



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**“Efecto del bloqueo de los receptores CB1 sobre la ansiedad y el  
proceso inflamatorio producidos por el consumo de bebidas  
energizantes y alcohol en la cepa Wistar”**

Tesis que para obtener el título de:

**LICENCIADA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

**MARÍA MAGDALENA XOCHIPA ROMERO**

**201877144**

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. MARÍA DE GUADALUPE MUÑOZ ARENAS

ASESOR

D.C. ALFONSO DANIEL DÍAZ FONSECA

D.C. María de Guadalupe Muñoz Arenas  
Coordinadora de la Licenciatura en Farmacia

Puebla, Pue., mayo de 2024



## Índice

Abreviatura .....	1
Resumen.....	3
1. Introducción. ....	3
2. Antecedentes.....	5
2.1 Trastorno de ansiedad.....	5
2.2 Consumo de bebidas alcohólicas y energizantes .....	7
2.3 El sistema endocannabinoide .....	11
2.4 Neurotransmisores implicados en ansiedad .....	13
2.4.1 Dopamina .....	13
2.4.2 GABA.....	14
2.5 Núcleos involucrados.....	15
2.5.1 Corteza prefrontal medial y estriado ventral .....	15
2.5.2 Hipocampo .....	16
2.6 Estrés nitrosativo.....	17
2.7 Neuroinflamación y la proteína TNF- $\alpha$ .....	19
2.8 AM 251 .....	20
2.9 El bloqueo de los receptores CB1, como posible modulador del consumo de bebidas energizantes y alcohólicas .....	21
2.10 Análisis de conducta.....	21
2.10.1 Laberinto de cruz.....	23
2.10.2 Nado forzado.....	23

En 1977 Porsolt y col, describió que esta prueba consiste en colocar una rata o un ratón en un cilindro de agua a una temperatura de 25°C, en búsqueda que el roedor no pueda . 23

6.1	Enterramiento defensivo .....	24
6.2	Campo abierto.....	24
3	Planteamiento del problema.....	25
4	Justificación .....	26
5	Hipótesis.....	27
6	Objetivos .....	27
6.11	Objetivos particulares.....	28
7	Metodología.....	29
5.1	Diagrama general de trabajo .....	29
5.3	Estudios conductuales .....	31
5.8.1	Campo abierto.....	31
5.5.	Obtención y procesamiento de tejido para técnicas histológicas. ....	32
5.6.	Técnicas bioquímicas.....	33
5.6.1	Inmunohistoquímica para inflamación .....	33
5.6.2	Cuantificación de nitritos por la técnica de Griess.....	34
5.6.3	Proteínas de totales de Bradford.....	35
5.6.4	Análisis estadístico .....	35
6	Resultados .....	35
6.1	Efecto de la administración de la combinación de BE con EtOH y AM 251 en la disminución de niveles de nitritos. ....	35
6.2	Efecto de la administración de la combinación de bebidas energizantes con alcohol y AM 251 sobre la conducta de campo abierto.....	37
6.3	EL TRATAMIENTO CON AM 251 DISMINUYE LA INFLAMACIÓN EN CEREBRO.....	39

7 Discusión de resultados ..... 42

8 Conclusión..... 48

9 Perspectiva:..... 48

Referencias ..... 49

## **Abreviatura**

**TA** Trastorno de ansiedad

**BE** Bebida Energizante

**SNC** Sistema Nervioso Central

**5HT** 5-Hidroxitriptamina

**DA** Dopamina

**PDE** Fosfodiesterasas

**AMPc** Adenosín monofosfato cíclico

**PKA** Proteína quinasa A

**GLU** Glutamato

**GABA** Ácido gamma aminobutírico

**EtOH** Alcohol

**NAc** Núcleo accumbens

**ATV** Área tegmental ventral

**CB1** Cannabinoide B1

**HP** Hipocampo

**CB2** Cannabinoide B2

**THC** Tetrahidrocannabinol

**LC** Locus coeruleus

**CPF** Corteza prefrontal

**CMP** Corteza medial prefrontal

**ERO** Especie reactiva de oxígeno

**ERN** Especie reactiva de nitrógeno

**NO** Óxido nítrico

**iNOS** Óxido nítrico sintetasa inducible

**ONOO-** Peroxinitrito

**nNOS** Óxido nítrico sintetasa neuronal

**eNOS** Óxido nítrico sintetasa endotelial

**TNF- $\alpha$**  Factor de necrosis tumoral alfa

**CYP2E1** Citocromo P450 2E1

**FNKB** Factor nuclear KB

**ATP** Adenosín trifosfato

## **Resumen**

El consumo de bebidas energizantes ha demostrado una rápida expansión creando preocupación en la comunidad científica, debido a su alta demanda por la población joven, relacionada al entretenimiento y la práctica deportiva. El consumo de alcohol es una práctica común en la sociedad sin embargo de forma crónica puede causar enfermedades, problemas sociales o económicos. Existen dos tipos de receptores cannabinoides, CB1 y CB2, el CB1 es el más abundante en el cerebro de mamíferos y se localiza fundamentalmente en el sistema nervioso. Investigaciones sugieren que el consumo de alcohol a largo plazo también podría modificar la actividad de los componentes del sistema cannabinoide endógeno, es por ello que el objetivo de este trabajo fue generar un modelo de alcoholismo en combinación con bebidas energizantes en ratas de la cepa Wistar, en este modelo se evaluó la ansiedad, estrés nitrosativo e inflamación por medio de una prueba de conducta y pruebas bioquímicas, donde previamente algunos grupos fueron administrados con un antagonista de los receptores CB1 dando como resultado que la administración del fármaco AM 251 genera diferencias significativas mostrando una disminución de la conducta ansiosa, de nitritos e inflamación a diferencia de los grupos que no fueron administrados con el fármaco y así mismo se obtuvo que la combinación de estas bebidas favorece un estado ansiogénico, y aumenta la presencia de estrés nitrosativo e inflamación en los sujetos de estudio.

