



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

Polimorfismo del gen CNR1 y su relación con el efecto del consumo de marihuana en el aprendizaje de procedimiento

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciado en Psicología

Presenta:

Ulises Caballero Sánchez

Directora de tesis:

Dra. Alejandra E. Ruiz Contreras

Revisor de tesis:

Mtro. Fernando Vázquez Pineda

Sinodales:

Dr. Hugo Sánchez Castillo

Dr. Octavio César García González

Dra. Mónica Méndez Díaz



México, D.F., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se desarrolló en el laboratorio de Neurogenómica Cognitiva, a cargo de la Dra. Alejandra E. Ruiz Contreras, en la Facultad de Psicología de la Universidad Nacional Autónoma de México con apoyo económico de PAPIIT, proyecto No. IN223314

Agradezco a PAPIIT, proyecto No. IN223314, por la beca recibida.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que se me otorgó del proyecto 176196, otorgado a la Dra. Alejandra E. Ruiz Contreras.

Agradecimientos:

Gracias principalmente a mi familia: mis padres, hermanos y sobrina. Que han estado apoyándome en todos los sentidos. Gracias por su paciencia, confianza y cariño. Mucho de lo que soy ahora se lo debo a ustedes.

Agradezco a Ale por aceptarme en su laboratorio y permitirme ser parte de su equipo de trabajo. Gracias por darme la oportunidad de formarme como investigador. Gracias por tus enseñanzas, tu tiempo y confianza.

Agradezco al Dr. Juan Antonio y a sus alumnos por el asesoramiento en el manejo del equipo de laboratorio y sus útiles consejos para realizar los análisis genéticos necesarios para mi trabajo.

Gracias a mis amigas Vero, Beatriz Ríos y Beatriz Castillo. Me dio mucho gusto compartir tantas experiencias con ustedes durante la carrera. Gracias también por escuchar mis problemas y preocupaciones. También agradezco a Tania y Gaby por todas las horas de estudio compartidas. Y a todas ustedes por aprender y divertirse juntos.

También agradezco a mis compañeros de laboratorio toda la ayuda brindada. Por todos los seminarios en los que me escucharon, por los participantes que me ayudaron a conseguir, y por la ayuda brindada para realizar la extracción de ADN y genotificación de mis participantes. Gracias también por hacer muy amena la convivencia en el laboratorio, por sus risas y compañerismo.

Gracias a mis sinodales por sus correcciones y sugerencias que tuvieron la finalidad de mejorar mi trabajo.

Gracias a la UNAM por ser mi Alma Mater y ser una fuente de conocimiento.

Finalmente, gracias a todos los participantes que hicieron posible este proyecto brindándome su tiempo para contribuir a la ciencia en México.

Índice

Lista de abreviaturas	3
Glosario	4
Resumen	5
1. Introducción.....	6
2. Antecedentes.....	9
2.1 Consumo de Marihuana	9
2.1.1 El componente activo más estudiado de la Marihuana: el Δ 9-THC	10
2.1.2 Sistema endocannabinoide	13
2.2 Aprendizaje de procedimiento	20
2.2.1 Medición de Aprendizaje de Procedimiento a través de la Tarea de Trazado de la Estrella a través del espejo	21
2.2.2 Regiones cerebrales asociadas al aprendizaje de procedimiento	22
2.2.3 Aprendizaje de procedimiento y sistema endocannabinoide	29
2.2.4 Aprendizaje de procedimiento y consumo de marihuana	30
2.3 Diferencias individuales y variaciones genéticas	32
3. Planteamiento del problema	37
4. Preguntas de Investigación	38
5. Hipótesis	38
6. Objetivos.....	38
7. Método.....	39
7.1 Participantes.....	39
7.1.1 Grupo de no consumidores de marihuana	39
7.1.2 Grupo de usuarios de marihuana	39
7.2 Instrumentos.....	40
7.3 Procedimiento	42
7.4 Tarea de trazado de estrella a través del espejo	43
7.5 Trazado de tarea control.....	44
7.6 Análisis de la muestra de saliva	45
7.6.1 Extracción, cuantificación y normalización de ADN.....	45

7.6.2 Genotipificación.....	47
7.7 Análisis estadístico	51
8. Resultados.....	52
8.1 Características de la muestra.....	52
8.2 Ejecución en el aprendizaje de procedimiento	57
9. Discusión	62
9.1 Limitaciones y sugerencias.....	65
10. Conclusión.....	66
11. Referencias	67

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

2-AG

A

AEA

AGBM

AMPc

ANOVA

CB1

DA

DAG

DAGL

DSM-IV

FAAH

G

LEM

MAGL

MAP

NAPE

Pb

PCR

PET

PI

Significado

Dos araquidonil glicerol

Adenina

Araquidonil-etanolamida o Anandamida

Agua grado biología molecular

Adenosín monofostato cíclico

Análisis de Varianza

Receptor a cannabinoides 1

Dopamina

Diacilglicerol

Diacilglicerol lipasa

Diagnostic and statistical manual of mental disorder-IV

Hidrolasa de ácidos grasos amidados

Guanina

Latencia de movimiento de ojos

Monoacilglicerol lipasa

Quinasas activadas por mitógenos

N-araquidonil fosfatidil-etanolamina

Pares de bases

Reacción en cadena de la polimerasa

Tomografía por emisión de positrones

Fosfatifilnositol

Glosario

ADN. Molécula de la herencia que está formada por una doble cadena que forma una hélice, cada cadena está formada por 4 bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina y timina.

ARNm. Ácido nucleico de cadena sencilla que es utilizado como molde para sintetizar proteína.

Atención. Proceso que permite a un individuo seleccionar información entrante para su futuro procesamiento al mismo tiempo que suprime información distractora.

Cebador. Cadena de ADN que puede ser alargada por medio de una ADN polimerasa.

Flexibilidad de comportamiento. Habilidad de un individuo para responder y ajustar su conducta a un estímulo ambiental.

Gen. Unidad fundamental de la herencia. Porción mínima de ADN que contiene la información necesaria para producir una proteína.

Haplotipo. Se refiere a un grupo de alelos que porta un individuo.

Oligonucleótido. Cadena corta de nucleótidos de menos de 20 nucleótidos.

PET. Técnica que consiste en detectar isótopos emisores de positrones de forma indirecta mediante la detección de los fotones producidos por la aniquilación de un positrón por un electrón a través de detectores de fotones.

RMf. Es una técnica que utiliza para medir la actividad cerebral a través de la detección de variaciones en la concentración de oxígeno en el flujo sanguíneo cerebral que se tiene cuando hay cambios en la actividad cerebral.

Resumen

Se han observado diferencias individuales durante la ejecución de tareas de memoria en función del polimorfismo rs2180619 del gen *CNR1*. Este gen codifica para un receptor llamado CB1, que forma parte del sistema endocannabinoide, el cual regula la liberación de diferentes neurotransmisores. Dicho sistema es afectado por el consumo de marihuana por medio de su componente principal, el Δ -9-tetrahidrocannabinol, que actúa en el receptor CB1. El objetivo de la presente investigación fue estudiar el efecto del consumo de la marihuana en el aprendizaje de procedimiento y si ese efecto depende del genotipo para el rs2180619. El aprendizaje de procedimiento fue evaluado por medio de la tarea de trazado a través del espejo. Para saber el genotipo del rs2180619 (AA, AG o GG) de los participantes se les pidió una muestra de saliva que fue analizada por medio del ensayo de discriminación alélica con sondas Taqman®. Los resultados muestran que el alelo G para el rs2180619 vulnera a consumidores de marihuana a presentar una menor eficiencia durante la fase inicial del aprendizaje de procedimiento en comparación con consumidores de marihuana no portadores del alelo G y con no consumidores portadores del alelo G.

1. Introducción

El consumo de marihuana se ha relacionado con el deterioro de algunas funciones cognitivas (i. e. flexibilidad de pensamiento, atención y memoria) (Pope, Deborah y Yurgelun-Todd, 1996; Pope, Gruber, Hudson, Huestts y Yurgelun-Todd, 2002; Lane, Cherek, Tcheremissine, Steinberg y Sharon, 2007). Este deterioro cognitivo se debe a que el principal componente psicoactivo de la marihuana, el Δ -9-tetrahidrocannabinol actúa en los receptores a cannabinoides 1 (CB1) (Howlett, et al., 1990; Matsuda, Lolait, Brownstein, Young y Bonner, et al., 1990). Estos receptores se encuentran distribuidos principalmente en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Herkenham et al., 1990), incluyendo el estriado y el cerebelo, que participan en el aprendizaje de procedimiento (Pistell, Nelson, Miller, Spangler, Ingram y Devan et al., 2009; Rueda-Orozco, Montes-Rodríguez, Sorua-Gómez, Méndez-Díaz y Prospéro-García et al., 2008; Daselaar, Rombouts, Vietman, Raaijmakers y Jonker, 2003). Este tipo de aprendizaje se refiere a la adquisición de nuevas habilidades, tales como aprender a bailar o saltar la cuerda (Squire y Wixted, 2011). En un estudio con personas que habían sido dependientes a marihuana alguna vez en su vida tardaron más en ejecutar una tarea de aprendizaje de procedimiento en comparación con personas que no presentaron dependencia. Cabe mencionar que utilizaron participantes infectados con VIH y que además habían sido dependientes a cocaína y heroína (González, Schuster, Vassileva y Martin, 2011), por lo que no se ha estudiado el efecto del consumo de marihuana *per se* sobre la eficiencia en el aprendizaje de procedimiento en humanos.

Es importante remarcar que no es claro el efecto del consumo a largo plazo de marihuana sobre la flexibilidad de pensamiento, aprendizaje, memoria y atención; existe evidencia que sugiere que la marihuana no provoca deterioro en estas funciones cognitivas

(Pope, Gruber, Hudson, Huestts y Yurgelun, 2001; Lyons, Bar, Panizzon, Toomey, Eisen, Xian y Tsuang, 2004; Jager, Block, Luitjen, y Ramsey, 2006; Crean, Crane, Mason, 2011). Esta falta de contundencia sobre el deterioro en las capacidades cognitivas pueden deberse a variaciones genéticas, que se han observado en individuos sanos (Ruiz-Contreras et al., 2013).

Entre estas variaciones genéticas que explican diferencias individuales en la función cognitiva están las del gen *CNR1* que codifica al receptor CB1. Esto significa que el *CNR1* tiene la información necesaria para que se sintetice dicho receptor, y es posible que la cantidad de receptor CB1 que se produzca en el cerebro o la manera en que funcione dependa de variaciones genéticas. Un polimorfismo candidato es el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) rs2180619 que se encuentra ubicado en una región potencialmente reguladora del gen. Se ha propuesto que este polimorfismo podría influir en la cantidad de CB1 que se produce dependiendo de su genotipo. En nuestro laboratorio hemos encontrado una asociación entre memoria de trabajo y los diferentes genotipos para este SNP (A/A, A/G y G/G), de tal forma que el incremento en la dificultad de una tarea de memoria de trabajo disminuye la eficiencia mayormente a personas que tienen genotipo G/G en comparación con personas con genotipo A/A (Ruiz-Contreras et al., en revisión). Cabe resaltar que no hubo diferencias significativas entre sexo, edad ni escolaridad entre los diferentes genotipos, además de que en el estudio sólo se aceptó la participación de personas sin antecedentes psiquiátricos o neurológicos. Se desconoce si el rs2180619 también se asocia con la eficiencia en el aprendizaje de procedimiento y si diferencias individuales en la eficiencia de este aprendizaje en usuarios de marihuana podrían explicarse parcialmente por variaciones genéticas.

El objetivo de esta investigación fue estudiar cómo se relaciona el consumo de marihuana con la capacidad de aprendizaje de procedimiento, dependiendo del polimorfismo rs2180619 polimorfismo del gen *CNR1*.

2. Antecedentes

2.1 Consumo de Marihuana

La marihuana es una sustancia preparada con las hojas y flores del *cannabis*. De acuerdo al *World Drug Report* del 2015, entre el 2.7% y 4.9% de la población mundial consume marihuana, lo que la convierte en una de las drogas de mayor uso después del tabaco y el alcohol. En México, la marihuana es la droga ilegal más consumida, reportándose un 1.2 % de consumidores en el 2011 (ENA, 2011). Se piensa que el alto consumo de marihuana, al menos en otros países, está relacionado con la facilidad del acceso a marihuana (MacCoun y Reuter, 2001; Cerdá, Wall, Keyes, Galea y Hasin, 2012).

El consumo agudo de marihuana está asociado a síntomas subjetivos de euforia, sedación, risa continua, letargo, intensificación de sensaciones ordinarias y distorsión perceptual. Además de estar asociado a un incremento en el apetito, boca seca, aumento en la tasa cardíaca y en la presión sanguínea (Karila, Roux, Rolland, Benyamina, Aubin y Lancon, 2014).

En general, los estudios sobre los efectos después de no más de 7 días de abstinencia de consumo de marihuana verificado mediante el uso de pruebas de orina para detectar metabolitos del $\Delta 9$ -THC (delta-9-tetrahidrocannabinol) para descartar que se encuentren bajo los efectos agudos concuerdan en que existe un deterioro en la memoria y el aprendizaje (Pope et al., 2001; Pope et al., 2002); la flexibilidad de comportamiento¹ (Bolla, Brown, Eldreth, Tate y Cadet, 2002; Solowij et al., 2002; Lane et al., 2007; Weinstein et al., 2008); y atención² (Solowij et al., 2002).

¹ Habilidad de un individuo para responder y ajustar su conducta a un estímulo ambiental (Coppens et al., 2010).

² Proceso que permite a un individuo seleccionar información entrante para su futuro procesamiento al mismo tiempo que suprime información distractora (Stevens & Bavelier, 2012).

Pope et al. (2001), mostraron que hay un deterioro al memorizar una lista de palabras a los 0, 1 y 7 días de abstinencia en personas consumidoras de marihuana en comparación con un grupo control, pero no después de 28 días. Estos resultados difieren de los reportados por Bolla et al. (2002), quienes encontraron en personas que consumieron marihuana de forma preferencial y al menos durante 2 años, una correlación entre el número de cigarros fumados por semana (2-117) y las deficiencias en pruebas de memoria verbal, memoria y aprendizaje visual, funcionamiento ejecutivo, velocidad de procesamiento y habilidad manual, incluso después de 28 días de abstinencia. Entre más cigarros fumaran por semana, menos eficientes eran en dichas pruebas. Dado estos resultados podemos pensar que el déficit cognitivo podría mantenerse a largo plazo sólo en consumidores frecuentes de marihuana (i.e. consumos mayores a 5000 veces).

2.1.1 El componente activo más estudiado de la Marihuana: el Δ 9-THC

Uno de los componentes activos más estudiados de la marihuana es el Δ 9-THC el cual es responsable, al menos en parte, de los efectos en el estado de ánimo y en funciones cognitivas (Weinstein et al., 2008). El Δ 9-THC fue aislado en el año de 1964 por Gaoni y Mechoulam a partir de un extracto de hachís. La estructura química del Δ 9-THC puede observarse en la Figura 1. El Δ 9-THC puede ser detectado en sangre después de su administración aguda.

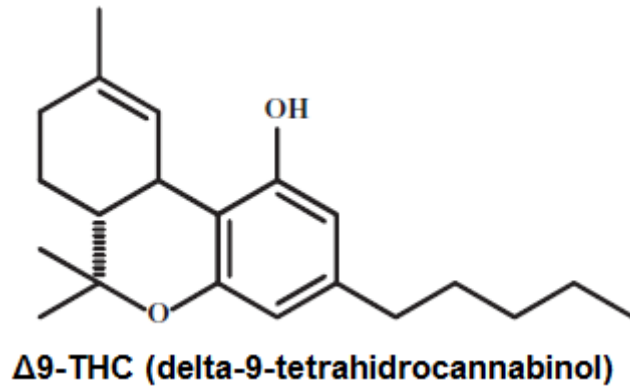


Figura 1. Estructura química del componente activo de la marihuana más estudiado: el Δ 9-THC (Modificado de Mechoulam y Parker, 2013).

En un estudio realizado por Brenneisen, Meyer, Chtioui, Surgy y Kamber (2010), se detectó que el tiempo máximo (tiempo en el que el fármaco llega a su máxima concentración en sangre) es a los 5 minutos después de inhalar un cigarro que liberó 45 mg de THC (ver Figura 2). Se observa que la máxima concentración de Δ 9-THC fue de 4.2 a 59.1 ng/mL; mientras que el tiempo en el que se pudo detectar a la cantidad mínima de Δ 9-THC fue de los 10 a los 360 minutos. Estos datos nos hablan de una gran variabilidad en el metabolismo del Δ 9-THC entre los participantes que puede explicarse por diferencias en la experiencia previa de consumo de marihuana (Brenneisen et al., 2010).

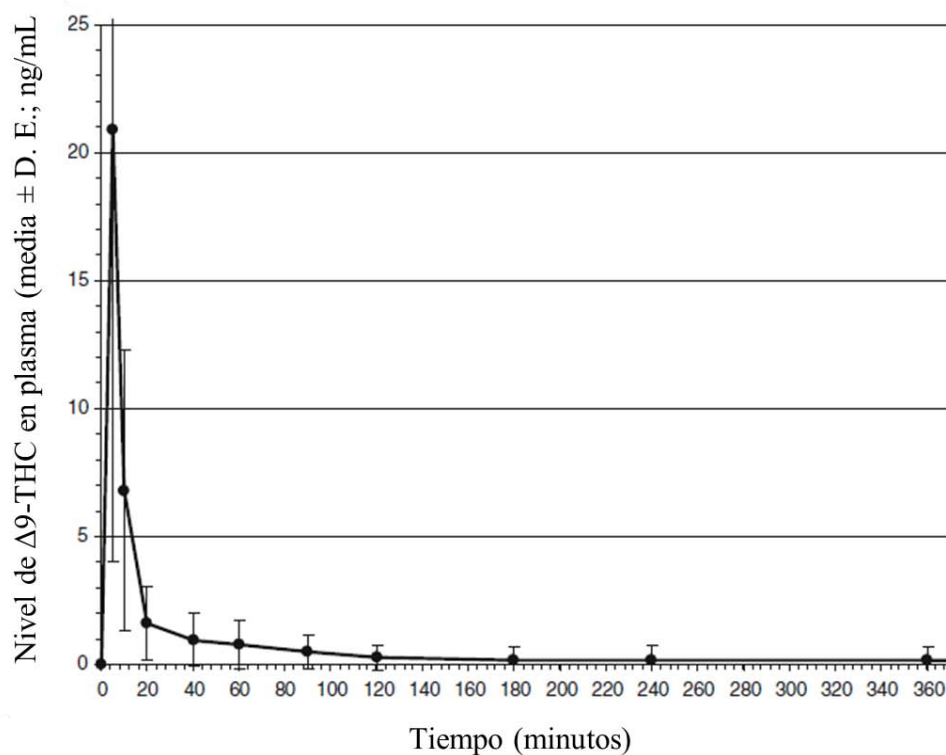


Figura 2. Niveles de $\Delta 9$ -THC en plasma después de fumar un cigarro de cannabis. El pico máximo de concentración es a los 5 minutos después de haber inhalado un cigarro de cannabis. La concentración mínima detectable fue posible hasta los 360 minutos. Se observa gran variabilidad, mediante las barras de error, entre individuos (Modificado de Brenneisen et al., 2010).

