-component model of working memory: explorations in experimental cognitive psychology. *Neuroscience*. 139:5–21.

Schmidt, H., Jogia, J., Fast, K., Christodoulou, T., Haldane, M., Kumari, V. & Frangou, S. (2009) No gender differences in brain activation during the N-back task: an fMRI study in healthy individuals. *Human Brain Mapping*. 00:000–000.

Sham, P.C. & Curtis, D. (1995) Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Annals of Human Genetics*. 59: 97-105.

Shen, L., Basilion, J. & Stanton, V.J. (1999) Single nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proceedings of the National Academic Science*. 96:7871–7876.

Silva de Melo, L.C., Pinheiro, A., Rios, S.J., Rosane, A., Barreto, J. & Nakamura-Palacios, E.M. (2005)  $\Delta$ 9-THC administered into the medial prefrontal cortex disrupts the spatial working memory. *Psychopharmacology*. 183:54–64

Smith, E.E., Jonides, J., Koeppe, R.A., Awh, E., Schumacher, E.H. & Minoshima, S. (1995) Spatial versus object working memory: PET investigations. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 7:337-356.

Smith, E.E. & Kosslyn, S.M. (2008) *Procesos cognitivos. Modelos y Bases neurales*. Madrid:Pearson Education. 249-288.

Svíženská, I., Dubový, P. & Šulcová, A. (2008) Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures — A short review. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 90:501–511.

Twichell, W., Brown, S. & Mackie, K. (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology*. 78:43-50.

Ujike, H., Takaki, M., Nakata, K., Tanaka, Y., Takeda, T., Kodama, M., Fujiwara, Y., Sakai, A. & Kuroda, S. (2002) CNR1, central cannabinoid receptor gene, associated with susceptibility to hebephrenic schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. 7:515–518.

Wartmann, M., Campbell, D., Subramaniam, A., Burstein, S.H. & Davis, R.J. (1995) The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Letters*. 359:133-136.

Zhang, P.W., Ishiguro, H., Ohtsuki, T., Hess, J., Carillo, F., Walther, D., Onaivi, E.S., Arinami, T. & Uhl, G.R. (2004) Human cannabinoid receptor 1: 5'exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Molecular Psychiatry*. 9:916–931.

Zhang, Y., Bertolino, A., Fazio, L., Blasi, G., Rampino, A., Romano, R., Lee, M.T., Xiao, T., Papp, A., Wang, D. & Sadée, W. (2007) Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 20552-20557.