### **1. Introducción.**

La destilación y consumo de bebidas alcohólicas a formado parte de la humanidad desde sus primeras etapas. Países como China se han reportado como importantes representantes de su destilación a partir del vino en el siglo IV d. C (Rosenstingl, 1978), sin embargo, este proceso fue

reportado por primera vez en Occidente hasta varios siglos después (Brock, 1998). Esta bebida es una de las sustancias más consumidas en la cultura occidental, y se ha visto relacionada como un factor causal en más de 200 enfermedades y trastornos en esta parte del mundo. Sin embargo, el consumo de alcohol se ha vuelto una actividad global, donde grupos sociales lo ingieren por diversas razones, el gobierno mexicano ha reportado que las personas principalmente consumen alcohol por: curiosidad, invitación de amigos o familiares, experimentación, problemas familiares, influencia o búsqueda de aceptación del grupo. Lo cual se ha vuelto un problema de salud pública y social debido a que tiene un papel importante en fiestas, antros, conciertos, y otros tipos de eventos provocando que la frecuencia de su consumo sea innegable. Sin considerar a personas que ya se encuentren ante un problema de alcoholismo donde el consumo es desmedido y constante.

Las bebidas energizantes se caracterizan por ser sustancias que ayudan a estimular el sistema nervioso y vascular, estas bebidas se crearon alrededor del año 1960 en búsqueda de mejorar la resistencia física, en base a una acción más rápida, un alto nivel de concentración e inhibir la sensación de sueño. Por lo tanto, sus principales consumidores son la población adolescente y jóvenes adultos, donde se destacan estudiantes, trabajadores de jornadas nocturnas y deportistas, generando que en los últimos diez años estas bebidas tengan un aumento del 20% de su consumo, donde una de las bebidas más consumidas es la marca Red Bull.

La combinación de alcohol y bebidas energizantes se ha convertido en un problema de salud pública, debido a que en la actualidad estas bebidas se han visto relacionadas con problemas económicos, sociales y de salud como enfermedades no transmisibles en donde destacan problemas cardiovasculares, neuronales, hepáticos, deterioro en la percepción de la coordinación, alteraciones en el comportamiento, la subestimación del grado de intoxicación etílica y ansiedad. (Ahumada-Cortez, et al 2017, Machorro & Moreno, 2007)

Diversos reportes han expuesto que existe una posible utilidad de antagonistas de los receptores cannabinoides para disminuir algunas de las afecciones que provoca el consumo de estas bebidas de forma individual y combinada, por lo tanto el propósito de este estudio experimental in vivo fue analizar el efecto de la inactivación de los receptores CB1, sobre los procesos cognitivos y bioquímicos de un modelo murino administrado de alcohol, red bull, solución salina con el fin de buscar las consecuencias de los receptores cannabinoides en problemas como el alcoholismo y su combinación con bebidas energéticas, con la indagación de alternativas farmacológicas que eviten esta resultante que genera problemas para la sociedad.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Trastorno de ansiedad**

El término ansiedad proviene del latín *anxietas*, que se manifiesta mediante una tensión emocional (Bulbena, 1986). El trastorno de ansiedad (TA) tiene una etiología compleja debido a que es multicausal, y esta se conforma de diversos factores ambientales e individuales (American Psychiatric Association, 2013). Este trastorno se caracteriza por síntomas psicóticos, crónicos e incapacidad psicosocial, donde las personas que la padecen pueden experimentar temor o una inquietud excesiva, en caso de tratarse de ansiedad generalizada esta puede ser incitada por una amplia gama de situaciones cotidianas. Asimismo, diversos autores sugieren que este padecimiento puede surgir de una combinación de factores del neurodesarrollo y genéticos (Tononi, 2000).

Según resultados de la primera encuesta nacional de bienestar, se ha capturado que en México aproximadamente el 19.3% de la población adulta tiene síntomas de ansiedad severa, mientras otro 31.3% revela síntomas de ansiedad mínima o en algún grado (INEGI, 2021). Asimismo, el TA es uno de los problemas de salud mental más importantes en el mundo, afectando al 4% de la población mundial (GBD, 2019).

## **2.2 Consumo de bebidas alcohólicas y energizantes**

Las bebidas energizantes (BE) se caracterizan por estar compuestas de azúcares, sodio, taurina, agua carbonatada, cafeína, arginina, vitaminas del complejo B solubles en agua y glucuronolactona (PROFECO, 2011).

Actualmente el consumo de BE ha demostrado tener un papel importante, debido a que el cuerpo humano es excesivamente demandante de energía, lo que ha generado la popularidad de estas bebidas en sus consumidores ya que debido a sus componentes y mercadotecnia ha cautivado al usuario con una idea de un mayor rendimiento en el cuerpo más allá de sus capacidades. La población joven se destaca en ser de los principales compradores de estos productos en búsqueda de reducir la sensación de fatiga, aumentar un estado de vigilia, resolver la carga académica y favorecer la actividad deportiva (Zuconi, 2013). Sin embargo, el abuso del consumo de estas bebidas ha generado daños importantes en la salud de sus consumidores ya que el consumo excesivo puede provocar efectos tóxicos por sus componentes o también por la combinación de estos con otras sustancias como drogas o alcohol (Bigard, 2010).

Como se mencionó anteriormente, uno de los componentes principales de las BE es la cafeína, diversas investigaciones han demostrado que su consumo excesivo provoca intoxicaciones agudas como palpitaciones, taquicardia e hipertensión (García et al, 2019); asimismo, se ha publicado información sobre trastornos psiquiátricos y neurológicos donde el consumo crónico y alto de estas bebidas ha provocado recaídas en problemas mentales como la esquizofrenia (Cerimele et al, 2010).