La administración aguda del $\Delta 9$ -THC en consumidores de marihuana tiene efectos cognitivo-motores, subjetivos y autónomos (Weinstein et al., 2008). Weinstein et al. (2008) realizaron un estudio doble ciego en el cual se administró 17 mg y 13 mg de $\Delta 9$ -THC en dos sesiones a 14 usuarios dependientes de marihuana. Los participantes tuvieron que realizar una tarea que involucraban movimientos coordinados (tarea de laberinto virtual), además de que se obtuvieron medidas subjetivas de auto-reporte y medidas autónomas (e.g. tasa cardiaca y presión sanguínea). El $\Delta 9$ -THC fue proporcionado en forma de cigarrillos con nicotina (0.1 mg) en dos días diferentes. En una de las sesiones se administró un cigarro con 17 mg de $\Delta 9$ -THC, y dos horas después un cigarro sin $\Delta 9$ -THC. En otra de las sesiones

se administró un cigarro con 13 mg dos horas después de la administración de un cigarro sin $\Delta 9$ -THC. Se encontró que había diferencias significativas en el número de colisiones con las paredes del laberinto en la tarea de laberinto virtual después de haber consumido 17 mg de $\Delta 9$ -THC en comparación con el cigarro control y con el cigarro de 13 mg de THC.

En cuanto a las medidas de auto-reporte, ante ambas dosis de THC, las personas manifestaron mayor satisfacción, más placer, reportaron sentirse más “*high*”, menos alerta y la sensación de tener la boca seca en comparación con el cigarro control. Igualmente, se hallaron efectos en las medidas autonómicas evaluadas: en el ritmo cardíaco se encontró un aumento en la tasa de latidos por minuto cuando se administró 17mg de $\Delta 9$ -THC en comparación con la administración de placebo y la dosis de 13mg. Para la presión sanguínea sistólica, los resultados fueron similares; mientras que para la presión sanguínea diastólica sólo hubo un aumento con la administración de 13mg de $\Delta 9$ -THC en comparación con el placebo. Este estudio nos ayuda a comprender que los efectos agudos subjetivos que reportan los consumidores de marihuana se deben, al menos en parte, al $\Delta 9$ -THC, así como sus efectos periféricos y en habilidades motoras (Weinstein et al., 2008).

2.1.2 Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide es un sistema neuromodulador tanto de sinapsis inhibitoras como excitadoras del SNC (Micale, Di Marzo, Sulcova, Wotjak y Drago, 2012), que consta de un mecanismo de recaptura, de enzimas para la biosíntesis de endocannabinoides o de inactivación, de receptores y de ligandos endógenos (Micale et al., 2012).

Los endocannabinoides son metabolitos de lípidos membranales que son parte de una gran cantidad de lípidos modificados y moléculas de ácidos grasos que han sido implicados en señalamiento intercelular (Lovinger, 2008). Los endocannabinoides más

prominentes en el cerebro y la periferia son el araquidonil-etanolamida (AEA o anandamida) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Devane et al. 1992; Mechoulam et al. 1995). También se ha descrito a la 9, 10-octadecenoamida (Oleamida), que fue descubierta en líquido cefalorraquídeo de gatos privados de sueño (Cravatt et al., 1995). Las estructuras de los endocannabinoides mencionados están representadas en la Figura 3. Estos endocannabinoides no se encuentran almacenados en vesículas, sino que se sintetizan a demanda, es decir cuando y donde se necesiten (Mechoulam y Parker, 2013).

Una vía de síntesis de la anandamida es a partir de la hidrólisis de la N-araquidonil fosfatidil-etanolamina (NAPE) por la actividad de la fosfodiesterasa tipo D (Di Marzo et al, 1994; Cascio y Marini, 2015). La NAPE también puede ser hidrolizada por la fosfolipasa C, transformándola en fosfoanandamida, que a su vez es desfosforilada por fosfatasas, dando como resultado a la anandamida (Liu et al., 2006; Cascio y Marini, 2015). También se han descrito que la anandamida se forma a partir de la N-acil-lisofosfatidil-etanolamina por medio de la enzima lisofosfolipasa-D (Cascio y Marini, 2015). En cuanto a su degradación, se ha encontrado que la hidrolasa de ácidos grasos amidados (FAAH), que es una hidrolasa serina unida a membrana intracelular (Piomelli, 2003), transforma a la anandamida en ácido araquidónico, componente que ya no forma parte del sistema endocannabinoide (Cravatt, Giang, Mayfield, Boger, Lemer y Gilula, 1996; Mechoulam y Parker, 2013). Cabe resaltar que la FAAH también es responsable de la hidrólisis de la Oleamida a ácido oleico, el cual es un componente inactivo (Cravatt et al., 1996; Guiffrida, Beltramo y Piomelli, 2001). Adicionalmente, se ha sugerido que la FAAH también contribuye a la síntesis de la Oleamida en un proceso a la “inversa” a partir de ácido oleico e hidróxido de amonio (Bisogno et al., 1997; Guiffrida, Beltramo y Piomelli, 2001).

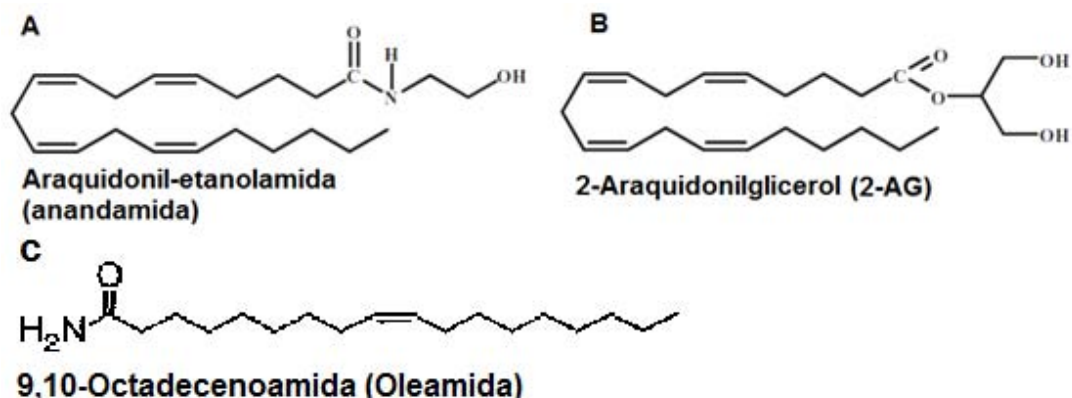


Figura 3. Estructura de diferentes endocannabinoides. En A se muestra la estructura de la anandamida; en B se representa la estructura de 2-AG; y en C se observa la estructura de la oleamida. Modificado de Mechoulam y Parker, 2013; y Cravatt et al., 1995.

Por otra parte, la vía de la síntesis del 2-AG comienza por la hidrólisis del fosfatidilinositol (PI) por la fosfolipasa C, lo que da como resultado la formación de diacilglicerol (DAG). Posteriormente, el DAG se hidroliza por medio de la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL, por sus siglas en inglés), que finalmente resulta en 2-AG (Sugiura et al., 1995). La monoacilglicerol lipasa (MAGL, por sus siglas en inglés) es la principal enzima encargada de hidrolizar al 2-AG y, por lo tanto, de inactivarla (Dihn et al., 2002). Cabe resaltar que Blankman, Simon, y Cravatt (2007) han encontrado otras enzimas que también presentan actividad hidrolasa para el 2-AG: FAAH, α/β -hidrolasa-6 y α/β -hidrolasa-12. Sin embargo, también concluyen que la MAGL es la enzima que tiene mayor actividad hidrolasa para el 2-AG.

Los endocannabinoides anteriormente descritos (anandamida, oleamida y 2-AG) actúan principalmente de forma retrograda, es decir que se liberan desde la neurona postsináptica y actúan en la neurona presináptica (Lovinger, 2008). Una de las razones para pensar en que actúan de esta forma es que uno de los receptores al que se unen los endocannabinoides, el receptor a cannabinoides 1 (CB1), se encuentra principalmente en la

neurona presináptica (Matsuda et al. 1990; Devane, Dysarz, Jhonson, Melvin y Howlett, 1988). Este receptor fue identificado por Devane et al. (1988) por medio del cannabinoide CP-55,940 en tejido de cerebro de rata; mientras que su homólogo el CB2 fue detectado por Munro, Thomas y Abu-Shaar (1993) en regiones del bazo de rata por medio de la detección de ARNm³.

La activación de los receptores CB1 produce una cascada de señalización en la neurona presináptica. Esto incluye una reducción en la cantidad de adenosín monofosfato cíclico (AMPC, por sus siglas en inglés) (Wade, Tzavara y Nomikos, 2004), que a su vez produce una inhibición de la proteína quinasa A (PKA, por sus siglas en inglés). La activación de los receptores CB1 también inhiben a la adenilato ciclasa (Davis et al., 2003). Si la adenilato ciclasa es inhibida junto con la PKA, se activan proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP) (Davis, Ronesi, Lovinger, 2003). La MAP está relacionada con la regulación de la activación de la transcripción genética (Zassodowski, Rochette-Egly, Chomienne y Cassinat, 2012). Adicionalmente, se ha comprobado que la activación del receptor CB1 inhibe las corrientes de Calcio (Pan, Ikeda y Lewis, 1996).

Lo anterior conlleva a una disminución en la probabilidad de liberar al neurotransmisor (Köfalvi et al., 2005). En el estudio de Köfalvi et al. (2005) se analizó farmacológicamente el efecto de los cannabinoideos en 3 sistemas de neurotransmisión y también la distribución del CB1 en la sinapsis. Fue un estudio con cortes estriatales de rata, en el cual se extrajeron los sinaptosomas (terminales sinápticas aisladas que incluye al axón de la neurona presináptica). Para saber la localización de los receptores CB1 utilizaron anticuerpos con un marcador fluorescente. El CB1 se encontró en el 60% de las terminales

³ Ácido nucleico de cadena sencilla que es utilizado como molde para sintetizar proteínas (Klug et al., 2006).

nerviosas. Los porcentajes de las diferentes terminales nerviosas que presentaban CB1 se muestran en la Tabla 1.

Por otra parte, la estimulación del receptor CB1, por medio del cannabinoide WIN55212-2, disminuyó la liberación de glutamato y de GABA, pero no de dopamina (DA) (Köfalvi et al., 2005). Esto concuerda con otros estudios en donde se ha identificado al CB1 en terminales presinápticas de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas (Hill et al., 2007), aunque también se ha detectado en neuronas serotoninérgicas (Haring, Marsicano, Lutz y Monroy et al., 2007). Lo anterior sugiere que el sistema endocannabinoide está ampliamente distribuido y modula la liberación de glutamato, GABA, y potencialmente de serotonina. Köfalvi et al. (2005) no encontró evidencia de que el sistema endocannabinoide modulara al dopaminérgico, lo cual contrasta con el estudio realizado por Polissidis et al. (2013).

Tabla 1. Porcentaje de terminales nerviosas GABAérgicas, glutamatérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas en las que se expresa CB1.

Tipo de terminal nerviosa	Porcentaje en el que se encontró CB1
GABAérgicas	70%
Glutamatérgicas	60%
Noradrenérgicas y dopaminérgicas	20%

En el estudio de Polissidis (2013) se demostró que la estimulación del receptor CB1 regulaba la liberación de dopamina en el estriado, núcleo accumbens y corteza prefrontal. Esto se evaluó comparando los tratamientos vehículo/vehículo y vehículo/WIN55,212-2x (1 mg/kg). En el estriado y en la corteza prefrontal hubo un aumento en la liberación de dopamina cuando se comparó la condición de vehículo/WIN55,212-2 con la de

vehículo/vehículo a los 30 y 60 minutos de administración. En el núcleo accumbens se encontró un efecto parecido a los 60 y 90 minutos después de la administración.

Los anteriores estudios demuestran que el sistema endocannabinoide regula la liberación de dopamina y GABA, y se ha demostrado que estos sistemas de neurotransmisión (dopaminérgico y GABAérgico) participan en el aprendizaje de procedimiento (Rammsayer, Rodewald & Groh, 2000).

Herkenham et al. (1991) realizaron un estudio *post mortem* para saber la distribución del receptor CB1 en encéfalo humano. Para realizar el estudio utilizaron un agonista (CP55,940) radiomarcado con tritio para posteriormente realizar una autoradiografía de cortes cerebrales. Encontraron que el CB1 en humanos se expresaba en grandes cantidades en el estriado, globo pálido, sustancia negra, giro dentado del hipocampo, cerebelo, corteza entorrinal y corteza cerebral. Por otra parte, Burns et al. (2007) realizó un estudio con la tomografía por emisión de positrones⁴ (PET, por sus siglas en inglés) en humanos. En este estudio se empleó un agonista inverso con alta afinidad al receptor CB1 que es detectado para conocer la distribución del receptor CB1. En la Figura 4 se muestran tres cortes de cerebro humano en donde los colores que tienden a ser cálidos representan áreas con mayor densidad del receptor CB1, mientras que las áreas que tienden a colores fríos representan áreas con menor densidad del receptor CB1. Las áreas con mayor cantidad de receptor CB1 fueron el estriado, corteza frontal y cíngulo posterior; las áreas con menor cantidad de receptor CB1 fueron tálamo e hipocampo; mientras que en el cerebelo se encontró una

⁴ La tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica que consiste en detectar isótopos emisores de positrones de forma indirecta mediante la detección de los fotones producidos por la aniquilación de un positrón por un electrón a través de detectores de fotones. En algunos casos los isótopos son utilizados para “etiquetar” alguna molécula y de esta forma observar la distribución de una segunda sustancia (Pietrzyk et al, 1997).

cantidad intermedia de receptor. Estos resultados concuerdan con los de Normandin et al. (2015).

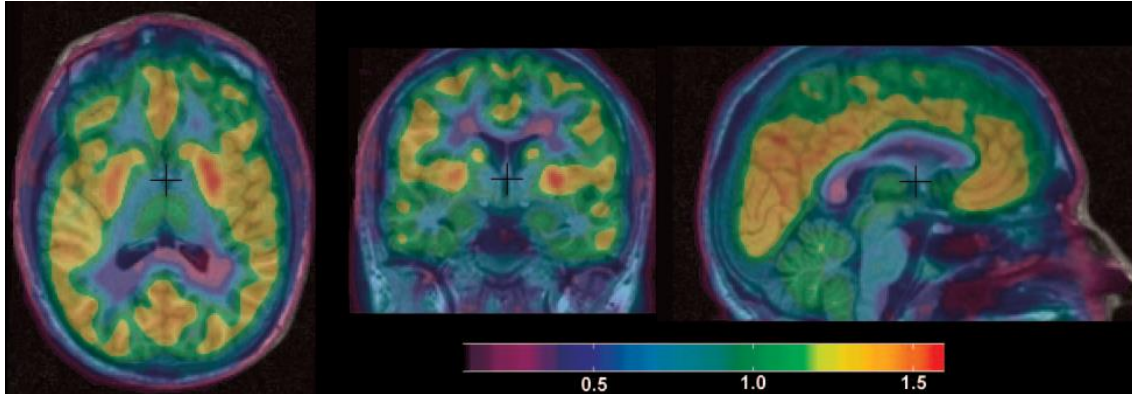


Figura 4. Se muestran cortes de cerebro humano (transversal, coronal y sagital). La escala indica la concentración de receptor expresado: entre más se acerca al rojo, mayor la concentración. Se observa que hay una amplia distribución del receptor CB1 en todo el cerebro.

Waes, Beverley, Siman, Tseng y Steiner (2012) evaluaron la expresión del CB1 en el estriado en ratas adultas, por medio de un mapeo del ARNm. Los investigadores dividieron al estriado en porciones dorsolaterales, ventrolaterales, ventrales y mediales. El CB1 estuvo expresado de forma predominante en los sectores dorsolaterales y ventrolaterales, que son secciones sensoriomotoras del estriado, con una menor expresión en regiones ventrales y mediales del estriado, que son sectores límbicos/asociativos. En general, este estudio nos muestra que hay una mayor expresión del CB1 en la parte más dorsal del estriado (regiones del caudado-putamen) que en la ventro-medial (núcleo accumbens).

Hirvonen, et al. (2012) evaluaron la expresión del receptor CB1 en humanos consumidores de marihuana (personas que consumían diariamente cannabis) y lo compararon con no consumidores utilizando la técnica PET. En este caso utilizaron como

unidad de medida el volumen de distribución (proporción de la concentración del radioligando de una región de tejido (e.g. estriado) con la de plasma). Hirvonen et al. (2012) encontraron que los consumidores de marihuana expresaban menos CB1 en las siguientes áreas: corteza anterior, cíngulo, hipocampo, ínsula, corteza occipital, corteza parietal, corteza posterior cingulada, corteza temporal lateral, corteza prefrontal y corteza temporal lateral. Después de veintiséis días de abstinencia se realizó otro escaneo que donde se observó un incremento en la expresión del receptor CB1 en todas las áreas anteriormente mencionadas en el grupo de consumidores, excepto hipocampo (Hirvonen et al., 2012). Los autores concluyen que sus resultados pueden deberse a una neuroadaptación promovida por la dependencia de marihuana. Esta neuroadaptación puede consistir tanto en un cambio en la concentración de CB1 como en un cambio de afinidad (Hirvonen et al., 2012). Este estudio tiene la limitante de que en el segundo escaneo no se compara los niveles de CB1 de consumidores con no consumidores, así que no se sabe si los niveles de CB1 en consumidores vuelven a un nivel normal. Sin embargo, este estudio nos ayuda a saber que el consumo de marihuana modifica al sistema endocannabinoide, por medio de los receptores CB1. Dicho receptor es necesario para el aprendizaje de procedimiento (Rueda Orozco et al., 2008), el cual será descrito en las siguientes secciones.