Las metilxantinas tienen la propiedad de estimular al SNC e incrementar el rendimiento intelectual y la actividad motora (Moratalla, 2008). Este grupo de sustancias está conformado por cafeína, teofilina y teobromina, los cuales son los ingredientes usuales en las BE, para incrementar

el rendimiento mental y físico así como reducir la fatiga y el sueño, pero su consumo en dosis altas genera efectos perjudiciales para la salud, como problemas renales donde las metilxantinas generan vasodilatación de la arteriola aferente del glomérulo renal, aumentando el flujo sanguíneo al riñón e incrementa la tasa de filtración glomerular, debido al efecto diurético que tienen (Fisone et al, 2004) así mismo también pueden afectar al sistema cardiovascular provocando efectos cronotrópicos e inotrópicos positivos, orillando al organismo a presentar arritmias e incluso un infarto agudo de miocardio ( Forman et al, 1997, Bender et al, 1991)

Las metilxantinas, son antagonistas no selectivos de los receptores de adenosina específicos de adenosina *A1* y *A2a*, por lo que actúan uniéndose al receptor sin activarlo, lo que provoca la reducción de actividad de adenosina la cual se caracteriza por ser un potente modulador de la transmisión sináptica en varias sinapsis (Siegel & Albers 1994).

Por lo tanto, las metilxantinas pueden desencadenar que la adenosina no pueda modular las acciones de dopamina (DA), ya que se ha reportado que el receptor *A1* antagoniza la acción del receptor dopaminérgico *D1* y el receptor *A2a* se antagoniza la acción del receptor *D2*, (Chen et al 2003, Moratalla, 2008). Así mismo este efecto antagonístico entre el receptor *A2a* y el *D2* y entre *A1* y *D1* se ha relacionado por su interacción directa entre estos dos receptores, debido a que todos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana y que también se relacionan por su localización donde *A1* y *D1* se encuentran en las neuronas estriónígricas, y *A2a* y *D2* en las neuronas estriatopalidales (Ferré S et al, 2007, 2008)

También, estas moléculas inhiben a las fosfodiesterasas (PDE) las cuales son metalohidrolasas que se encargan de hidrolizar al adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y al guanosín monofosfato cíclico (GMPC) en presencia de cationes divalentes ( Rand et al, 1987); al inhibirlas afecta a la estimulación  $\beta$ -adrenérgica ya que impide la degradación de adenosín

monofosfato cíclico (AMPc), produciendo así un efecto cronotrópico positivo, el incremento de la excitabilidad en el SNC y la relajación de musculo (Golfrank & Lewis, 2002)

Se pueden presentar cambios neurovasculares importantes, cuando la concentración sérica de las metilxantinas llega a los 25µg/ml o más (Gurley et al, 2015). Se ha demostrado que la cafeína bloquea a la monoaminoxidasa (MAO), lo cual incrementa la concentración de la adrenalina, DA y glutamato (GLU) en el organismo. Esto tiene una gran relevancia, ya que el consumidor de BE puede sufrir problemas de vasoconstricción generalizada, incremento de la frecuencia cardíaca, hipopotasemia y una mayor excreción de sodio y agua (Cappelletti et al, 2018). Si bien la cafeína es uno de los principales componentes de las BE, estas también contienen taurina, la cual ha sido asociada a vasoespasmos y alteración del estado de conciencia (Rottlaender et al, 2012). La taurina se caracteriza por tener una gran afinidad hacia el receptor de glicina, pero también puede actuar en los receptores del ácido gamma aminobutírico (GABA) como el receptor GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. Por tanto, el consumo de BE puede generar un alto flujo de cloro, lo que lleva las células a la hiperpolarización (Albrechet & Schousboe, 2005). Asimismo, la alta cantidad de glucosa en las BE puede estimular la síntesis de neurotransmisores como la acetilcolina, GLU y GABA, principalmente en el hipocampo nivel hipocampal (Riby et al, 2006).

El alcoholismo se considera una enfermedad multifactorial ya que su evolución puede ser desencadenada por diversos factores: genéticos, orgánicos, psicológicos, culturales y del ambiente. El consumo de alcohol (EtOH), es una práctica que es muy común en la sociedad sin embargo de forma excesiva y crónica puede causar daños en la salud del consumidor, así como problemas sociales y/o económicos (Cowley 1992).

Se ha reportado que el consumo de ETOH, deprime las neuronas cerebrales y espinales lo que en parte es la razón de la disminución de conciencia del consumidor. Puede modificar la

actividad de diversos neurotransmisores en los que se incluye el sistema de señalización endocannabinoide, GABA, serotonina, DA y GLU (Koob & Nestler, 1997).

Asimismo, la ingesta aguda, también puede generar un daño al inhibir estructuras subcorticales que permiten la modulación de la actividad de la corteza cerebral (Vengeliene et al, 2008). El consumo de ETOH, favorece la acción de GABA debido a que activa a sus receptores, trayendo consigo la hiperpolarización celular, lo cual disminuye la coordinación, y disfunción cognitiva (Pitzele y Tolia, 2010). La dependencia alcohólica es la DA, debido a que ocurre la activación de la vía mesocortical generando hiperactividad de esta catecolamina en la corteza prefrontal (CPF) (Fernandez, 2002).

El área tegmental ventral (ATV) también presenta un aumento en la frecuencia de neuronas dopaminérgicas que las proyecta hacia zonas corticales y subcorticales (Wang et al, 2006), esto es resultado de que el NAc, emite proyecciones GABAérgicas en esta área y hacia el núcleo pálido ventral, así mismo este núcleo ha sido relacionado con los efectos reforzantes de EtOH asociado al incremento de DA (DiChiara & Emperato, 1988).