2.2 Aprendizaje de procedimiento

El aprendizaje de procedimiento es la adquisición de habilidades que operan en forma automática, que se adquieren gradualmente, de forma inconsciente y con poca habilidad para describir cómo se aprendió (Squire, 2009; Squire y Wixted, 2011; WolkyBuson, 2010). Por ejemplo, aprender a conducir un carro, aprender a utilizar una máquina de coser o tocar un instrumento como la guitarra y el piano (Swcatt, 2010).

Aunque el aprendizaje de procedimiento se caracteriza porque la evocación del recuerdo es de forma inconsciente, en los primeros estadios de aprendizaje hay un componente consciente; sin embargo, este componente desaparece conforme incrementa la práctica en dicho aprendizaje (Swcatt, 2010).

El aprendizaje de procedimiento se descubrió a partir del estudio de H. M., que fue un paciente a quien se le extrajo el lóbulo temporal medial bilateral para aliviar la epilepsia que padecía (Scoville y Milner, 1957). Esta intervención provocó en H. M. incapacidad de formar nuevos recuerdos a largo plazo que tuvieran que ver con hechos del mundo y eventos personales (memoria declarativa) (Scoville y Milner, 1957; Milner et al., 1998). Sin embargo, H. M. aún podía aprender una tarea que requería de habilidades motoras: la tarea de trazado de la Estrella a través del Espejo.

2.2.1 Medición de Aprendizaje de Procedimiento a través de la Tarea de Trazado de la Estrella a través del espejo

En la tarea de trazado de la estrella a través del espejo se le muestra al participante una estrella de doble margen, y posteriormente se le pide que dibuje una línea entre los dos márgenes, con la restricción de que el participante no pueda ver directamente su mano ni la estrella, sino que los observe a través de un espejo. En esta situación las personas tienden a mover la mano en dirección contraria a la correcta, aunque, conforme pasan los ensayos, se aprende a moverla en la dirección correcta y, posteriormente, la ejecución en esta tarea se automatiza (Milner, 2005). Teniendo en cuenta que automatizar se refiere a la habilidad de las personas para ejecutar una tarea con poco esfuerzo, en comparación de cuando era una tarea novedosa (Poldrack et al, 2005). Esta automatización requiere de entrenamiento o práctica.

La tarea de trazado de la estrella a través del espejo involucra un “re-aprendizaje” de una habilidad, ya que normalmente sabemos cómo dibujar pero no a través de un espejo. Además, implica un aprendizaje inhibitorio: aprendemos a inhibir una conducta anteriormente aprendida (i. e. dibujar normalmente).

La mejora en la ejecución de esta tarea requiere específicamente de aprendizaje de procedimiento. Este tipo de aprendizaje permite realizar diferentes habilidades motoras sin evocar de forma consciente el conocimiento necesario para llevar a cabo dichas habilidades. Por ejemplo, cuando las personas han aprendido a conducir un automóvil no necesitan estar pensando en todos los pasos necesarios para conducir de forma adecuada; simplemente lo realizan. A continuación se describirán algunas de las regiones cerebrales asociadas al aprendizaje de procedimiento.

2.2.2 Regiones cerebrales asociadas al aprendizaje de procedimiento

El núcleo estriado es una estructura que participa en el aprendizaje de procedimiento (Pistell et al., 2009). Un estudio en el que se demuestra lo anterior es el de Pistell et al. (2009), en el cual se lesionó el estriado a ratas comparándolas con ratas sin lesión. Posteriormente, las entrenó en una tarea de laberinto complejo, en la cual los roedores necesitaban aprender a ejecutar una secuencia de movimientos (Ver figura 5). En esta tarea se mide aprendizaje de procedimiento. Se realizaron quince ensayos que se dividieron en cinco bloques de tres. Pistell et al. (2009) descubrieron que las ratas con lesión en el estriado (lateral y medial) cometieron más errores desde el segundo bloque de ensayos hasta el quinto en comparación con el grupo control. Además, las ratas con lesión en el estriado no disminuyeron la cantidad de errores. Esta evidencia sugiere que el núcleo estriado (tanto lateral como medial) es una estructura necesaria para el aprendizaje de procedimiento (Pistell et al., 2009).

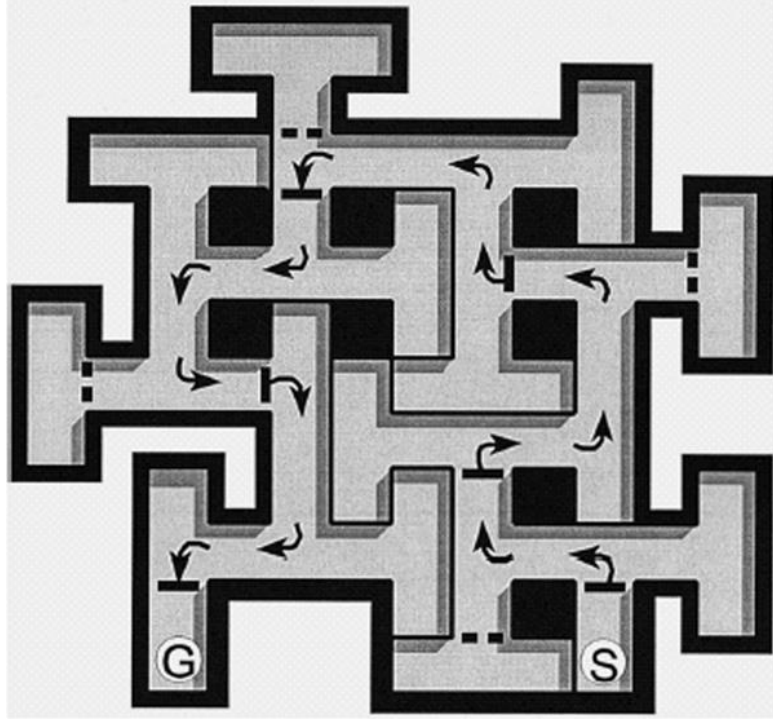


Figura 5. Esquema del laberinto complejo. Las flechas indican el camino correcto desde la salida (S) hasta la meta (G). Las líneas gruesas entre los pasajes indican puertas que bajaban una vez que la rata pasaba a la siguiente sección para evitar que regresara a la sección anterior. Las líneas punteadas señalan puertas falsas que sirvieron para evitar que las puertas verdaderas dieran claves del camino correcto (Pistell et al., 2009).

El núcleo estriado pertenece a los núcleos de la base que están conformados por el núcleo caudado, putamen, globo pálido, núcleo subtalámico y la sustancia negra (Seger, 2006). El estriado se conforma por el caudado y el putamen (Seger, 2006; Ver figura 6).

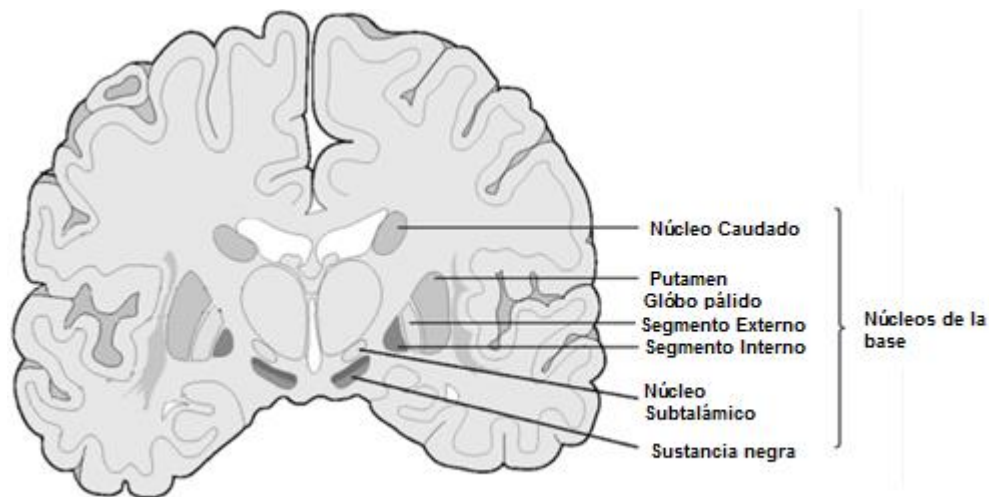


Figura 6. Representación de los núcleos de la base en un corte coronal de cerebro humano que están conformados por: el estriado (núcleo caudado y putamen), globo pálido (interno y externo), sustancia negra y núcleo subtalámico. Modificado de Kandel et al., 2013.

En humanos también se ha encontrado evidencia de la relación entre el aprendizaje de procedimiento y el núcleo estriado. Daselaar et al. (2003) realizaron un estudio en donde se describía el patrón de activación cerebral mediante la técnica de resonancia magnética funcional (RMf)⁵ mientras realizaban una tarea de aprendizaje de procedimiento. Se encontró que hubo mayor señal BOLD cuando los participantes tenían que aprender una secuencia fija de posiciones de puntos (secuencia de aprendizaje) en comparación a cuando se les presentaba una secuencia aleatoria (línea base) en el putamen bilateral, núcleo caudado izquierdo, globo pálido derecho, cíngulo anterior derecho (ver Figura 7), giro

⁵ La RMf es una técnica que se utiliza para medir la actividad cerebral a través de la detección de variaciones en la concentración de oxígeno en el flujo sanguíneo cerebral que se tiene cuando hay cambios en la actividad cerebral. Como unidad de medida en esta técnica se utiliza la dependencia del nivel de oxígeno en la sangre, llamado BOLD, por sus siglas en inglés (Cattani, 2012). El BOLD se puede medir mientras participantes realizan alguna tarea, por ejemplo aprendizaje (Chen y Li, et al., 2012), o sea que la RMf es una técnica que permite asociar la actividad cerebral con procesos como el aprendizaje.

frontal inferior izquierdo, giro frontal medial derecho, giro frontal superior derecho, giro frontal superior izquierdo, giro precentral derecho, giro precentral izquierdo, giro temporal superior derecho, giro temporal superior izquierdo, lóbulo parietal superior bilateral, lóbulo parietal derecho, giro lingual derecho, giro lingual izquierdo y cerebelo derecho (ver figura 8).

Por otra parte, Bédards y Sanes (2014) encontraron una relación entre la activación del lóbulo parietal inferior derecho, lóbulo parietal superior izquierdo, surco izquierdo intra-parietal, giro temporal superior izquierdo, giro frontal superior derecho, corteza sensorial, giro occipital medial izquierda y corteza prefrontal derecha y el aprendizaje de procedimiento durante 8 bloques. Esta relación implica que dichas áreas van incrementando su actividad conforme los participantes practican hasta el bloque 4 y posteriormente disminuyen su activación hasta el bloque 8.

Cabe mencionar que entre las áreas cerebrales que fueron asociadas al aprendizaje de procedimiento estuvieron el núcleo caudado, varias áreas de la corteza y el cerebelo que son estructuras que presentan grandes cantidades de receptor CB1 (ver apartado **2.1.2 Sistema endocannabinoide**).

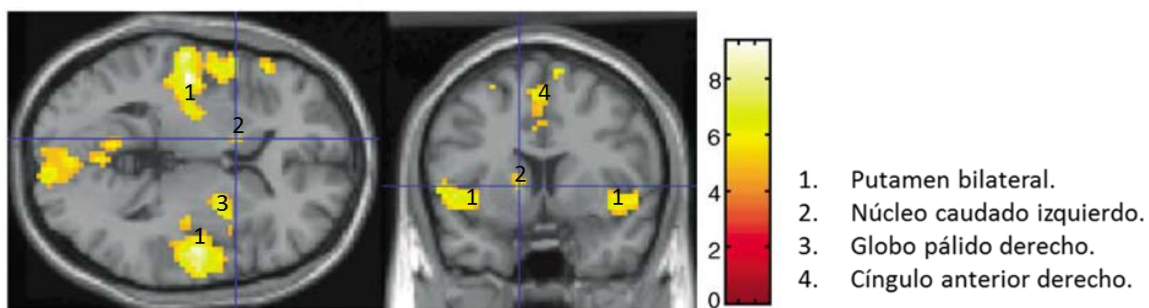
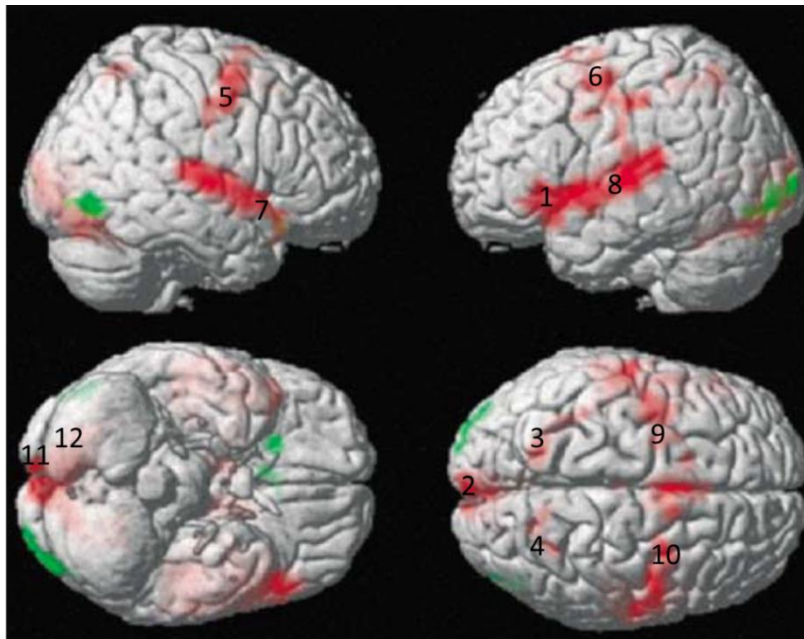


Figura 7. Representación de la activación de regiones de los núcleos de la base y del cíngulo. En amarillo se encuentran las áreas que fueron mayormente activadas durante la secuencia de aprendizaje en comparación con la de línea base. Modificado de Daselaar et al. (2003).



- 1: Giro Frontal Inferior izquierdo.
- 2. Giro Frontal Medial derecho.
- 3. Giro frontal superior derecho.
- 4. Giro frontal superior izquierdo.
- 5. Giro precentral derecho.
- 6. Giro precentral izquierdo.

- 7. Giro temporal superior derecho.
- 8. Giro temporal superior izquierdo.
- 9. Lóbulo parietal superior derecho.
- 10. Lóbulo parietal superior izquierdo.
- 11. Giro lingual derecho.
- 12. Cerebelo derecho.

Figura 8. Representación de la activación de distintas áreas cerebrales cuando se comparó la condición de línea base con la secuencia de aprendizaje. En rojo se encuentran las áreas que se activaron más en la condición de secuencia de aprendizaje en comparación con la línea base. Los números corresponden a dichas áreas. Modificado de Daselaar et al. (2003).

También se ha encontrado que el hipocampo participa en el aprendizaje de procedimiento (Albouy et al., 2008). En este estudio, participantes realizaron una tarea de aprendizaje de procedimiento mientras se registraba su actividad cerebral con RMf. Se les presentaba dos secuencias de posiciones de puntos: una que tenían que aprender y otra aleatoria. Observaron que los participantes disminuyeron la latencia de movimientos de ojos (LEM) para la secuencia aprendida y para la aleatoria cuando se comparó la sesión de práctica con la de evaluación en los grupos que se evaluaron treinta minutos y cinco horas después. Por otro lado, los participantes que fueron evaluados 24 horas después sólo disminuyeron su LEM en la secuencia aprendida, esto quiere decir que hubo una consolidación específica.

Además, encontraron que hubo mayor activación tanto en el hipocampo como en el núcleo caudado en las secuencias aprendidas en comparación con las secuencias no entrenadas. También se encontró que entre más se activaba el hipocampo durante la sesión de práctica, mayor era la diferencia entre las LEMs de las secuencias de práctica y evaluación. Los autores también reportan una correlación negativa entre la activación del hipocampo posterior izquierdo y el putamen ventral izquierdo (una estructura estriatal) durante las secuencias de práctica en entrenamiento (ver figura 9). Además de lo anterior, se observó que la activación en hipocampo posterior izquierdo y cerebelo disminuía a través del entrenamiento, mientras que la activación incrementó en putamen de forma bilateral en porciones dorsales y ventrales. Estos resultados se pueden interpretar como que, a pesar de que durante el aprendizaje de una habilidad motora hay una competencia entre el hipocampo y el estriado, ambas áreas son necesarias para la evocación de dicho aprendizaje, además del tálamo y del cerebelo. También demuestra que para este

aprendizaje de procedimiento se asocia el hipocampo, lo que concuerda con el estudio realizado por Rueda-Orozco et al. (2008).