En la actualidad, la comunidad joven ha transmitido la creencia popular de que las BE combinadas con EtOH pueden disminuir el estado depresor de este último, y aumentar un estado de vigilia, no obstante el grupo de Ferreira y colaboradores en 2006, hicieron una investigación sobre 3 grupos de pacientes donde compararon su respuesta ante una prueba de esfuerzo máxima: el primer grupo consumió BE, el segundo grupo consumió EtOH y el tercer grupo ingirió la combinación de estas; los resultados de este estudio demostraron que no existen diferencias significativas en respuesta a la prueba de esfuerzo, entre quienes consumieron EtOH solo o combinado con BE (Ferreira et al, 2006).

Cuando las BE y el EtOH se combinan, existe un problema ya que la cafeína de las BE

puede ocultar un grado de intoxicación alcohólica, lo que hace que sus consumidores sigan ingiriendo mayores cantidades de EtOH, y esto suele transcurrir en eventos, antros y bares (Verster et al, 2012, Marczinski et al, 2006).

Ahora bien, el riesgo de esta combinación no es solo el aumento de consumo, también se han registrado la pérdida de conciencia, la euforia y disminuye la habilidad motora, lo cual ha sido detonante de heridas o abusos, además de que disminuye el estado de alerta al conducir (Bigard, 2010). Por otro lado, en Taiwán se realizó una encuesta nacional que reveló que, con esta mezcla, la población tenía más probabilidades de ser dependientes al alcohol, en comparación con los consumidores de alcohol solo (Cheng, 2012).

Un evento importante que se debe tener en cuenta es que cuando se combina EtOH y BE puede provocar una disminución en la concentración de adenosina en el cerebro debido a la BE que está compuesta por metilxantinas donde una de las más características es la cafeína y como se mencionó anteriormente estos alcaloides tienen la característica de poder trabajar como un bloqueador no específico de los receptores de adenosina A1 y A2a. Ahora bien, el EtOH puede potenciar la apertura de los canales iónicos asociados al receptor de serotonina tipo 3 (Martí et al, 1999) lo que puede generar la activación de DA provocando que se encuentren en grandes cantidades en el organismo, ya que algunos componentes encargados de regularlas como la adenosina no pueden modularlas. Por lo tanto, esta combinación de puede provocar una desregulación en la permitir transmisión dopaminérgica en el sistema mesolímbico que a largo plazo el organismo se encuentre ante una dependencia alcohólica (Nagy et al, 1990, Arolfo 2004, Yao 2002).

### **2.3 El sistema endocannabinoide**

En 1988, Howlett y Fleming postularon que los cannabinoides inhiben al adenilato ciclasa.

En 1988, también se descubrió que los cannabinoides tienen un sitio de unión específico en el cerebro de rata. En 1990, se aisló y secuenció el receptor a cannabinoides, denominado CB1 (Matsuda et al, 1990). Se utilizaron técnicas autorradiográficas y estudios inmunohistoquímicos para la localización puntual de este receptor en cerebro de rata, encontrándose que se distribuye ampliamente de los ganglios basales e hipocampo (HP) (Pertwee, 1999, Garcia et al, 2016) en el caso del receptor cannabinoide CB2 se llevó a cabo una clonación 1993 por Munro y cols. en muestras de bazo de rata y una línea leucémica humana (Maldonado, 2008).

Dos décadas después del descubrimiento del componente psicoactivo más reconocido y abundante en las variedades de la planta de cannabis el Tetrahidrocannabinol (THC) se logró indicar que los cannabinoides trabajan de manera semejante a las hormonas y los neurotransmisores, ya que un receptor de membrana es el responsable de sus efectos. (Herkenham et al, 1990, Matsuda et al, 1990, Munro 1993).

Los receptores CB1 y CB2 son de tipo transmembranal y se acoplan a una proteína G de tipo Gi /Go (MacNaughton et al, 2004). El receptor CB1, es el más abundante en el cerebro de mamíferos y se localiza fundamentalmente en el SNC, se expresa predominantemente en las terminales nerviosas y regula la liberación de neurotransmisores excitadores e inhibidores, sin embargo; se expresa en muchos otros tejidos periféricos (Garcia et al, 2016). Por otro lado, el receptor CB2 se encuentra principalmente en células del sistema hematopoyético e inmunitario, en la región de las amígdalas y bazo (Maldonado, 2008). Los receptores CB1 y CB2, trabajan a partir de proteínas G, que inhiben la adenilciclase y pueden regular a los canales de iones, como también a los canales de potasio o los canales de calcio dependientes de voltaje tipo N (Niesink & Van 2013, Osorio & Tangarife 2009)

## **2.4 Neurotransmisores implicados en ansiedad**

### **2.4.1 Dopamina**

La DA es una catecolamina que participa en varios procesos del cerebro, está involucrada en el comportamiento social, la cognición, la regulación emocional, el aprendizaje y también permite el cambio y la selección de la conducta motora (Schneier et al, 2000, Redgrave et al, 2011). Los receptores de DA pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G (Kebabian & Calne, 1979). Existen 5 tipos de receptores dopaminérgicos (D1 a D5); que se agrupan en 2 familias: El primer grupo se conoce como receptores D1 que está conformado por los receptores D1 y D5, los cuales se acoplan a PGs. El segundo grupo se conoce como D2 donde se encuentran a los tipos D2, D3 y D4, que se unen a proteínas G inhibitoras (PGi) (Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

La DA es un neurotransmisor involucrado en procesos ansiogénicos y el miedo (De la Mora et al, 2010, Kienast et al, 2008). La alteración de la transmisión de DA puede provocar una gran diversidad de factores estresantes agudos (Nasechi et al, 2011, Terzian et al, 2011). La disminución de dopamina sería la responsable de conductas similares a la ansiedad y la depresión (Bonomaully et al, 2014, Eskow et al, 2012).

El cerebro tiene diferentes áreas implicadas como el hipocampo, (Rostami et al, 2006, Ashabi et al, 2011) la corteza prefrontal (CPF) (Peleg et al, 2005, Fogaca et al, 2012) y NAc, (Zarrindast et al, 2008, Kochenborger et al, 2012) los cuales se encuentran involucrados en conductas tipo ansiedad y cada región está implicada con el neurocircuito de ansiedad en humanos (Shin & Liberzon 2010, Adhikari et al, 2010), todos regulados por la acción de la DA.

## 2.4.2 GABA

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitor más abundante en el encéfalo y el SNC. Las neuronas GABAérgicas se distribuyen extensamente en el sistema límbico y la región troncoencefálica (Flórez, 2008).

Este neurotransmisor ejerce su acción fisiológica mediante la interacción con receptores específicos, denominados GABAA, GABAB y GABAC y existen 2 tipos de transportadores: el GAT-A, que actúa en neuronas y la glía, y el GAT-B, que solo actúa en neuronas. (Flórez, 2008).

El GABA ha mostrado tener una gran relevancia en los TA, ya que sus receptores GABA<sub>A</sub> se localizan principalmente en el HP y bulbo olfatorio, y producen un efecto ansiolítico (Nutt et al, 2001, Lydiard 2003, Nemeroff 2003). Dicho receptor, además de estar involucrado en la acción ansiolítica, se ha demostrado que puede estar relacionado con la angustia que produce el TA. Actualmente se propone que el GABA está relacionado en los sistemas noradrenérgicos y serotoninérgicos que también se involucran con la generación de la angustia (Sierra et al, 2003). Así mismo cuando ocurren cambios en la distribución de los receptores GABA<sub>A</sub>, pueden existir alteraciones en la percepción de sensaciones de miedo y ansiedad (Sallee & Greenawald, 1995).

## **2.5 Núcleos involucrados**

### **2.5.1 Corteza prefrontal medial y estriado ventral**

La corteza medial prefrontal (CMP) es trascendental en la ejecución de conductas de motivación, esenciales para la supervivencia, como la búsqueda de alimento, agua, refugio y prevenir riesgos (Risold et al, 1997). Ahora bien, estudios recientes mostraron que la CMP también guía respuestas vegetativas (autonómicas y endócrinas) (Valdés et al, 2006)

El estriado lateral, se divide, en núcleo caudado y putamen, y esta interacción es la razón del por el cual se le denomina estriado ya que sus bandas de sustancia gris cruzan la cápsula interna y conectan en núcleo caudado con el putamen. Por otro lado, el putamen junto con el globo pálido establecen una estructura morfológica llamada núcleo lenticular (De la Torre, 2017). El núcleo accumbens y el bulbo olfatorio forman colectivamente la parte ventral del cuerpo estriado, que se caracteriza principalmente por tener conexiones con estructuras límbicas, como la amígdala, el HP, el tálamo y la CPF (Castaño & Díaz 2011).

El estriado expresa receptores para DA, GLU, acetilcolina, GABA, adenosina, histamina, somatostatina y óxido nítrico (NO) entre otros. Estos neurotransmisores y neuromoduladores modifican la respuesta inhibitoria del núcleo. En este sentido, el estriado también endocannabinoides, que actúan en la regulación de la plasticidad neuronal que al mismo tiempo ayuda a modular la excitabilidad proveniente de la corteza (Mathur & Lovinger 2012).

El estriado dorsal recibe una importante aferencia dopaminérgica del SNC, (Morikawa & Paladini 2011) y el estriado ventral recibe unas neuronas dopaminérgicas del VTA. El estriado contiene inervaciones dopaminérgicas densas (De Manzano et al, 2013) cuya función principal es el procesamiento de la recompensa (Morikawa & Paladini 2011) y la motivación. (De Manzano et al, 2013).

Estudios de neuroimagen enfocados en el estudio de la ansiedad en los ganglios basales, han mostrado evidencia del daño en la función dopaminérgica. También se ha mostrado una desregularización en las vías mesocorticales y mesolímbicas. En la actualidad se ha podido evaluar este daño a través de una evaluación de la recaptación de DA a través de tomografías por emisión de positrones las cuales en el área médica permiten evaluar el funcionamiento de tejidos y órganos por lo tanto al escanear la zona de estriado en cerebro ha demostrado una disminución de la recaptación de DA en los pacientes con ansiedad social mostrando en las imágenes la disminución en densidad de sitios de recaptación de la dopamina, que definiría un déficit en la inervación dopaminérgica al estriado (Gariay 2002)

### **2.5.2 Hipocampo**

El HP pertenece a la región medial del telencéfalo, se incluye en el sistema límbico y es importante ante el aprendizaje espacial y la adquisición de la memoria a corto y largo plazo. Anatómicamente, está organizado en el cuerno de amón que se divide en tres áreas: CA1, CA2 y CA3 y el giro dentado, formado por el presubiculum, el subiculum y el parasubiculum; y la corteza entorrinal (Amaral & Witter 1989, Lavenex et al, 2007, Kivisaari et al, 2013).

Es una de las regiones más sensibles a los efectos del alcohol, ya que la memoria espacial y

la de corto plazo, sufren alteraciones importantes (Ryabini, 1998). A lo largo del tiempo se han llevado a cabo diversos experimentos para analizar el daño que genera el alcohol en algunos núcleos del cerebro entre los que más se destacan se encuentra el HP, a través de la investigación de Riley y Walker se evaluó por primera vez un modelo bajo un alto consumo de alcohol el cual demostró que en periodos largos de tiempo se genera un daño en el HP en ratones (Riley & Walker, 1978). Otra investigación importante fue en 1993 donde el modelo se sometió a una administración de 18 meses aproximadamente donde se valoró que la densidad de las células granulares dentadas se redujo en un 40% CA2, CA1 en un 20% y CA3 en un 30% (Paula-Barbosa et al., 1993).