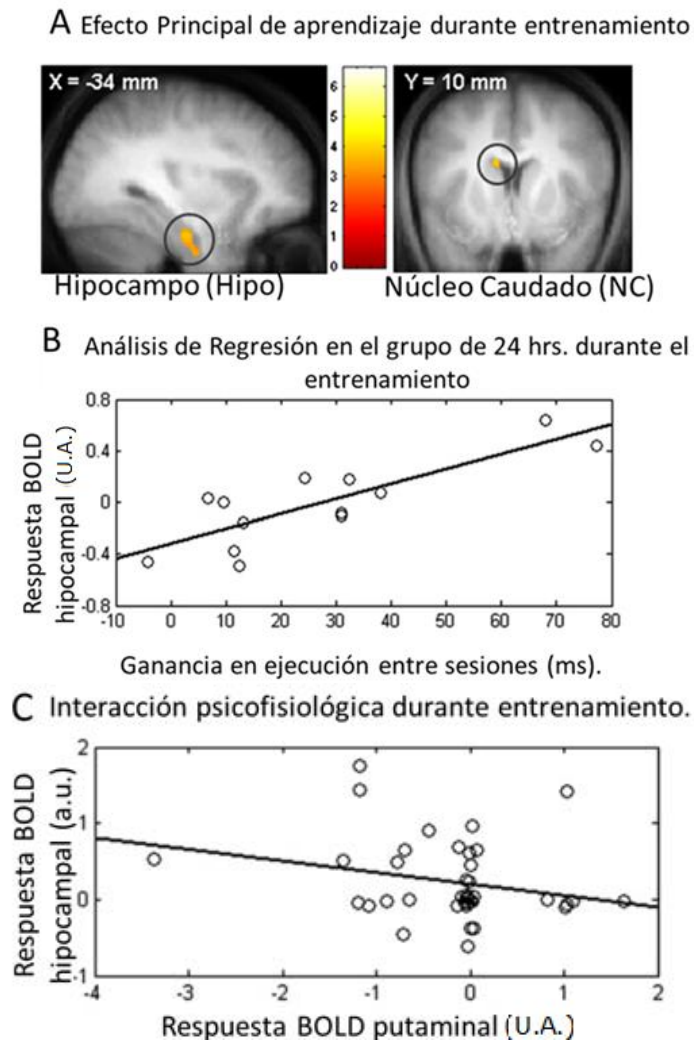


Figura 9. Resultados de la técnica de imagen por RMf asociados a aprendizaje de procedimientos. En A se observa el efecto principal de aprendizaje durante entrenamiento cuando se restó la activación durante condición de aprendizaje menos la de entrenamiento en hipocampo y el núcleo caudado. Se observa mayor activación en hipocampo y núcleo caudado en la secuencia de práctica cuando se compara con la no entrenada durante la fase de entrenamiento. En B se observa una relación lineal directa entre la activación hipocampal durante entrenamiento con la ganancia en ejecución cuando se evaluó el desempeño 24 horas después del entrenamiento. En C se observa una correlación negativa entre la activación del hipocampo posterior izquierdo y del putamen ventral izquierdo durante la fase de entrenamiento (Albouy et al., 2008).

2.2.3 Aprendizaje de procedimiento y sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide participa en el aprendizaje de procedimiento (Rueda-Orozco et al., 2008). Para medir el aprendizaje de procedimiento utilizaron un laberinto en T. Entrenaron a las ratas para que aprendieran a girar hacia un mismo lado (i. e., a la derecha para obtener el reforzador). Posteriormente, las ratas se dividieron en varios grupos; al primer grupo se le administró 3.2 μg de AM251 (antagonista del receptor CB1) en el estriado dorsolateral; al segundo se le administró 3.2 μg AM251 en el hipocampo; y a un tercero, el grupo control, se le administró solamente el vehículo. Después de la administración, la rata se sometió a un proceso de extinción: ahora las ratas aprendieron que debían girar hacia el lado contrario en el laberinto. Cabe resaltar que también se tuvieron grupos de ratas usadas para saber si la actividad neuronal (mediante la medición de la expresión de c-Fos) aumentó o disminuyó dependiendo del entrenamiento, extinción y la administración de AM251 en el estriado o el hipocampo antes de la fase de extinción. Rueda-Orozco et al. (2008) mostraron que hubo mayor expresión de c-Fos en el estriado dorsolateral al principio del entrenamiento y de la extinción en comparación con un grupo que no tuvo ni fase de entrenamiento ni de extinción. Se observaron diferencias semejantes en hipocampo al comparar estos grupos. Estos resultados indican que tanto el estriado dorsolateral como el hipocampo participan en el aprendizaje de un nuevo procedimiento y en su extinción. Esto ocurre posiblemente porque la extinción implica un re-aprendizaje del procedimiento, similar a lo que ocurre en humanos en la tarea de trazado de la estrella a través del espejo anteriormente descrita.

Por otro lado, cuando se les administró 3.2 μg de AM251 en el estriado dorsolateral las ratas mostraron un menor índice de respuestas correctas y se observó un incremento en la expresión de c-Fos en comparación con las ratas control durante la fase de extinción.

Pero cuando se administró AM251 en hipocampo las ratas tuvieron más respuestas correctas y una menor expresión de c-Fos con respecto al grupo control. Los autores concluyen que la administración de AM251 en estriado dificulta la extinción del aprendizaje de procedimiento, mientras que en hipocampo la facilita.

Lo anterior es coherente con la idea de que no sólo el estriado participa al inicio del entrenamiento de una tarea de procedimiento sino también el hipocampo. Otro dato que apoya esta idea es que se encontró una correlación entre la activación CA1 y CA3 sólo al inicio del aprendizaje de procedimiento. Una interpretación es que la activación de los receptores CB1 en el hipocampo sirven en la consolidación de un nuevo aprendizaje; mientras que la activación de estos mismos receptores en el estriado ayuda a la evocación de un aprendizaje ya consolidado. Esta interpretación concordaría con el hecho de que el putamen, que forma parte del estriado, va aumentando su actividad mientras que la del hipocampo va disminuyendo a lo largo del aprendizaje de un procedimiento (Albouy et al., 2008). Por lo tanto, el hipocampo también participa en el aprendizaje de procedimiento, puesto que como comentan los autores, la extinción de recuerdos puede considerarse como un aprendizaje inhibitor específico que ayuda a no expresar una conducta anteriormente aprendida.

2.2.4 Aprendizaje de procedimiento y consumo de marihuana

La asociación entre el consumo de marihuana y el aprendizaje de procedimiento ha sido poco estudiada. Uno de los pocos estudios acerca de esta asociación es el que fue realizado por González et al. (2011). Este estudio tiene algunos aspectos a considerar, pues se realizó con personas con y sin VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), y todos sus participantes presentaban dependencia a cocaína y/o heroína. Se evaluó el aprendizaje de procedimiento por medio de la tarea de trazado de estrella a través del Espejo. González et

al. (2011) encontraron que las personas que alguna vez en la vida presentaron dependencia a marihuana tardaron más en realizar la tarea de trazado de la Estrella a través del Espejo en comparación con los no dependientes, sin importar si presentaban o no VIH. Los autores concluyen que la dependencia a marihuana está relacionada con una baja ejecución motora. Los resultados obtenidos en este estudio difícilmente se pueden generalizar a otro tipo de población (e. g. personas sin VIH, o sin dependencia a cocaína y/o heroína), así que no es posible asegurar que las personas sin estas características tengan las mismas deficiencias.

En otro estudio, se evaluó el aprendizaje de procedimiento en consumidores y no consumidores de marihuana con una tarea de laberinto de agua virtual, en el que los participantes debían encontrar una plataforma que no era visible (Sneider, Gruber, Rogowska, Silveri y Yutgelum-Todd, 2013). La tarea se dividió en dos: primero en la fase de aprendizaje los participantes debían encontrar la plataforma debajo del agua y se les retroalimentaba cuando la encontraban; posteriormente se les presentaba la fase de retención en la que se mostraba el mismo laberinto, pero sin la plataforma. Encontraron que durante la fase de prueba los consumidores de marihuana mostraron un menor porcentaje de distancia de navegación dentro del cuadrante correcto en comparación con los no consumidores. Los autores reportan que esto indica una menor retención del camino anteriormente aprendido por parte de los consumidores de marihuana en comparación con los no consumidores, pero que debido a la n pequeña de su muestra limita la generalización de sus datos.

2.3 Diferencias individuales y variaciones genéticas

Las diferencias individuales en la eficiencia de funciones cognitivas no sólo se pueden explicar por factores ambientales (e.g. consumo de marihuana), sino que también se pueden explicar por variaciones genéticas (Ruiz-Contreras et al., 2014). Se ha descrito que variaciones en la secuencia de ADN⁶ del gen⁷ que codifica para el receptor CB1, el *CNR1*, se ven involucradas en diferencias en la eficiencia en funciones como la memoria y la atención (Ruiz-Contreras et al., 2014). En la figura 10 se observa una representación del gen *CNR1*, en donde se observa que está compuesto de 4 exones y 3 intrones. Los exones son partes del gen que se traducen a proteína y los intrones son partes del gen que se transcriben a ARNm, pero que no llegan a traducirse a proteína (Klug et al., 2006).

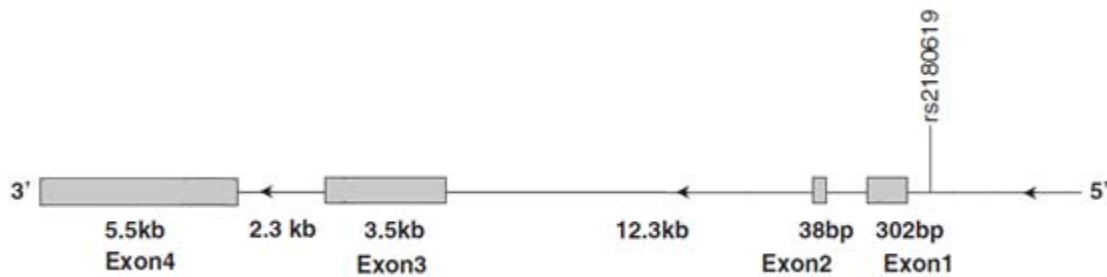


Figura 10. Representación del gen *CNR1*. Se puede observar que el gen *CNR1* está conformado por 4 exones (representadas por cajas grises) y 3 intrones (representadas por líneas). También podemos observar la localización del rs2180619, el cual se encuentra a 3068 pb anterior al exón 1. Modificado de Zhang et al., 2004.

A lo largo de este gen se encuentran algunas variaciones llamadas polimorfismos, y de acuerdo con Knight (2005), se definen como una variación presente en más del 1% de la

⁶ Ácido desoxirribonucleico, la molécula de la herencia. Está formada por una doble cadena que forma una hélice. Cada cadena está conformada por 4 diferentes bases nitrogenadas: Adenina (A), Guanina (G), Citocina (C) y Timina (T) (Klug et al., 2006).

⁷ Unidad fundamental de la herencia. Porción mínima de ADN que contiene la información necesaria para producir una proteína (Klug et al., 2006).

población. Un polimorfismo que se ha encontrado en el gen *CNRI* es el polimorfismo AATn, el cual consiste en diferencias en el número de repeticiones de un conjunto de nucleótidos (i.e. adenina, adenina, timina, AATn) que se encuentran a 18086 pb del exón 4 (Zhang et al., 2004). Este polimorfismo ha sido asociado con aprendizaje de procedimiento (Ruiz-Contreras et al., 2011), atención (Stadelmann et al., 2011) y memoria de trabajo (Ruiz-Contreras et al., 2012). Ruiz-Contreras et al. (2011) encontraron que la eficiencia en el aprendizaje de procedimiento cambiaba dependiendo del número de repetidos AATn en cada alelo. El aprendizaje de procedimiento se midió con la tarea de trazado de estrella a través del Espejo. Se dividió a la muestra en personas con alta y baja eficiencia, medida por los errores que cometían por minuto. En el grupo de baja eficiencia había mayor frecuencia del genotipo AAT12/13 en comparación con el grupo de alta eficiencia; mientras que la frecuencia del genotipo AAT12/14 era mayor en el grupo de alta eficiencia en comparación con el grupo de baja eficiencia. Este estudio nos muestra que variaciones en el *CNRI* puede afectar al aprendizaje de procedimiento.

Existe una dificultad para estudiar el polimorfismo AATn. Ruiz-Contreras et al. (2011) encontraron un gran número de genotipos AATn (i.e. 20), lo que dificulta la creación de grupos grandes a partir del número de repetidos AAT y, por lo tanto, su análisis. Sin embargo, hay otras variaciones que también podrían estar relacionadas con la conducta y con funciones cognitivas. Una de estas variaciones es el rs2180619, que a diferencia del polimorfismo AATn, se encuentra en una potencial región reguladora, ya que se encuentra a -3068 pares de bases (pb) del exón 1 del gen *CNRI* (NCBI, 2014) y también podría tener una función dentro del gen *CNRI*.

El rs2180619 es un SNP (Polimorfismo de un solo nucleótido, por sus siglas en inglés) en donde hay un cambio de una “A” (adenina, nucleótido que se encuentra con

mayor frecuencia) por una “G” (guanina, alelo que se encuentra en menor frecuencia) localizado en el locus 88,877,952 de la cadena *forward* del cromosoma 6 (NCBI, 2014). La razón por la que el rs2180619 es de interés en este estudio es que se ha mostrado su relación con fenotipos conductuales y, por ello, quizás tenga un efecto en el funcionamiento del CB1 (Ruiz-Contreras et al., 2014; Lazary et al., 2009; Zhang et al., 2004).

Un estudio que nos muestra una relación entre el rs2180619 con un fenotipo conductual fue el realizado por Zhang et al. (2004). En su estudio se mostró que hay mayor probabilidad de aparición del haplotipo⁸ rs754387 = G y el rs2180619 = G en poliusuarios que presentaban abuso de sustancias, comparado con el grupo control. Estos resultados indican que posiblemente el rs2180619 vulnera a las personas a que consuman drogas de abuso y que probablemente este SNP tenga algún efecto en el receptor CB1.

Otro estudio ha relacionado el alelo “G” del rs2180619 con ansiedad (Lazary et al., 2009). En el estudio de Lazary et al. (2009) se utilizaron diferentes cuestionarios para medir ansiedad (*State-Trait Anxiety Inventory (STAI-T)*, *anxious subscale of the Temperament Evaluation of the Memphis (TEMPS-Anx)*, *Pisa and San Diego-Autoquestionnaire, anxious subscale of the Brief Symptom Inventory (BSI-Anx)*) y trataron de asociar el nivel de ansiedad con diversas variaciones genéticas en una población sin antecedentes psiquiátricos (Lazary et al., 2009). Una de las variaciones estudiadas fue el rs2180619. Aunque no se encontró una asociación directa entre puntuaciones de ansiedad y el rs2180619, los homocigotos GG del rs2180619 en interacción con el genotipo SS del 5-HTTLPR (polimorfismo del gen del transportador a serotonina) se asociaron con una mayor puntuación de ansiedad en los cuestionarios STAI-T y TEMPS (Lazary et al., 2009).

⁸ Haplotipo se refiere a un grupo de alelos que porta un individuo (Klug et al., 2006).

Asimismo, los investigadores realizaron una simulación en computadora para explorar el posible mecanismo por el cual el rs2180619 tiene sus efectos en el fenotipo de ansiedad. Encontraron que a esta región se unían diferentes factores de transcripción dependiendo del alelo que estuviera presente (A o G), por lo que su efecto podría ser a través de regular la expresión del receptor CB1 (Lazary et al., 2009).

Ruiz-Contreras et al. (en revisión) demostraron que existe una interacción entre el genotipo del rs2180619 (AA, AG y GG) y la dificultad en una tarea de memoria de trabajo (N-Back). Se mostró que el costo de la dificultad (disminución de la eficiencia en una dificultad alta vs una baja) depende del número de alelos G que un individuo posea: entre mayor número de G (máximo 2), mayor es el costo. Este resultado concuerda con un estudio en el que se utilizó otra tarea de memoria de trabajo (Tarea de Mantenimiento) con diferentes niveles de dificultad (Ruiz-Contreras et al., 2014). En esta tarea se les presentó a los participantes 4 imágenes de forma individual (2 escenas y 2 rostros). Posteriormente se les presentó una cruz en el centro de la pantalla, y al final del ensayo se les presentó una escena, un rostro o una flecha. A los participantes les dieron 4 diferentes indicaciones: mirar pasivamente (en este ensayo es en el que aparece una flecha y deben indicar hacia donde apunta la flecha); recordar escenas e ignorar rostros; recordar rostros e ignorar escenas; y recordar tanto escenas como rostros. En las últimas 3 condiciones deben decidir si la última imagen que observan apareció dentro de las 4 primeras imágenes. El genotipo GG fue asociado con una ejecución más baja en comparación con el genotipo AA en la condición de recordar rostros y escenas, es decir en la condición más demandante. Entonces, parece ser que el poseer el alelo G disminuye la eficiencia en tareas de memoria de trabajo.

Dado las anteriores investigaciones, el rs2180619 puede ser considerado relevante para explicar las diferencias en la eficiencia cognitiva entre individuos. Es posible que este polimorfismo pueda estar afectando la expresión del CB1 y, por lo tanto, la función del sistema endocannabinoide.

3. Planteamiento del problema

Se ha observado que el consumo de marihuana afecta algunas funciones cognitivas como memoria, atención y aprendizaje de procedimiento. Su efecto está regulado por la acción de su principal componente, el $\Delta 9$ -THC, sobre el receptor CB1, el cual se encuentra distribuido en diversas partes del cerebro que se relacionan con el aprendizaje de procedimiento (e. g. estriado, cerebelo, hipocampo). El consumo de marihuana está relacionado con una baja expresión del receptor CB1. Este receptor es codificado por el gen *CNRI*, el cual presenta distintas variaciones genéticas. Una de estas variaciones genéticas es el rs2180619, el cual tiene un efecto en los niveles de ansiedad, abuso de sustancias y memoria de trabajo; además podría tener un efecto a nivel de regulación de la expresión del gen. No se sabe si el rs2180619 tiene un efecto en el aprendizaje de procedimiento. También se desconoce si hay diferencias individuales en la eficiencia del aprendizaje de procedimiento entre consumidores de marihuana. Entonces, es posible que el rs2180619 sea un factor de riesgo para que el consumo de marihuana afecte el aprendizaje de procedimiento.

4. Preguntas de Investigación

¿Difiere la eficiencia en el aprendizaje de procedimiento entre consumidores de marihuana y no consumidores?

¿Existe una asociación del polimorfismo rs2180619 con el aprendizaje de procedimiento?

¿Existe una interacción entre el polimorfismo rs2180619 y el consumo de marihuana en el aprendizaje de procedimiento?

5. Hipótesis

Los consumidores de marihuana tienen una eficiencia menor en comparación con los no consumidores en aprendizaje de procedimiento.