## **2.6 Estrés nitrosativo**

Las moléculas se caracterizan por tener electrones como componentes periféricos, sin embargo, la conducta de estos determina las propiedades de estas (Muriel, 2009). Cuando una molécula contiene un electrón desapareado en su orbital exterior es decir que su capa electrónica más externa contenga uno o más electrones solos en un orbital, se le denomina radical libre, los cuales tienen una gran importancia debido a su relación en la patogenia de muchas enfermedades crónico-degenerativas, ya que pueden afectar a muchas biomoléculas que tienen una gran importancia en actividades celulares fundamentales para la vida. (Korc et al, 1995, Saavedra et al, 2010)

Cuando una molécula se deriva del oxígeno se le denomina especie reactiva de oxígeno (ERO) las cuales se conforman por el radical superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso. Por el contrario, las especies reactivas de nitrógeno (ERN) derivan del óxido

nítrico, como lo son el peroxinitrito y el dióxido de nitrógeno. Además, las ERO tienen un tiempo de vida media menor a las ERN, por tanto, las moléculas que derivan del nitrógeno son más dañinas (Balazy & Nigam 2003).

Cuando se genera un proceso inflamatorio en el cuerpo, este aumenta la producción de óxido nítrico (NO) debido a la inducción de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS). La producción incrementada de NO conlleva al aumento del anión superóxido, dando como producto final al peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que es una especie altamente reactiva capaz de oxidar y nitrar componentes celulares y tisulares, tales como los residuos de tirosina de las proteínas celulares y plasmáticas, el ADN y lípidos o enzimas críticas del metabolismo intermediario. Los cambios producidos por el incremento de las ERO, son irreversibles debido a la oxidación y nitración de componentes mitocondriales (Radi et al, 2000, Hurtado et al, 2005).

Existen 3 isoformas de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS): neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS). Las nNOS Y eNOS son constitutivas y su actividad depende de la cantidad de calcio-calmodulina que tenga la célula; en cambio, la eNOS se activa con acetilcolina, bradiquinina, histamina, trombina, ADP y ATP. Mientras que iNOS es inducible por lipopolisacáridos y citocinas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral alfa TNF  $\alpha$  (Andrew & Mayer, 1999, Alderton et al, 2001). Asimismo, se ha demostrado que iNOS también se induce por mediadores inflamatorios como lipopolisacárido y TNF $\alpha$ . (Sugita et al, 2002)

La alta ingesta de EtOH, provoca que la síntesis de citocromo P450 2E1 (CYP2E1) estimula la producción de oxígeno ( $O_2$ ). La sobre activación del CYP2E1 puede generar hipermetabolismo lobular e hipoxia pericentral, la cual induce al factor nuclear KB (FNKB) que

incrementa el nivel de EROs provocando un aumento de NO y de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), trayendo como resultado el incremento de la respiración anaeróbica y acidosis que termina en la disminución de los niveles de ATP (Abernathy et al, 2010).

Las BE suelen contener una alta cantidad de azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa, Brownlee en 1995 demostró que un nivel alto de glucosa en sangre incrementa la producción de elementos de glicosilación avanzados (AGEs), los cuales se aglomeran en el tejido (Brownlee, 1995).

Ahora bien, también se ha demostrado que la combinación crónica de BE y EtOH, incrementa la peroxidación lipídica en la corteza temporal e HP de cerebros de rata (Gil et al, 2008). Así mismo esta mezcla incrementa de la inmunorreactividad a iNOS en la corteza temporal y en la región CA1 del hipocampo. El incremento de NO favorece un estado de estrés oxidativo y disfunción neuronal (Díaz y et al, 2016).

## **2.7 Neuroinflamación y la proteína TNF- $\alpha$**

La neuroinflamación se describe como un estado reactivo del sistema inmunológico perteneciente al sistema nervioso; las células que participan son la microglía y los astrocitos, (Becher et al, 2017).

En este proceso, se modifica la morfología de la glía, los tejidos se dañan por leucocitos que se trasladan desde la periferia y se observa la producción de factores inmunológicos como las citocinas o quimiocinas (Martínez-Tapia et al, 2018, Quesada et al, 2016). Asimismo, se producen ERO y ERN simultáneamente, que incrementan el estrés oxidante del microambiente, lo cual incrementa el daño neuronal y la continuidad de que sigan ocurriendo procesos inflamatorios en el organismo (Aguilera et al, 2017).

El consumo de ETOH, participa en el estrés oxidativo en las neuronas del hipocampo, al

incrementar la respuesta inflamatoria a través del aumento de citocinas proinflamatorias como IL-1  $\beta$ , TNF-  $\alpha$  e iNOS y viceversa (Tiwari & Chopra 2013, Jung et al, 2005, Díaz et al, 2016).

Díaz y colaboradores publicaron que existe un incremento de TNF-  $\alpha$  en ratas administradas con alcohol y BE; esto en la corteza temporal como en HP. Dicho evento tiene una connotación importante en el SNC, ya que TNF-  $\alpha$  participa en funciones esenciales tanto homeostáticas como fisiopatológicas (Montgomery et al, 2012, Santello et al, 2012, Beattie et al, 2002) ya que junto a sus receptores es capaz de modular procesos biológicos del cerebro, entre ellos se destaca la regulación y formación de la sinapsis, neurogénesis, regeneración y mantenimiento del SNC. En cuanto situaciones fisiopatológicas puede trabajar en problemas de inflamación, desmielinización, daño en la barrera hematoencefálica y muerte celular. (Fragoso et al, 2014)

Chao y colaboradores (1994) encontraron que TNF-  $\alpha$  puede potenciar la neurotoxicidad de glutamato y que este efecto podía bloquearse mediante la administración de antagonistas del receptor NMDA, tanto competitivos como no competitivos (Chao & Hu 1994). Nuevos estudios, mostraron una relación importante entre la actividad de la glía y la muerte neuronal inducida por TNF-  $\alpha$ , ya que este activa la vía TNFR1, e induce excitotoxicidad al incrementar la liberación de glutamato microglial desde los hemicanales de las uniones comunicantes de forma autocrina (Takeuchi et al, 2006, Olmos & Lladó 2014).

## **2.8 AM 251**

El AM 251 es un compuesto desarrollado por Sanofi Aventis, se ha utilizado en un estudio para determinar su interacción con las neuronas del HP para mejorar la memoria espacial en

ratones. Sin embargo, también inhibe el acoplamiento de agonistas del receptor CB1 en membranas de cerebro de rata, aparte en HP ha mostrado una efectividad bajo la cantidad de 2  $\mu\text{m}$  de disminuir efectos inhibidores de los endocannabinoides sobre la liberación de GABA.

## **2.9 El bloqueo de los receptores CB1, como posible modulador del consumo de bebidas energizantes y alcohólicas**

Diversos estudios clínicos, han mostrado el posible papel protector del bloqueo de los receptores CB1 con antagonistas específicos o agonistas inversos, como el AM251, pues se ha demostrado que dicho bloqueo puede tener efectos benéficos en el tratamiento de la dependencia de nicotina, asimismo, puede ofrecer beneficios en el tratamiento del alcoholismo (Beardsley et al, 2009). En este sentido, Saito y cols. (2000), mostraron que el consumo de ETOH, incrementa de manera significativa los niveles de endocannabinoides, tales como el agonista del receptor CB1 anandamida por la activación selectiva de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) específica del ácido araquidónico en células SK-N-SH humanas y en cerebro de ratón (Pérez-Rial et al 2003).

Asimismo, se ha demostrado que el uso de agonistas cannabinoides suelen aumentar el consumo de EtOH (Gallate & McGregor 1999). Sin embargo, el bloqueo de los receptores CB1 lo disminuye (Serra et al, 2001) En este caso, el uso del AM251 puede contrarrestar la actividad dopaminérgica central suprimida durante la abstinencia (Giuffrida et al, 1999) y, por tanto, reducir el estado ansiogénico.

## **2.10 Análisis de conducta.**

En neurofarmacología es esencial el uso de drogas como herramientas para mejorar alguna aversión neuronal o alguna complejidad relacionada a este órgano, y donde el objetivo de esto es

aprovechar el mecanismo de acción de estas drogas y poder desarrollar tratamientos adecuados y seguros, para que eventualmente puedan plantearse como medidas curativas o preventivas (E. Nestler et al, 2008), pero para poder hacer un correcto análisis es esencial el uso de modelos animales, este tipo de pruebas requiere de someter al roedor a la aplicación de un fármaco que pueda modificar o alterar su comportamiento como la conducta, condición motora o memoria, para que después se puedan evaluar diversos parámetros, que nos indiquen si el fármaco puede funcionar con los objetivos establecidos en cada proyecto.

Un análisis de conducta en roedores requiere de ejecutar una prueba la cual se puede clasificar como condicionada y no condicionada. Las pruebas condicionadas se basan de un entrenamiento previo que depende de la capacidad que tiene el modelo a responder al estímulo al que se expone, buscando una respuesta ante un estímulo con la respuesta específica a otro estímulo. Mientras que una prueba no condicionada depende más de la medición de conducta o fisiología del roedor ante un estímulo novedoso o estresante (Polanco, et al, 2011) en este análisis se hace uso de respuestas más naturales de la especie es por ello que también suelen ser denominados modelos etológicos.

El miedo según la real academia española se puede definir como una respuesta de angustia por un riesgo o daño real, se sabe que esta sensación es un mecanismo de defensa para nuestra supervivencia, sin embargo en el humano cuando esta respuesta se vuelve excesiva o desadaptativa, puede provocar una incapacidad para cualquier actividad social, lo que ante expertos se considera patológico, y es comúnmente denominado trastorno de ansiedad, aunque también se considera que este estado emocional puede ser percibido también por los animales.

Al poder generar estas sensaciones en el modelo es posible evaluar este trastorno en ellos para poder buscar un tratamiento, a lo largo de los años se han ejecutado diversas pruebas en

modelos animales, donde se han reportado que existen aproximadamente más de treinta en diferentes modelos animales algunos condicionados y otros no condicionados entre los más utilizados se encuentran los siguientes:

### **2.10.1 Laberinto de cruz**

En los años 60 Handley y Mithany dieron pie a la investigación con el laberinto en cruz elevado (Handley & Mithani, 1984) basados en las investigaciones de Montgomery de 1955 la cual consistía en callejones abiertos y cerrados (Montgomery, 1955). Este laberinto, busca que el modelo sea de libre exploración que es novedoso para un roedor, lo que hace que elija distintas zonas del modelo, tiene una altura de 40 cm del suelo, un par de brazos abiertos, que pueden hacer que el roedor caiga a un vacío y tiene otro par de brazos que se encuentran cerrados, los cuales permiten llegar a una zona segura o de resguardo.

Para ejecutar esta prueba se coloca al modelo en el centro de las uniones de cada brazo, se le deja explorar por cinco minutos, finalmente se realiza un conteo del número de veces que el animal entra a los brazos y el tiempo que se mantiene en cada brazo. Esto se interpreta bajo el mayor de veces que sea el porcentaje de que el modelo se encuentre en los brazos cerrados mayor será la posibilidad de que se encuentre en un estado de estrés, si se encuentra por mucho mayor tiempo en los brazos cerrados se encuentra en un estado de ansiedad, y si por el contrario el mayor porcentaje es en los brazos abiertos el efecto de lo que se está investigando sería un posible ansiolítico (Polanco *et al.*, 2011).