Portar al menos un alelo G se asocia con una eficiencia reducida en aprendizaje de procedimiento en comparación con los homocigotos A en aprendizaje de procedimiento.

Existe una interacción entre el genotipo del rs2180619 y el consumo de marihuana en la eficiencia del aprendizaje de procedimiento.

6. Objetivos

Explorar la relación entre el consumo de marihuana y la eficiencia en el aprendizaje de procedimiento.

Explorar la relación entre el rs2180619 y la eficiencia en el aprendizaje de procedimiento.

Investigar si existe una interacción entre el consumo de marihuana y el genotipo del rs2180619 en el aprendizaje de procedimiento.

7. Método

7.1 Participantes

Participaron 48 personas consumidoras de marihuana y 61 personas no consumidoras de marihuana diestras de entre veinte y treinta años. El anterior rango de edad fue considerado como criterio de inclusión, ya que se ha demostrado la existencia de una relación entre la edad y la ejecución en una tarea de aprendizaje de procedimiento (Durkin, Prescott, Furchtgott, Cantor y Powell, 1995).

7.1.1 Grupo de no consumidores de marihuana

Los participantes no consumidores de marihuana no debieron presentar dependencia a alguna droga ilícita de acuerdo a los criterios del *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV* (DSM-IV) y debieron tener al menos 12 años de estudio.

7.1.2 Grupo de usuarios de marihuana

En cuanto a los criterios de inclusión por el consumo de marihuana, se han descrito una variedad en los diferentes estudios (Pope et al., 1996; Bolla et al., 2002; Lane et al., 2007). Parece que esta variedad de criterios de inclusión se da ya que son escogidos de forma arbitraria. Además, el consumo de marihuana parece diferir entre las poblaciones (WolrdDrugReport, 2012), por lo que nosotros elegimos un criterio de inclusión que nos permitió, al no ser tan estricto como el utilizado por algunos otros autores (e.g. Pope et al., 2001), aumentar la cantidad de personas que podían ser incluidas en nuestra muestra. Este criterio de inclusión fue que tuvieran más de 100 episodios de consumo a lo largo de su vida y que en los últimos 6 meses su consumo de marihuana hubiera sido de al menos 6 ocasiones. Los participantes fueron invitados a participar por medio de repartición de volantes, medios electrónicos y personalmente.

7.2 Instrumentos

- *Carta de Consentimiento informado.* A todos los participantes se les pidió que leyeran y firmaran una carta de consentimiento informado. En esta carta se explicaba lo que el participante realizaría durante la sesión, además de los objetivos y la justificación del estudio. Cabe mencionar que este documento fue aprobado por la Comisión de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. También aclaraba que el participante podía abandonar el estudio en cualquier momento, si lo consideraba conveniente.
- *Cuestionario de datos generales.* Este cuestionario no autoaplicable se utilizó para obtener información personal (nombre, dirección, número de teléfono celular y local).
- *Cuestionario de Antecedentes Neurológicos y Psiquiátricos.* Este instrumento se utilizó para saber si él mismo o algún familiar en línea directa padecía algunas de las siguientes condiciones: Depresión, Trastorno bipolar, Episodio maníaco, Ansiedad, Trastorno Obsesivo-Compulsivo, Trastorno por déficit de atención e hiperactividad, Narcolepsia, Epilepsia, Traumatismo craneoencefálico con pérdida de conciencia, Autismo, Asperger, Tourette, Esquizofrenia, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Huntington y Alzheimer.
- *Evaluación de Sustancias Psicoactivas.* Este cuestionario no autoaplicable sirvió para obtener información relacionada con el tiempo, cantidad, inicio y el periodo de consumo de cafeína, nicotina, alcohol, marihuana, estimulantes, cocaína, narcóticos, alucinógenos, inhalables, tranquilizantes, esteroides y alguna otra sustancia de abuso.

- *Cuestionario de dependencia y abuso.* En este cuestionario autoaplicable se evaluó los criterios de dependencia a diferentes sustancias, de acuerdo al DSM-IV. El cuestionario se aplicó para cafeína, nicotina y alcohol tomando en cuenta los últimos 6 meses. También se aplicó el cuestionario a los participantes que habían tenido al menos 6 consumos de alguna sustancia diferente a cafeína, nicotina y alcohol en un periodo de 6 meses, aunque hubiera sido en un periodo previo.
- *Inventario de Edimburgo.* Este cuestionario autoaplicable sirvió para comprobar la lateralidad de nuestros participantes. Consiste en 10 preguntas acerca de la frecuencia con la que utilizan diferentes partes del cuerpo en distintas actividades, y puede ser puntuado de derecha muy preferente a izquierda muy preferente, teniendo 2 puntos como máximo para cada pregunta en izquierda o derecha. La forma en que se califica es restando la suma de los puntos para la derecha menos la suma de los puntos para izquierda. El resultado se divide entre la suma de los puntos de derecha más los puntos de izquierda. El resultado se multiplica por 100. Se considera que una persona es diestra cuando obtiene un puntaje igual o mayor a +40.
- *Inventario de Depresión de Beck.* Este cuestionario autoaplicable se utilizó para conocer si los participantes tenían síntomas de depresión. Consiste en veintiún grupos de enunciados, de los cuales el participante tuvo que escoger los que mejor describieran su estado de ánimo de acuerdo a la última semana. Cada enunciado tiene una puntuación que va desde cero hasta tres (siendo tres máxima severidad y cero, ausencia del síntoma). Para obtener la puntuación en esta prueba, se suman los puntos de cada grupo de enunciados. Se excluyeron a las personas que tuvieran una puntuación mayor o igual a 30, que corresponde a sintomatología asociada a

depresión severa. Este criterio se tomó en cuenta debido a que se ha observado una correlación positiva entre niveles de depresión y el tiempo de ejecución en una prueba de aprendizaje de procedimiento en personas con depresión mayor (O'Connor, Jerkey, Robertson, DPhil, Brenninkmeyer, Ozdemir et al., 2005).

- *Inventario de Ansiedad de Beck*. Este cuestionario contiene una lista con 21 síntomas de ansiedad. El participante tuvo que seleccionar con qué frecuencia ha presentado cada uno de estos síntomas durante la última semana. Estas frecuencias fueron: nada o poco frecuente (puntuado con cero puntos); más o menos (puntuado con un punto); moderadamente (puntuado con dos puntos); y severamente (puntuado con tres puntos). Se excluyó a las personas que tuvieran un puntaje igual o mayor a 31, lo cual equivale a un puntaje de ansiedad severa (Robles, Varela, Jurado y Páez, 2001).
- *Matrices progresivas de Raven*. Esta prueba fue aplicada en computadora y consiste en la presentación sucesiva de diferentes figuras incompletas y debajo de cada una de ellas se presentan diferentes opciones que el participante tiene que elegir para completar la figura de arriba. Esta prueba mide inteligencia (Mackintosh y Bennett, 2005), y se utilizó para verificar que el nivel de inteligencia no difiriera entre los grupos.

7.3 Procedimiento

El estudio fue de tipo cuasiexperimental. La tarea, la aplicación de los cuestionarios y la toma de la muestra de saliva se realizaron en una sesión.

En primer lugar los participantes leyeron la carta de consentimiento informado y después, si estaban de acuerdo, lo firmaron. El consentimiento informado explicaba que se les aplicarían algunos cuestionarios, tareas en computadora, y que se les pediría una

muestra de saliva. Posteriormente, se realizó una entrevista estructurada que consistió en aplicar el Cuestionario de Datos Generales, Evaluación de Sustancias Psicoactivas, Cuestionario de síntomas de dependencia a diferentes sustancias de abuso (e.g. alcohol, nicotina, marihuana), Inventario de Depresión de Beck y el Inventario de Ansiedad de Beck. Una vez que los participantes terminaron de contestar los anteriores cuestionarios, se les pidió una muestra de orina para realizar una prueba de detección de cocaína, marihuana, opiáceos, barbitúricos y anfetaminas en orina con el dispositivo llamado Bio-Drug obtenidos del laboratorio Grupo MexLab. Después se aplicó la tarea control y posteriormente, se aplicó la tarea de trazado de estrella a través del espejo en 6 ensayos. Finalmente, se les pidió una muestra de saliva que fue almacenada en el dispositivo Oragene-DNA adquiridos del laboratorio DNA genotek.

7.4 Tarea de trazado de estrella a través del espejo

En esta tarea el participante debe trazar una línea entre los dos contornos de una estrella que se encuentran a 0.5 cm de distancia entre sí. La estrella tiene cinco picos con una altura de 19 cms. y 17.5 cms. de ancho. El participante no debe de ver la estrella de forma directa, sino que puede seguir su ejecución a través de un espejo. Para realizar lo anterior se utilizó un dispositivo equipado con un espejo por el cual el participante podría observar el trazo que realizaba (Ver figura 11). Se le indicó al participante que debe comenzar a trazar la línea a partir del pico superior, y que debe trazarla en el sentido de las agujas del reloj. Además, se le indicó que un error era cada vez que tocara alguno de los contornos de la estrella, se saliera de la figura y/o cuando despegara el lápiz de la hoja. Se realizaron 6 ensayos, puesto que este número de ensayos son suficientes para observar diferencias en la ejecución y se sabe que con un mayor número de ensayos la ejecución ya

no mejora en esta tarea (Galeana, 2013). Cada ensayo inicia desde que el participante empieza el trazo en el pico superior de la estrella y termina cuando llega al mismo punto.

7.5 Trazado de tarea control

Se utilizó una tarea control para saber si la ejecución del participante no se explicaba por habilidades motoras del participante. En este caso, se utilizó una tarea que implicara habilidades motoras similares a la tarea de trazado de estrella a través del espejo, pero que no tuviera un componente novedoso que aprender. Se le pidió al participante que trazara una línea en medio del doble contorno de un círculo, pero durante esta tarea el participante miraba el estímulo de forma directa. Al igual que en el Trazado de la Estrella a Través del Espejo, se le indicó que un error era cada vez que tocara alguno de los contornos de la figura, se saliera de la figura y/o cuando despegara el lápiz de la hoja.



Figura 11. Dispositivo utilizado para el trazado de la estrella. El participante se situaba de frente al dispositivo, de tal forma que su vista fuera cubierta con el rectángulo de madera y sólo pudiera ver su mano y la estrella a través del espejo y no directamente.

7.6 Análisis de la muestra de saliva

Para la recolección de las muestras de saliva se utilizaron dispositivos especializados llamados Oragene-DNA, adquiridos del laboratorio DNA genotek®. El análisis posterior de dichas muestras (incluyendo extracción de ADN y su genotipificación) se realizó en el Laboratorio de Medicina Genómica del Hospital 1° de Octubre. A continuación se describirán los procedimientos realizados en dicho laboratorio.

7.6.1 Extracción, cuantificación y normalización de ADN

Con extracción de ADN nos referimos a aislar el ADN de la muestra, desechando proteínas y ARN. Para ello se siguió el protocolo de Laboratorio del manual de purificación de ADN de prepIT® - L2P (pT-L2P). Primero se extrajo alícuotas de 1µL de cada muestra y se depositaron en microtubos de 1.5mL. Estos microtubos se incubaron a 50°C por una hora. Pasado dicho tiempo, se transfirió 40µL de PT-L2P al microtubo de 1.5mL y se mezcló por unos segundos utilizando un vórtex para después incubar la muestra en hielo por 10 min. Después, se centrifugó la muestra a temperatura ambiente a 13,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un microtubo nuevo, desechando el pellet. Por cada 500µL de sobrenadante que se obtuvo, se añadió 600µL de etanol al 95% y se mezcló por inversión 10 veces. Posteriormente la muestra se mantuvo durante 10 min. a temperatura ambiente y fue centrifugada durante 2 min. a 13000 rpm. El sobrenadante fue removido dejando intacto el pellet de ADN en el fondo del microtubo y se agregó 250µL de alcohol al 70%. La muestra se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 min y, pasado este tiempo, se removió el etanol, sin perturbar el pellet. Más tarde se agregó 100µL de agua grado biología molecular para disolver el pellet de ADN y se mezcló con ayuda de un vórtex. También se evaluó la concentración de ADN de la muestra por medio de la medición de

absorbancias con el espectrofotómetro Nanodrop. Después, se normalizó la concentración de ADN a 100 ng/μL utilizando la siguiente fórmula:

$$V1 = (C2 * V2) / C1$$

En la cual V1 se refiere al volumen necesario de muestra de ADN a utilizar; C2 es la concentración final de ADN que fue de 100 ng/μL; V2 es el volumen final que fue de 200 μL; y C1 es la concentración de ADN inicial de nuestras muestras, que fue dada por las mediciones realizadas por el nanodrop. V1 nos dice cuánto de la muestra inicial se debe tomar para que la concentración final quede a 100 ng/μL. V1 se mezcló con agua grado biología molecular (AGBM), y para obtener el volumen de AGBM a utilizar se restó V2-V1.

Después, se realizó una prueba de PCR de punto final para confirmar que la integridad de ADN de nuestras muestras fuera funcional. En esta prueba se amplificó el gen de β-actina de 10 muestras seleccionadas aleatoriamente y en todas las muestras seleccionadas se obtuvieron bandas visibles (Ver figura 12). Esto nos permitió saber que nuestras muestras podían ser utilizadas para el ensayo de discriminación alélica que será descrito en el siguiente apartado. Finalmente, se almacenó la muestra a -80°C hasta que fue utilizada para la genotipificación.

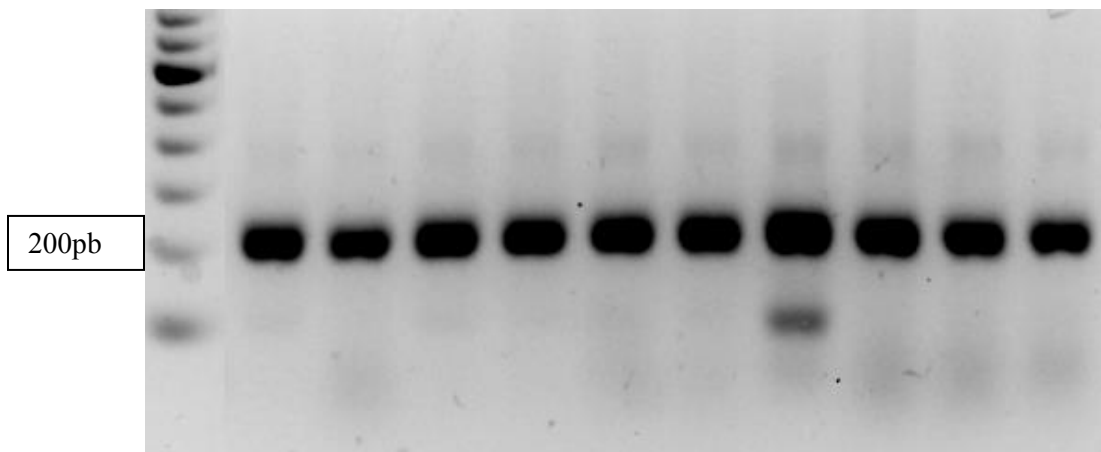


Figura 12. Prueba con β -actina para confirmar que la integridad del ADN de nuestras muestras fuera funcional. En el carril de la izquierda se observa el peso molecular; mientras que las demás bandas corresponden a las muestras seleccionadas aleatoriamente.

7.6.2 Genotipificación

Para determinar el genotipo del rs21806129 de los participantes se utilizó el ensayo de discriminación alélica con sondas TaqMan® (Applied Biosystems, TaqMan® SNP Genotyping, OndemandAssay cat. #C-15841551_10). La secuencia de la sonda es: AGACAGCTCCAGCGCAAGATTCAAA[A/G]GGAGGAGGCTTCAACATCTGTTGC. Esta técnica se basa en la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés) y en el marcado fluorescente por medio de un fluorocromo de un oligonucleótido⁹ que se hibrida a una porción específica de la muestra de ADN. Básicamente, la PCR consiste en replicar de forma artificial una porción específica de ADN. Para ello, es necesario contar con un oligonucleótido que sirva como cebador¹⁰ hacia adelante y que se hibride con la cadena de ADN de la muestra. Esto sirve para que la Taq polimerasa comience a actuar hasta que llega al punto en donde se hibrida otro

⁹ Cadenas cortas de nucleótidos de menos de 20 nucleótidos (Klug et al., 2006).

¹⁰ Cadena de ADN que puede ser alargada por medio de una ADN polimerasa (Klug et al., 2006).

oligonucleótido. Este segundo oligonucleótido se conoce como sonda. Tenemos dos tipos de sondas; una se hibrida a la cadena de ADN del alelo 1; la otra se hibrida con la cadena de ADN del alelo 2. Además, estas sondas están marcadas diferencialmente con una molécula reportera (VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2), que normalmente emite fluorescencia, sin embargo, la sonda también está unida con una molécula llamada silenciador. La función del silenciador es impedir que la molécula reportera emita fluorescencia. Pero cuando la Taq Polimerasa llega a la sonda, la hidroliza, por lo que hace que la molécula reportera se libere y pueda emitir fluorescencia (Applied Biosystems, CA). Finalmente, hay otro oligonucleótido que se une a la cadena molde y que sirve como cebador inverso, lo que hace que la polimerización finalice. En la Figura 13 se muestra el proceso antes descrito explicado en diferentes pasos.

Para saber el genotipo de la muestra, basta con saber qué tipo de fluorescencia emite la reacción. Si emite sólo fluorescencia de VIC es homocigoto para el alelo A; si emite fluorescencia de FAM es homocigoto para el alelo G; si emite fluorescencia tanto para FAM y VIC es heterocigoto. En la figura 14 se muestra un ejemplo de la gráfica obtenida en el ensayo de discriminación alélica con sondas TaqMan®.

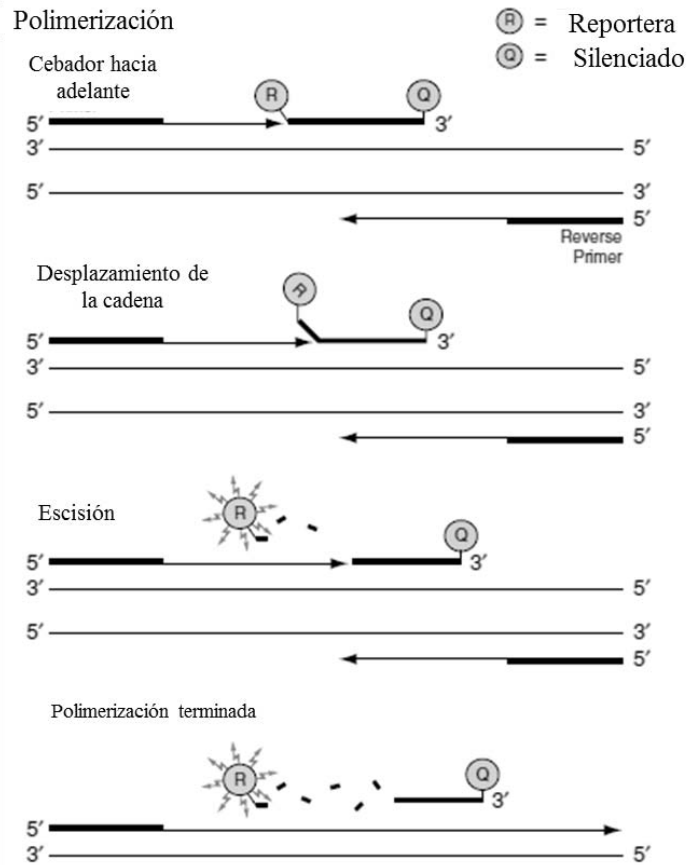


Figura 13. Distintas etapas en el procedimiento de discriminación alélica. La primera etapa consiste en el inicio de la polimerización, en la que un cebador se pega en una porción específica del ADN molde, para que posteriormente la Taq Polimerasa vaya agregando nucleótidos y forme una parte de la cadena complementaria de la cadena molde. En segundo lugar, se muestra el avance de la Taq Polimerasa hasta llegar a la sonda. Después, se observa la escisión de la molécula reportera, que al ser separada de la zona, y por tanto del silenciador, emite fluorescencia. Por último se observa la hidrólisis de la sonda y la separación del silenciador. Modificado del manual de Applied Biosystems, CA.

Gráfico de discriminación alélica

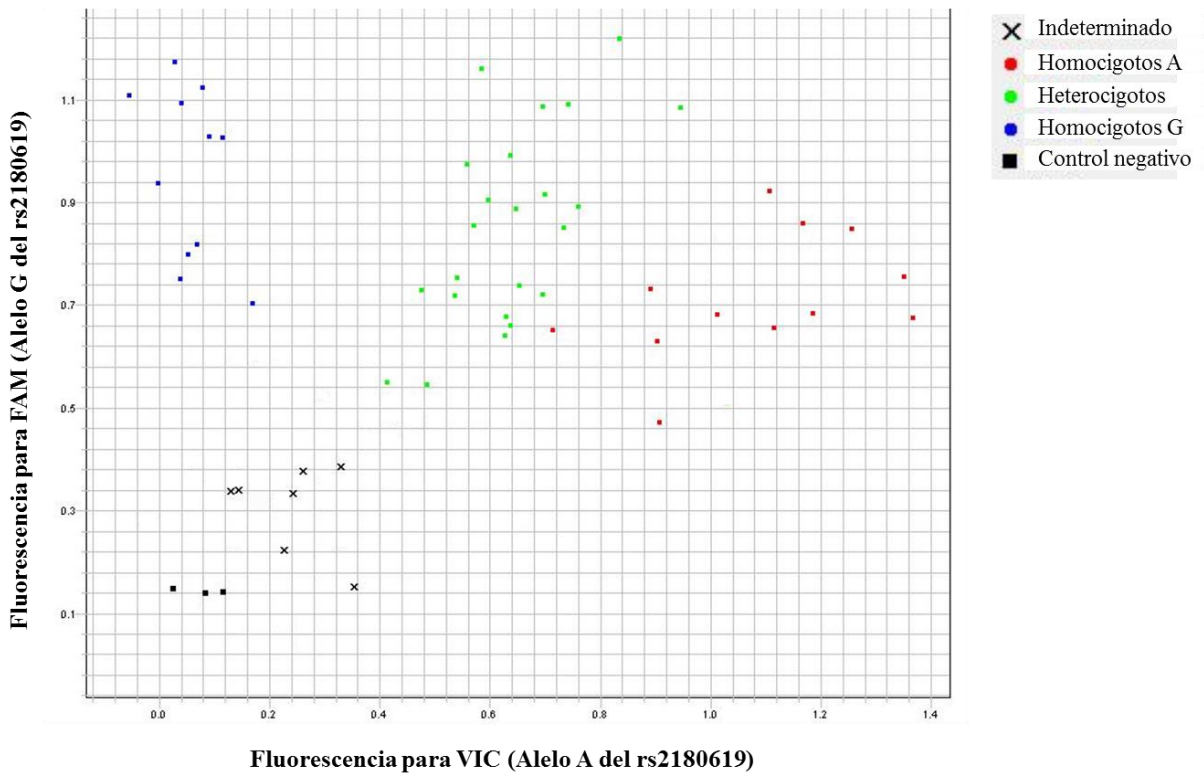


Figura 14. Ejemplo de gráfico de discriminación alélica. En esta gráfica se muestra en el eje de las X se muestra la fluorescencia de FAM y en el de las Y la fluorescencia de VIC. La fluorescencia de FAM está asociada al alelo G y VIC al alelo A, así que los puntos rojos representan a los homocigotos A; los puntos azules representan a los homocigotos a G; y los punto verdes representan a los heterocigotos. Las cruces negras representan a muestras que no pudieron ser clasificadas dentro de un genotipo específico, así que se analizaron posteriormente. Los cuadros negros representan a controles negativos que no tenían ADN.

7.7 Análisis estadístico

Se realizaron dos Análisis de Varianza (ANOVA) mixto. Las variables dependientes fueron el número de errores y el tiempo de ejecución. Los factores entre grupos fueron el ser portador de al menos un alelo G y el consumo de marihuana. El factor para medidas repetidas fue el número de ensayo. En caso de encontrar efectos y/o interacciones significativas se utilizó la prueba *post hoc* de Tukey para n desigual para saber cuáles de las comparaciones del análisis fueron diferentes. Se realizó una χ^2 para saber si la frecuencia de las variables sexo y n difería entre grupos. Se utilizó un ANOVA de dos vías con grupo y genotipo como factores para las siguientes variables: edad, años de estudio, puntaje del Inventario de Depresión de Beck (IDB) e Inventario de Ansiedad de Beck (IAB), horas dormidas y porcentaje de respuestas correctas de matrices progresivas de RAVEN con la finalidad de saber si estas características no diferían entre grupos. Se utilizará una $P < 0.05$ para considerar los resultados estadísticamente significativos.

8. Resultados

8.1 Características de la muestra

Las características descriptivas de la muestra en función del grupo (no consumidor y consumidor) se observan en la Tabla 1. El puntaje de IDB para el grupo no consumidor (Mediana: 6.00, Rango: 27.00) y consumidor (Mediana: 9.00, Rango: 28.00) difirieron significativamente ($U=1029$, $n_1=61$, $n_2=48$, $P= 0.01$). De igual forma el puntaje de IAB para el grupo no consumidor (Mediana: 4.00, Rango: 20.00) y consumidor (Mediana: 8.50, Rango: 29.0) difirieron significativamente ($U=1029$, $n_1=61$, $n_2=48$, $P= 0.01$). No hubo diferencias significativas para alguna otra variable.

En la tabla 2 se muestran las características descriptivas en función del grupo y del genotipo. Se encontraron diferencias significativas en la edad en función del grupo ($F(1, 105)= 4.63$, $P= 0.03$), así como en el puntaje de depresión ($F(1, 105)= 10.146$, $P= 0.002$) y en el puntaje de ansiedad ($F(1, 105)= 12.65$, $P<0.001$). No se encontraron diferencias significativas en alguna otra característica.

Los alelos A y G del SNP rs2180619 en la muestra total ($n= 109$) se encontraron en las siguientes frecuencias: A= 133; G=85 (A= 61 %; G= 39 %). Las frecuencias genotípicas fueron: AA= 40; AG= 53; y GG= 16 (AA= 36.7 %; AG= 48.6%; GG= 14.7%). Estas frecuencias genotípicas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0.10$, $P=0.7$).

Para el grupo control, las frecuencias alélicas fueron: A= 70, G= 50 (A= 58.33 %; G= 41.66 %). Las frecuencias genotípicas para el grupo control fueron: AA= 20; AG= 30; y GG= 10 (AA= 33.3 %; AG= 50.0 %; GG= 16.7%). Estas frecuencias están en equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0.17$, $P=0.67$). En cuanto al grupo consumidor, se encontraron las siguientes frecuencias alélicas: A= 62, G= 34 (A= 64.58 %; G= 35.41 %). En cuanto a la frecuencia genotípica para el grupo de consumidores se encontró lo siguiente: AA= 20;

AG= 22; y GG= 6 (AA= 41.70 %; AG= 45.80 %; GG= 12.5 %). Las frecuencias genotípicas del grupo de consumidores se encontraron también en equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0$, P=1.00). Las frecuencias genotípicas no difieren significativamente entre grupos ($\chi^2=0.63$, P=0.90). Tampoco hay diferencias significativas entre grupos en las frecuencias alélicas ($\chi^2=0.88$, P=0.34). En la Figura 15 se muestran los porcentajes de los genotipos por grupo.

Debido a la baja frecuencia del genotipo GG, los genotipos se dividieron en portadores de al menos un alelo G (GG y AG) y no portadores del alelo G (AA). Por esta razón un factor en los siguientes análisis será la variable “portador G”.

Tabla 1. Características descriptivas de la muestra por grupo. Se encontraron diferencias significativas por grupo en los puntajes de IDB e IAB.

VARIABLES ANALIZADAS	GRUPO DE NO CONSUMIDORES	GRUPO DE CONSUMIDORES	Prueba	P
N ^{a1}	61	48	$\chi^2= 1.56$	0.21
Sexo (hombres/mujeres) ^a	35/26	34/14	$\chi^2= 0.21$	0.15
Edad (Media \pm E.E.M.) ^{b1}	22.77 \pm 0.35	23.77 \pm 0.39	t(107)= -1.89	0.06
Escolaridad (Media \pm E.E.M.) ^b	15.47 \pm 0.28	15.44 \pm 0.16	t(107)= 0.08	0.93
IDB (Mediana (Min-Max)) ^{b2}	7.13(0-27)	10.83(0-20)	U= 1029	0.01
IAB (Mediana (Min-Max)) ^{b3}	5.61(0-28)	9.65(0-29)	U= 1077	0.02
Horas dormidas (Media \pm E.E.M.) ^b	7.47 \pm 0.21	7.76 \pm 0.26	t(107)= 0.39	0.39
Matrices progresivas de Raven (Media de porcentaje de respuestas correctas \pm E.E.M.) ^b	69.84 \pm 1.69	69.97 \pm 1.85	t(107)= -0.05	0.96
Edad de inicio de consumo (Media \pm E.E.M.) ^c	-----	17.00 \pm 0.34	-----	-----
Años de consumo (Media \pm E.E.M.) ^c	-----	6.16 \pm 0.49	-----	-----
Consumo en los últimos 6 meses (Media del # de episodios \pm E.E.M.) ^c	-----	350.58 \pm 41.99	-----	-----
Consumo por semana (Media del # de episodios \pm E.E.M.) ^c	-----	14.3 \pm 1.65	-----	-----
Horas desde el último consumo (Media \pm E.E.M.) ^c	-----	125.49 \pm 74.62	-----	-----

IDB. Inventario de Depresión de Beck.

IAB. Inventario de Ansiedad de Beck.

E.E.M. Error Estándar de la Media.

Min-Max. Mínimo-Máximo.

Tabla 2. Características descriptivas de la muestra por grupo y portadores del alelo G. Se encontraron diferencias significativas por grupo en los puntajes de IDB, IAB y en edad. No se encontraron interacciones significativas entre grupo por genotipo en alguna de las características descritas.

VARIABLES ANALIZADAS	GRUPO DE NO CONSUMIDORES		GRUPO DE CONSUMIDORES		INTERACCIÓN (P)
	No portadores G (AA)	Portadores G (GG y AG)	No portadores G (AA)	Portadores G (GG y AG)	
N ^{a1}	20	41	20	28	0.34
Sexo (hombres/mujeres) ^a	10/10	25/16	14/6	20/8	0.67
Edad (Media ± E.E.M.) ^{b1}	22.00±0.61	23.04±0.43	24.00±0.61	23.60±0.52	0.26
Escolaridad (Media ± E.E.M.) ^b	15.23± 0.38	15.58±0.27	15.23±0.38	15.58±0.32	0.99
IDB (Mediana (Min-Max)) ^{b2}	6 (1-14)	6 (0-27)	11 (1-28)	9 (0-25)	0.07
IAB (Mediana (Min-Max)) ^{b3}	4 (1-13)	4 (0-20)	10 (0-29)	8 (0-28)	0.18
Horas dormidas (Media ± E.E.M.) ^b	7.28±0.39	7.57±.27	7.89±0.39	7.66±0.33	0.46
Matrices progresivas de Raven (Media de porcentaje de respuestas correctas ±E.E.M.) ^b	71.58± 2.93	67.75±2.93	68.98± 2.04	71.54±2.47	0.22

a. χ^2

- 1 Grupo (F(1, 105)= 4.63, P= 0.03); Portador, P=0.68.
2. Grupo (F(1, 105)= 10.15, P= 0.02); Portador, P= 0.31.
3. Grupo (F(1, 105)= 12.65, P< 0.001); Portador, P= 0.85.

IDB. Inventario de Depresión de Beck.

IAB. Inventario de Ansiedad de Beck.

E.E.M. Error Estándar de la Media.

Min-Max. Mínimo-Máximo.

b. ANOVA de dos vías. Grupo x Genotipo.

Tabla 3. Descripción del consumo de marihuana dependiendo del genotipo en el grupo consumidor. No se encontró diferencias significativas en alguna de las mediciones del consumo.

VARIABLES ANALIZADAS	No portadores G (AA)	Portadores G (GG y AG)	Prueba	P
Edad de inicio de consumo (Media ± E.E.M) ^c	16.80±0.45	17.14±0.50	t(46)= -0.49	0.62
Años de consumo (Media ± E.E.M) ^c	6.68±0.87	5.79±0.57	t(46)= 0.89	0.38
Consumo en los últimos 6 meses (Media del # de episodios ± E.E.M) ^c	405.6±68.25	311.28±52.75	t(46) = 0.27	0.67
Consumo por semana (Media del # de episodios ± E.E.M) ^c	15.55±2.58	13.40±2.18	t(46) = 0.64	0.27
Horas desde el último consumo (Media ± E.E.M) ^c	31.46±7.34	192±127.23	t(46) = -1.06	0.30

c. t de Student para muestras independientes.

E.E.M. Error Estándar de la Media.

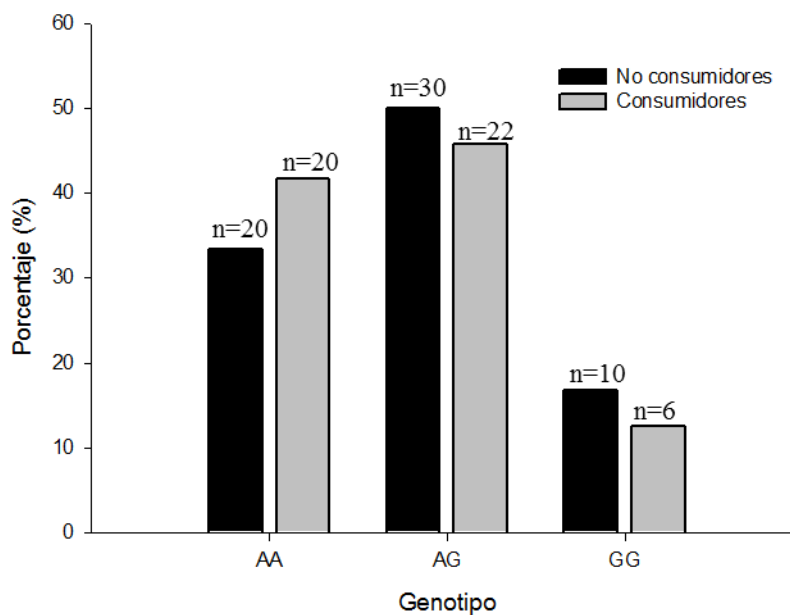


Figura 15. Porcentaje de los genotipos encontrados para cada grupo (no consumidores y consumidores).

8.2 Ejecución en el aprendizaje de procedimiento

En cuanto al tiempo de ejecución no se encontraron diferencias significativas en función del grupo ($P=.353$) ni del factor portador G ($P=.81$; Ver figura 15). Sí se encontraron diferencias en función del número de ensayo ($F(5, 525)= 132.95, P< 0.001$). Con el análisis *post hoc* se observó que los participantes disminuían su tiempo de ejecución desde el ensayo 1 hasta el 4 (Ensayo 1 vs 2, $P<0.001$; Ensayo 2 vs 3, $P=0.001$; 3 vs 4, $P=0.03$). No hubo diferencias significativas entre el ensayo 4 vs 5 ($P=0.91$) ni en el ensayo 5 vs 6 ($P=0.99$).

Por otra parte, en el análisis por número de errores no se encontraron diferencias significativas en función del grupo ($P= 0.50$), ni del factor portador G ($P= 0.14$), pero sí en función del ensayo ($F(5,525)= 83.293, P<0.001$). También se encontró una interacción entre las variables grupo x portador G ($F(1, 105)= 3.99, P=.048$), pero en el análisis *post hoc* no se encontraron diferencias significativas. Además, hubo una interacción entre las variables grupo x portador G x ensayo ($F(5, 525)= 3.62, P= 0.003$). En el análisis *post hoc* se encontró que los consumidores de marihuana portadores del alelo G cometieron más errores en comparación con los no consumidores con el mismo genotipo durante el ensayo 1 ($P=0.02$; Ver Figura 16B). También se encontró que los consumidores portadores de al menos un alelo G cometieron más errores que los consumidores con genotipo AA durante el ensayo 1 ($P=0.02$; Ver Figura 17B). Debido a que la edad, los puntajes en IDB e IAB difirieron entre grupos se realizó un análisis de covarianza tomando dichas variables como covariables. Con este análisis también se observó la interacción grupo x portador G x ensayo ($F(5, 510)= 2.88, P= 0.014$). Lo cual quiere decir que la interacción obtenida no se explica por diferencias en la edad, puntaje en IDB ni por el puntaje en IAB.

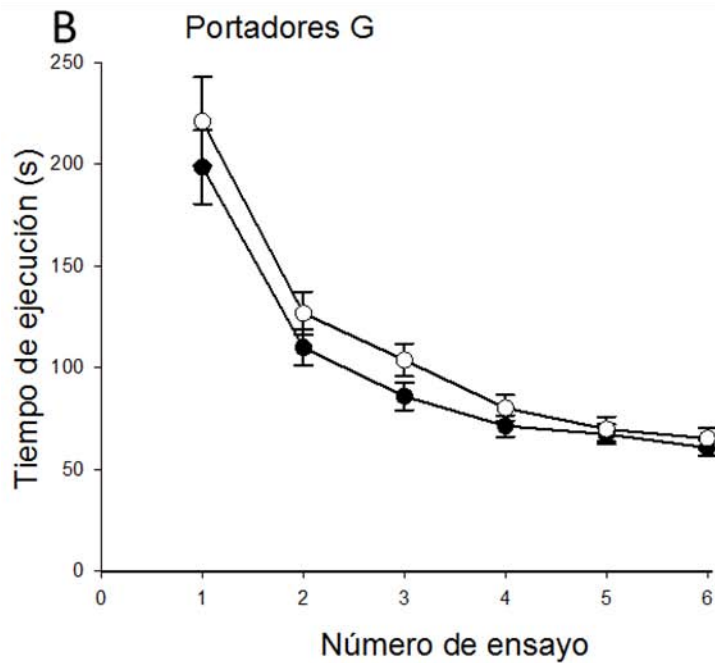
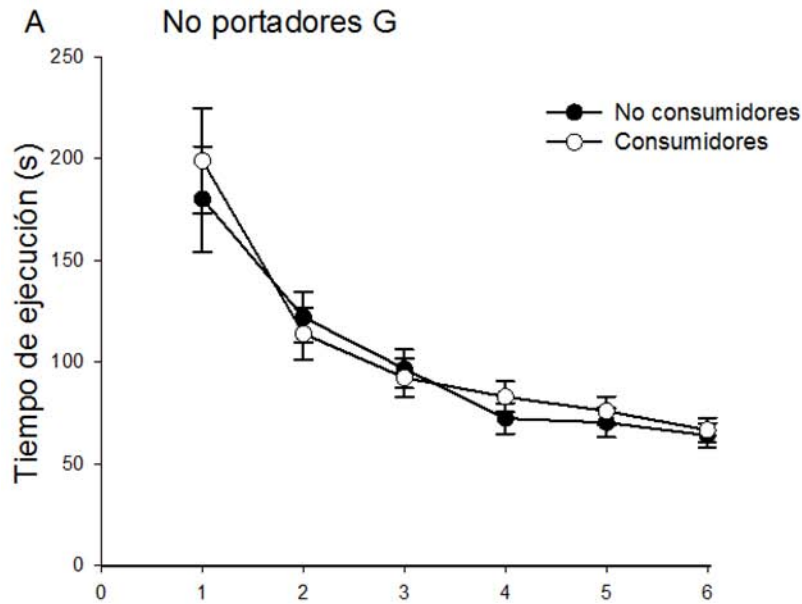


Figura 15. Tiempo de ejecución (Media \pm E.E.M.) de la tarea de trazado de la estrella a través del espejo. En A se observa el tiempo de ejecución para no consumidores y consumidores no portadores del alelo G. En B se muestra el tiempo de ejecución para no consumidores y consumidores portadores del alelo G. No se encontraron diferencias en función del grupo ni del factor portador.

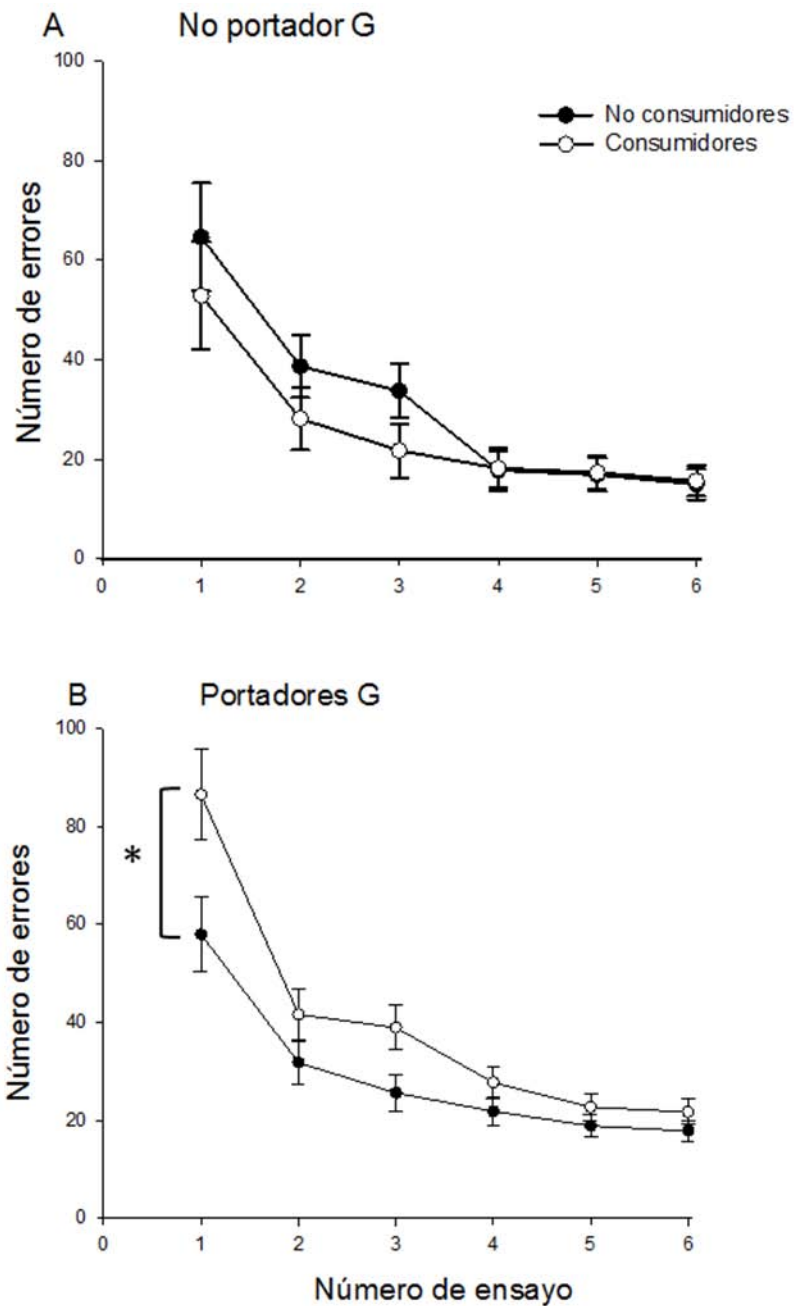


Figura 16. Número de errores (Media \pm E.E.M.) en usuarios y no usuarios de marihuana en la tarea de trazado de estrella a través del espejo en los 6 ensayos. En la gráfica A se representa el número de errores en personas no portadoras del alelo G, y se observa que no hay diferencias significativas entre consumidores y no consumidores. En la gráfica B se representa el número de errores en personas portadoras de al menos un alelo G, en la cual se observa que los consumidores cometieron más errores en el primer ensayo en comparación con los no consumidores. *P= 0.02.

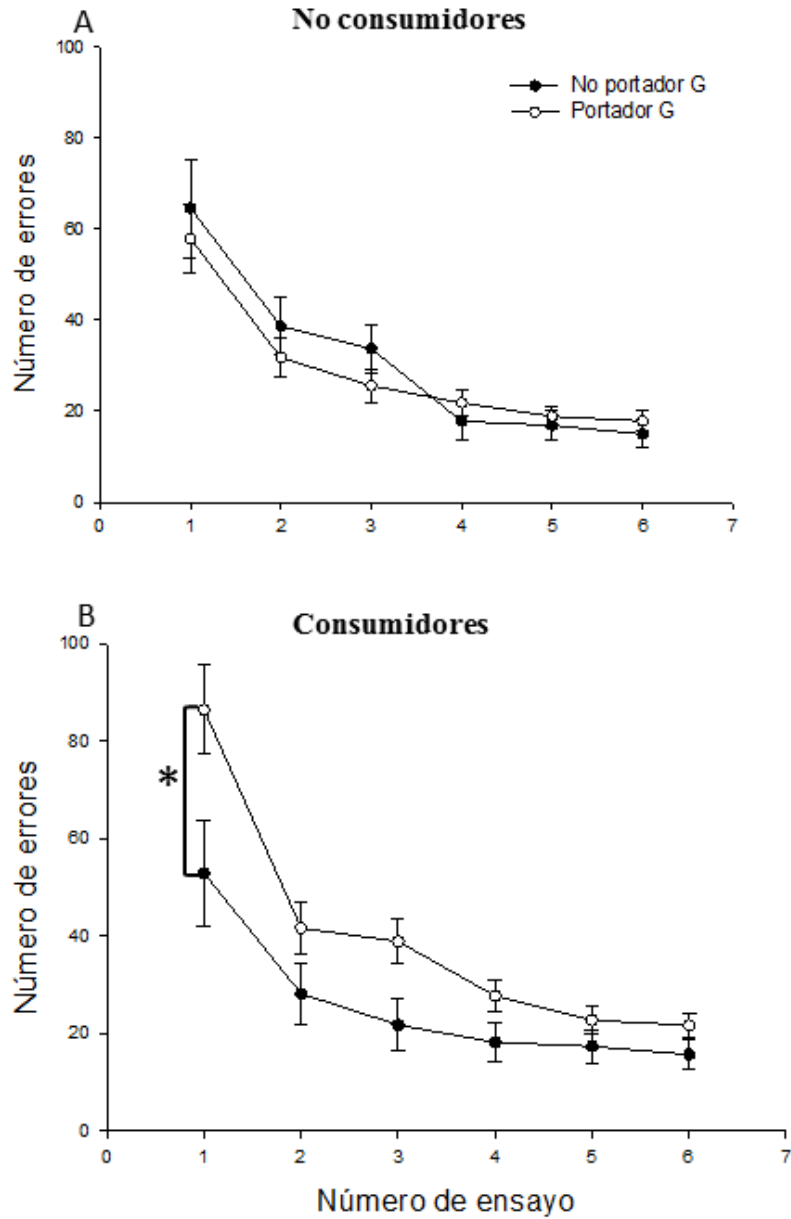


Figura 17. Número de errores (Media \pm E.E.M.) en no portadores G y portadores G en la tarea de trazado de estrella a través del espejo en los 6 ensayos. En la gráfica A se representa el número de errores en no consumidores, y se observa que no hay diferencias significativas entre personas no portadoras del alelo G y portadoras G. En la gráfica B se representa el número de errores en personas consumidores, en la cual se observa que los portadores de al menos un alelo G cometieron más errores en el primer ensayo en comparación con los no portadores G. *P= 0.02.

También se realizó un análisis con los datos de la tarea control para saber si la habilidad motora *a priori* de los participantes difería entre grupo y portador. No se encontraron efectos significativos por grupo ($P= 0.326$) ni por factor portador G ($P= 0.435$) en el tiempo de ejecución de la tarea control. No se encontró interacción significativa de grupo x portador G ($P=0.50$). Tampoco hubo diferencias en el número de errores por grupo ($P= 0.51$), ni por el factor portador G ($P= .57$). La interacción grupo x portador G tampoco fue significativa ($P= 0.85$). Estos análisis nos permiten confirmar que la interacción grupo x portador G x número de ensayo tiene un efecto en la eficiencia del aprendizaje de procedimiento y no en la habilidad motora.

En la Figura 16B, se observa una pendiente más inclinada en los errores del grupo de consumidores en comparación con los no consumidores. Lo que puede señalar que los consumidores tuvieron una tasa mayor de aprendizaje a partir del ensayo 2, aunque comenzaron con más errores. Se decidió realizar un ANOVA de 2 vías en el que se consideró al grupo y portador G como factores; la variable dependiente fue el área bajo la curva. No se observaron resultados significativos por grupo ($P= 0.58$) ni genotipo ($P= 0.17$). Sólo se obtuvo una tendencia en la interacción grupo x portador ($P=0.06$).

9. Discusión

El objetivo de la presente investigación fue explorar la relación del consumo de marihuana con el aprendizaje de procedimiento y si esa relación cambia dependiendo del genotipo para el rs2180619. Dado los resultados de anteriores estudios, esperábamos que los consumidores de marihuana presentaran una menor eficiencia en comparación con personas no consumidoras. De igual forma, esperábamos que portadores del alelo G del rs2180619 estuviera asociado con una menor eficiencia en el aprendizaje de procedimiento en comparación con no portadores. Además, predecíamos que habría una interacción entre el consumo de marihuana y el ser portador del alelo G para el rs2180619 en la eficiencia del aprendizaje de procedimiento. Nuestros resultados comprueban la última hipótesis: el efecto de la marihuana en el aprendizaje de procedimiento depende de ser portador G para el polimorfismo rs2180619. Se encontró que el ser portador del alelo G vulnera a los consumidores de marihuana a presentar deficiencias en el aprendizaje de procedimiento.

Específicamente, la eficiencia se vio disminuida en la primera fase del aprendizaje. Esto debido a que los consumidores de marihuana presentaron más errores sólo en el primer ensayo en comparación con los no consumidores cuando son portadores del alelo G. Durante el mismo ensayo, los consumidores de marihuana portadores del alelo G cometieron más errores que los consumidores de marihuana con genotipo AA. El hecho de que sólo hubo diferencias en el primer ensayo y que en posteriores ensayos tienen la misma eficiencia, podría implicar que la tasa de aprendizaje para los consumidores portadores del alelo G fue mayor que para los no consumidores con el mismo genotipo durante el segundo ensayo. Para evaluar lo anterior se realizó un análisis del área bajo la curva. Aunque no encontramos resultados significativos con dicho análisis, se observó una tendencia en la

interacción entre grupo x portador G, que quizás se debió a una n relativamente pequeña. Se necesita realizar estudios posteriores con una n mayor para confirmarlo.

Se ha observado que los consumidores de marihuana presentan deficiencias en habilidades motoras en comparación con los no consumidores (Weinstein et al., 2008). En el estudio de Weinstein et al. (2008) la habilidad motora fue medida con una tarea en la cual se medían los golpes en los muros que los participantes daban al tratar de salir de un laberinto virtual. Para asegurarnos que nuestros resultados no se explicaran por diferencias en habilidad motora, los participantes realizaron una tarea control. La habilidad motora no fue diferente entre el ser portador o no del alelo G; y a diferencia de Weinstein et al. (2008), no se encontraron diferencias en la habilidad motora entre consumidores y no consumidores de marihuana. Quizás la divergencia entre nuestros resultados y los de Weinstein et al. (2008) se deben a la naturaleza de nuestra tarea. Para nuestra tarea control se requirió que los participantes realizaran movimientos parecidos a los de la tarea de trazado de estrella a través del espejo sin el componente novedoso (i. e. percibir el estímulo directamente y no su reflejo). Lo anterior nos permite descartar la posibilidad de que nuestros resultados se expliquen por diferencias en la habilidad motora entre nuestros participantes.

La interacción entre el consumo de marihuana y el rs2180619 en el aprendizaje de procedimiento muy probablemente se explica a nivel del receptor CB1. Esto debido a que los efectos del consumo de marihuana se atribuyen a que el Δ 9-THC actúa sobre los receptores CB1 (Weinstein et al., 2008); mientras que el rs2180619 es un polimorfismo que se encuentra en una región potencialmente reguladora del gen *CNRI*, que codifica para el receptor CB1 (Zhang et al., 2004). Sin embargo, no se sabe con precisión el efecto del consumo de marihuana en el receptor CB1, ni el efecto fisiológico del rs2180619. En un estudio se encontró que el consumo crónico de marihuana disminuyó el pegado de un

agonista inverso al receptor CB1 en hipocampo, corteza anterior del cíngulo, ínsula, corteza occipital, corteza parietal, corteza posterior del cíngulo, corteza temporal lateral, corteza prefrontal y corteza temporal lateral, pero no queda claro si esto se debe a que la marihuana disminuye la cantidad de receptor CB1 que expresa un individuo o la afinidad de dicho receptor hacia sus ligandos (Hirvonen et al., 2012). En cuanto al rs2180619, sólo se ha reportado un estudio que muestra que diferentes factores de transcripción se unen al *CNRI* dependiendo del genotipo por medio de una simulación en computadora (Lazary et al., 2009). Lo anterior sugiere que el rs2180619 tiene un efecto en la regulación de la expresión del receptor CB1 (Lazary et al., 2009), y quizás también haya un efecto de interacción entre el consumo de marihuana y el genotipo para el rs2180619 en la expresión de CB1.

Se ha observado que consumidores de marihuana presentan una disminución en el volumen hipocampal de forma bilateral (Schacht, Hutchinson y Filbey, 2012). Con base a los anteriores datos, una hipótesis respecto a nuestros resultados es que los consumidores de marihuana portadores del alelo G presentaron una menor actividad hipocampal en comparación a participantes sin estas características que afecta la etapa inicial del aprendizaje de procedimiento. La actividad reducida del hipocampo podría deberse tanto a la disminución del volumen hipocampal como de la potencial disminución de la expresión de CB1 en dicha estructura que se ha observado en consumidores de marihuana, y a la posible disminución en la cantidad expresada de CB1 causada por el alelo G del rs2180619. Cabe resaltar que en el estriado no hay diferencias entre el pegado de un agonista para el receptor CB1 entre consumidores y no consumidores, pero sí en el hipocampo.

Este estudio demostró que el consumir marihuana no tiene efectos en la eficiencia en el aprendizaje de procedimiento por sí sólo. Tampoco hay una disminución de la eficiencia en el aprendizaje de procedimiento por poseer el alelo G para el rs2180619. Para

que ocurra una disminución en la eficiencia de dicho aprendizaje en comparación con un grupo control es necesario presentar ambas condiciones.

9.1 Limitaciones y sugerencias

El presente estudio no puede probar qué diferencias cerebrales explican la eficiencia en el aprendizaje de procedimiento entre consumidores de marihuana portadores del alelo G del rs2180619 en comparación con un grupo control. Tampoco se pueden determinar los efectos del consumo de la marihuana y el alelo G del rs2180619 en el CB1, que pueden ser tanto en la afinidad del CB1 a sus ligando endógenos como en la cantidad de CB1 que se produzca.

A pesar de que en el presente estudio no se encontraron resultados significativos por consumo de marihuana o el alelo G del rs2180619 por sí solos en la eficiencia en el aprendizaje de procedimiento, no se sabe si en el cerebro sí hay cambios estructurales o funcionales asociados a estos factores.

Debemos señalar que la n de nuestro estudio es relativamente pequeña y que sería relevante replicar nuestra investigación con una n mayor con el propósito de aumentar la cantidad de personas homocigotas a G. Aumentar la frecuencia genotípica de homocigotos a G permitiría realizar un análisis por genotipo (AA vs AG vs GG), ya que posiblemente exista un efecto aditivo por el número de Gs que porte un individuo y no es posible evaluar dicho efecto en el presente estudio. Otra razón para realizar un estudio con una n mayor es para saber si la tendencia que observamos en el análisis del área bajo la curva refleja diferencias en la tasa de aprendizaje entre grupos dependiendo del factor portador G.

También es necesario realizar más investigaciones acerca de la funcionalidad del rs2180619 y el efecto del consumo de marihuana. Para lo cual es necesario realizar investigaciones con técnicas que exploren el funcionamiento cerebral (e. g. RMf) asociado

al aprendizaje de procedimiento, así como explorar el efecto que el rs2180619 podría tener en la expresión del receptor CB1.

10. Conclusión

Nuestro estudio sugiere que el alelo G del polimorfismo rs2180619 vulnera a los consumidores de marihuana a presentar deficiencias en el aprendizaje de procedimiento. Dichas deficiencias se presentan al inicio del aprendizaje. Esta investigación permite comprobar la participación del sistema endocannabinoide en el aprendizaje de procedimiento.

11. Referencias

Albouy G., Sterpenich V., Baiteau E., Vandewalle G., Desseilles M., Dang-Vu T.... &

Maquet P. (2008). Both the Hippocampus and Striatum Are Involved in Consolidation of Motor Sequence Memory. *Neuron*, 58, 261-272.

Applied Biosystems. (2002). Allelic Discrimination Using the 5' Nuclease Assay.

Blankman J., Simon G. M. & Cravatt. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2- arachidonylglycerol. *Chemistry & Biology*, 14, 1347-1356.

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

Brenneisen R., Meyer P., Chtioui H., Saugy M., & Kamber M. (2010). Plasma and urine profiles of Δ^9 - tetrahydrocannabinol and its metabolites 11-hydroxy- Δ^9 - tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 - tetrahydrocannabinol after cannabis smoking by male volunteers to estimate recent consumption by athletes. *Anal Bioanal Chem*, 396, 2493-2502.

Burns D., Laere K. V., Sanabria-Bohórquez S., Hamill T. G., Bormans G., Eng W.... & Hargreaves R. J. (2007). [^{18}F]MK-9470, a positron emission tomography (PET) tracer for in vivo human PET brain imaging of the cannabinoid-1 receptor. *PNAS*, 104, 9800-9805.

Cascio M G. & Marini P. (2015). Biosynthesis and fate of endocannabinoids. *Handbook of experimental pharmacology*. 231, 39-58.

Cerdá M., Wall M., Keyes K., Galea S. & Hasin D. (2012). Medical marijuana laws in 50 states: investigating the relationship between state legalization of medical marijuana and marijuana use, abuse and dependence. *Drug Alcohol Depend*, 120 (1-3), 22-27.

- Chen S. & Li X. (2012). Functional Magnetic Resonance Imaging for Imaging Neural Activity in the Human Brain: The Annual Progress. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2012, 1-9.
- Cravatt B. F., Prospero-García O., Siuzdak G., Gilula N. B., Heriksen S. J., Borger D. L. & Lerner R. A. (1995). Chemical Characterization of a Family of Brain Lipids That Induce Sleep. *Science*, 268, 1506-1509.
- Cravatt B. F., Giang D. K., Mayfield S. P., Boger. D. L., Lerner R. A. & Gilula N. B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384, 83-87.
- Crean R. D., Crane N. A., & Mason B. J. (2011). An evidence based review of acute and long term effects of cannabis use on executive functions. *Journal of addiction medicine*. 49, 561-572.
- Davis M. I., Ronesi J., & Lovinger D. M. (2003). A predominant role for inhibition of the Adenylate Cyclase/Protein kinase a pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. *The journal of biological chemistry*, 278, 48973-48080.
- Daselaar SM, Rombouts SA, Veltman DJ, Raaijmakers J. G. W., & Jonker C. (2003). Similar network activated by young and old adults during the acquisition of a motor sequence. *Neurobiology Aging*, 24(7), 1013–1019
- Devane W. A., Dysarz A. F., Jhonson M. R., Melvin L. S., & Howlett A. C. (1988). Determination and Characterization of a Cannabinoid Receptor in Rat Brain. *Molecular Pharmacology*, 24, 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 Brain Constituent that Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science*, 258, 1946-1949.
- Di Marzo V. D., Fontana A., Cadas H., Schinelli S., Cimino G., Scwartz J. C. & Piomelli D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372, 686-691.
- Dinh T. P., Carpenter D., Leslie F. M., Freund T. F., Katona I., Sensi S. L., & Piomelli D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Neurobiology*, 99, 10819-10824.
- Durkin M., Prescott L., Furchtgott E., Cantor J., & Powell D. A. (1994). Performance but not acquisition of skill learning is severely impaired in the elderly. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 20, 167-183.
- Encuesta Nacional de Adicciones 2011. Instituto Nacional de Salud pública, México 2012.
- Galeana-García A. I. (2013). Variaciones diurnas en el aprendizaje de una habilidad motora. Recuperada de <http://132.248.9.195/ptd2013/marzo/302023095/Index.html>
- Gaoni Y., & Mechoulam R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish, *Journal of the American Chemical Society*, 86, 1646-1647.
- Giuffrida A., Beltramo M., & Piomelli D. (2001). Mechanism of endocannabinoid inactivation: Biochemistry and pharmacology. *Perspectives in pharmacology*. 298, 7-14.
- González R., Schuster R. M., Vassileva J., & Martin E. M. (2011). Impact of HIV and a history of marijuana dependence on procedural learning among individuals with a history of substance dependence. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 33 (7), 736-752

- Haring M, Marsicano G, Lutz B, & Monory K. 2007. Identification of the cannabinoid receptor type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice. *Neuroscience*, 146 (3), 1212–1219.
- Herkenham M., Lynn A. B., Litle M. D., Johnson R. M., Melvin L. S., Costa B. R., & Rice K. C. (1989). Cannabinoid receptor localization in brain. *Neurobiology*, 87, 1932-1936.
- Hill EL, Gallopin T., Férézou I., Cauli B., Rossier J., Schweitzer P., & Lambollez B. (2007). Functional CB1 receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic and glutamatergic neurons. *Journal of Neurophysiology*, 97 (4), 2580-2589.
- Howlett AC, Bidaut-Russel M, Devane WA, Melvin LS, Johnson MR, & Herkenham M. (1990). The cannabinoid receptor : biochemical, anatomical and behavioral characterization. *Trends in Neuroscience*, 13, 420-423.
- Jager G., Block R. I., Luijten M., & Ramsey N. (2010). Cannabis use and memory brain function in adolescent boys: a cross-sectional multicenter fMRI study. *Journal of the American academy of child and adolescent psychiatry*. 49, 561-572.
- Karila L., Roux P., Rolland B., Benyamina A., Reynaud M., Aubin H. J. & Lancon C. (2014). Acute and long-term effects of cannabis use: a review. *Current pharmaceutical design*, 20, 1-7.
- Klug W. S., Cummings M. R., & Spencer C. A. (2006). *Conceptos de Genética*. Ed. Pearson.
- Knight J. C. (2005). Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. *Journal of molecular medicine*. 83, 97-109.

- Köfalvi A., Rodrigues R. J., Ledent C., Mackie K., Sylvester E., Cunha R. A., & Sperlág B. (2005). Involvement of cannabinoid receptor in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *The journal of neuroscience*, 25, 2874-2884.
- Kovács K. J. (2008). Measurement of Immediate-Early Gene Activation- c-fos and Beyond. *Journal of Neuroendocrinology*, 20, 665-672.
- Lane S. D., Cherek D. R., Tcheremissine O. V., Steinberg J. L., & Sharon J. L. (2007). Response perseveration and adaptation in heavy marijuana-smoking adolescents. *Addictive Behaviors*, 32, 977-990.
- Lazary J., Lazary A., Gonda X., Benko A., Molnar E., Hunyady L.... & Bagdy G. (2009). Promoter Variants of the Cannabinoid Receptor 1 Gene [CNR1] in Interaction With 5-HTTLPR Affect the Anxious Phenotype. *Neuropsychiatric Genetics*, 150B, 1118-1127.
- Lovinger D. M. (2008). Presynaptic Modulation by Endocannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 184, 435-477.
- Lyons M. J., Bar J. L., Panizzon M. S., Toomey R., Eisen S., Xian H. & Tsuang M. T. (2004). Neuropsychological consequences of regular marijuana use: a twin study. *Psychological Medicine*, 34, 1239-1250.
- MacCoun R. & Reuter P. (2001). Evaluating alternative cannabis regimes. *The British Journal of Psychiatry*, 178:123-128.
- Mackintosh N. J. & Bennett E. S. (2005). What do raven's matrices measure? An analysis in terms of sex differences. *Intelligence*, 33, 663-674.

- Matsuda L. A., Lolait S. J., Brownstein M. j., Young A. C., & Bonner T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *LettersTo Nature*, 346, 361-364
- Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N. E., Schatz A.... & Vogel Z. (1995). Identification of An endogenous 2-Monoaglyceride, Present in Canince Gut, That Binds to Cannabinoid Receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50, 83-90.
- Mechoulam R., & Parker L. (2013). The Endocannabinoid System and the Brain. *Annual Review of Psychology*, 64, 21-47.
- Micale V., Di Marzo V., Sulcova A., Wotjak C. T., & Drago F. (2012). Endocannabinoid system disorders: Priming a target for new therapies. *Pharmacology and Therapeutics*, 138 (1), 18-37.
- Milner B. (2005). The Medial Temporal-Lobe Amnesic Syndrome. *Pyschiatric Clinics of North America*, 28, 599-611.
- Milner B., Squire L. R., & Kandel E. R. (1998). Cognitive Neuroscience and the Study of Memory. *Neuron*, 20, 445-468.
- Munro, S., Thomas, K.L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral cannabinoid receptor. *Nature*, 365, 61–65.
- NCBI. (2002). CNR1 cannabinoid receptor 1 (brain) [Homo sapiens]. Visitada el 15 de marzo, 2013 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1268>.
- Normandin M. D., Zheng M. Q., Lin K. S., Mason S., Lin S. F., Ropchan J., & Labaree D. (2015). Imaging the cannabinoid CB1 receptor in human with [11C] OMAR: assessment of kinetic analysis methods, test-retest reproducibility, and gender differences. *Journal of cerebral blood flow & metabolism*, 35, 1313-1322.

- O'Connor M. G., Jerkey B. A. Robertson E. M., DPhil B., Brenninkmeyer C., Ozdemir E. & Leone A. P. (2005). The effects of repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (RTMS) on Procedural Memory and Dysphoric Mood in patients With Major Depressive Disorder. *Cognitive and Behavioral Neurology*, 223-227.
- Pan X., Ikeda S. R., & Lewis D. (1996). Rat brain cannabinoid receptor modulates N-Type Ca⁺ channels in a neuronal expression system. *Molecular Pharmacology*, 49, 707-714.
- Pietrzyk V. U. (1997). Positron Emission Tomography. Physical Background and Applications.
- Pistell P., Nelson C. M., Miller M. G., Spangler E. L., Ingram D. K., & Devan B. D. Striatal lesions interfere with acquisition of a complex maze task in rats. *Behavioural Brain Research*, 197, 138-143.
- Piomelli D. (2003). The Molecular Logic of Endocannabinoid Signaling. *Nature Reviews*, 4, 883-884.
- Poldrack R. A., Sabb F. W., Foerde K., Tom S. M., Asarnow R. F., Bookheimer S. Y. & Knowlton B. The Neural Correlates of Motor Skill Automaticity. *The Journal of Neuroscience*, 25, 5356-5364.
- Pope H., & Yugelun D. (1996). The Residual Cognitive Effects of Heavy Marijuana Use in College Students. *JAMA*, 275, 521-527.
- Pope H., Gruber A., Hudson, J., Huestts M., & Yurgelun D. (2001). Neuropsychological Performance in Long-term Cannabis Users. *Archives of General Psychiatry*, 58, 909-915.
- Pope H., Gruber A., Hudson, J., Huestts M. & Yurgelun D. (2002). Cognitive Measures in Long-term Cannabis. Users. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42, 41S-47S.

- Rammsayer T., Rodewald S., & Groh D. (2000). Dopamine-antagonistic, anticholinergic, and GABAergic effects on declarative and procedural memory functions. *Cognitive Brain Research*, 9, 61-71.
- Robles R., Varela R., Jurado S. & Páez F. (2001). Versión Mexicana del Inventario de Ansiedad de Beck: Propiedades Psicométricas. *Revista Mexicana de Psicología*, 18, 211-218.
- Rueda-Orozco P., Montes-Rodríguez C. J., Soria-Gomez E., Méndez-Díaz M., & Prospéro-García O. (2008). Impairment of endocannabinoids activity in the dorsolateral striatum delays extinction of behavior in a procedural memory task in rats. *Neuropharmacology*, 55, 55-62.
- Ruiz-Contreras A. E., Delgado-Herrera M., García-Vaca P. A., Almeida-Rosas Georgina A., Soria-Rodríguez G...., & Prospéro-García O. (2011). Involvement of the AATn polymorphism of the CNR1 gene in the efficiency of procedural learning in humans. *Neuroscience Letters*, 494, 202-206.
- Ruiz-Contreras A. E., Carrillo-Sánchez K., Gómez-López N., Vadillo-Ortega F., Hernández-Morales S., Carnevale-Cantoni A...., & Prospéro-García O. (2013). Working memory performance in young adults is associated to the AATn polymorphism of the CNR1 gene. *Behavioral Brain Research*, 236, 62-66.
- Ruiz-Contreras A. E., Carrillo-Sánchez K., Ortega-Mora I., Barrera-Tlapa M. A, Román-López T. V., Rosas-Escobar C. B., & Prospéro-García O. (2014). Performance in working memory and attentional control is associated with the rs2180619 SNP in the CNR1 gene. *Genes, Brain and Behavior*, 1-6.

- Schacht J. P., Hutchinson K. E., & Filbey F. M. (2012). Associations between cannabinoid receptor-1 (CNR1) variation and hippocampus and amygdala volumes in heavy cannabis users. *Neuropsychopharmacology*, 37, 2368-2367.
- Scoville W. B., & Milner B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20 (11), 11-21
- Seger C. A. (2006). The basal ganglia in human learning. *Neuroscientist*, 12, 285-290.
- Sollowij N., Stephens R. S., Roffman R. A., Babor T., Kadden R., Miller M.... & Venedetti J. (2002). Cognitive functioning of long-term heavy cannabis users seeking treatment. *American medical association*. 287, 1123-1651.
- Squire L. R. (2009). The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron*, 61, 6-9.
- Squire L. R., & Zola-Morgan J. T. (2011). The cognitive Neuroscience of Human Memory Since H. M. *The Annual Review of Neuroscience*, 34, 259-288.
- Stadelmann AM, Juckel G, Arning L, Gallinat J, Epplen JT, & Roser P. (2011). Association between a cannabinoid receptor gene (CNR1) polymorphism and cannabinoid induced alterations of the auditory event-related P300 potential. *Neuroscience Letters*, 496(1), 60–64.
- Stevens C., & Bavelier, D. (2012). The role of selective attention on academic foundations: a cognitive neuroscience perspective. *Developmental Cognitive Neuroscience*.
- Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., & Waku K. (1995). 2-Arachidonylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 215, 89-97.
- Swcatt J. D. (2010). *En Mechanism of memory* (pp. 14-15). China: Academic Press.
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2015). *World drug report*.

- Waes V. V., Beverley J. A., Siman H., Tseng K. Y. & Steiner H. (2012). CB1 cannabinoid receptor expression in the striatum: association with corticostriatal circuits and developmental regulation. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 1-8.
- Wade M. R., Tzavara E. T. & Nomikos G. G. (2004). Cannabinoids reduce cAMP levels in the striatum of freely moving rats: an in vivo microdialysis study. *Brain Research*, 1005, 117-123.
- Weinstein a., Brickner O., Lerman H., Gremland M., Bloch M., Lester H., & Mechoulam R., Bar-Hamburger R., Freedman N. & Sapir-Even. (2008). A study investigating the acute dose-response effects of 13 mg and 17 mg Δ^9 -tetrahydrocannabinol on cognitive- motor skills, subjective and autonomic measures in regular users of marijuana. *Journal of Psychopharmacology*, 22 (4), 441-451.
- Wolk D. A. & Budson A. E. (2010). Memory Systems. *American Academy of Neurology*, 16 (4), 15-28.
- Zassadowsky F., Rochette-Egly C., Chomienne C., & Cassinat B. (2012). Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptor by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cellular signaling*, 24, 2369-2377.
- Zhang P W., Ishiguro H., Ohtsuki T., Hess J., Carillo F., Walther D., & Uhi GR. (2004). Human cannabinoid receptor 1:5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Molecular Psychiatry*, 9, 916-931.