### **2.10.2 Nado forzado**

En 1977 Porsolt y col, describió que esta prueba consiste en colocar una rata o un ratón en

un cilindro de agua a una temperatura de 25°C, en búsqueda que el roedor no pueda pararse en el fondo lo cual lo obligara a nadar para poder respirar. El tiempo en el que se ejecuta esta prueba requiere de dos días, el primer día se realiza una sesión de 15 minutos y el segundo día una sesión de 5 minutos al día siguiente a la misma hora. Para el registro de datos de esta evaluación es necesario anotar los tiempos que el roedor pasa realizando 4 diferentes conductas, las cuales son el nado, escalamiento en las paredes del cilindro, buceo e inmovilidad. Si durante este tiempo el roedor se encuentra inmóvil se considera que él sujeto se encuentra en un estado de “desesperanza” porque el animal ha reconocido que no puede escapar.

### **6.1 Enterramiento defensivo**

El enterramiento defensivo fue nombrado en honor Pinel y Treit, esta prueba se basa en la naturaleza de los roedores de mover objetos sueltos en un intento de cubrirlos con otros (Pinel & Treit, 1978) este modelo suele utilizarse para evaluar ansiedad. Esta prueba actualmente consta en utilizar una caja con el piso cubierto de aserrín estéril, dentro de este suele contener 20 canicas aproximadamente, donde se coloca al roedor, y se graba durante 15 minutos para poder hacer un conteo del número de canicas que el ratón entierra las canicas (Ichimaru, et al, 1995). Lo que hace que entre más canicas entierre, mayor será el grado de ansiedad que presente el modelo con objetos extraños.

### **6.2 Campo abierto**

La prueba de campo abierto también conocido en inglés como Open Fiel fue descrita por primera vez por Hall en 1934, la cual busca la tendencia que puede tener el modelo de explorar un nuevo entorno, es por ello por lo que se fundamenta en la deambulaci3n del modelo y es por eso que se clasifica como respuesta incondicionada. Este modelo suele ser muy utilizado para evaluar la reacci3n del sujeto ante una situaci3n estresante (G3mez C. et al 2002), radica en colocar al roedor en una caja que simula un ambiente abierto que permita evaluar su conducta dentro de 3l, la caja tiene trazado l3neas que dividen cada regi3n de igual tama1o, aproximadamente se divide en 5 por 5 regiones del mismo tama1o o tambi3n en 3 por 3 regiones (Da Silva et al 2011). Durante 10 o 15 minutos (Van Dam et al, 2013) se evalúa el comportamiento del roedor, dentro de la caja donde se hace el conteo del númerode veces que atraviesa los cuadrantes, la trayectoria, los cuadros visitados, los acicalamientos, el númerode erguidos, y giros completos (Walsh & Cummins, 1976, Quillfeldt, 2016, Seibenhener & Wooten, 2015). Los erguidos son las veces que animal se apoya en sus patas traseras de manera vertical, este se identifica como una característica exploratoria que en la prueba se usa para poder medir la ansiedad que viven dentro del campo abierto (Seibenhener & Wooten, et al, 2015), cuando el roedor gira se interpreta cuando est3 rota en su propio eje, y la distancia recorrida suele referirse en base al tama1o del cuadrante que fue trazado en la caja que permite medir la distancia del desplazamiento (Zurn et 2005)

### **3 Planteamiento del problema**

El consumo de alcohol, bebidas energizantes y su combinaci3n ha demostrado su popularidad en antros y bares lo que ha permitido un mayor alcance a su consumo por la búsqueda de mejorar su sabor o aumentar el estado de alerta. Sin embargo, diferentes reportes de la literatura han

demostrado que existe una mayor susceptibilidad de padecer ansiedad bajo un consumo excesivo. En la actualidad se ha señalado que la combinación de estas bebidas también beneficia respuestas que pueden afectar al organismo como el estrés nitrosativo, el cual se pueden relacionar ante la generación de daño celular que puede perpetuar el proceso inflamatorio del cerebro a través de diferentes mecanismos que puede orillar en la pérdida de funciones como la memoria a largo plazo y una disminución de la conducta motora.

#### **4 Justificación**

El consumo excesivo y crónico de bebidas alcohólicas y energéticas, se ha mostrado como un problema para la sociedad en la actualidad, donde se destaca a la población adolescente y adulto-joven, ya que se ha normalizado su consumo habitual o diario, se sabe que las bebidas alcohólicas pueden ocasionar daños a corto, mediano y largo plazo, de problemas de salud, económicos, sociales o físicos. Las bebidas energizantes también generan un daño al organismo sobre todo a deportistas, estudiantes o trabajadores de jornadas nocturnas, que buscan mejorar su rendimiento, sin embargo, este sobreconsumo ha desencadenado daños a su organismo con graves consecuencias hasta el punto de poder ser letales, la literatura reporta el auge ante la combinación de estas bebidas demostrando que al combinarlas puede potenciar el daño que generan las mismas de forma individual.

En contraste en los últimos años diversos investigadores se han dado a la tarea de proponer modelos que puedan controlar este daño, reportando que el uso de agonistas canabinoides puede incrementar la afectación que provocan estas bebidas mientras que por otro la administración de antagonistas se ha señalado como una posible inhibición de estas reacciones. Existen investigaciones modelos murinos que han utilizado antagonistas como, no obstante, la

investigación con el uso del antagonista AM 251 es deficiente, por esta razón se pretende evaluar y comprender el efecto estas bebidas solas, en combinación y con la administración de un antagonista, bajo el uso de un grupo control al cual se le administrara solución salina. De tal manera, la pregunta científica de este trabajo es la siguiente:

¿La administración del antagonista de los receptores CB1 en combinación de alcohol y bebidas energizantes mejora la disminución de ansiedad, estrés oxidativo y la inflamación en ratas Wistar?

## **5 Hipótesis**

El bloqueo de los receptores CB1, disminuye la ansiedad, el estrés oxidativo y la inflamación en ratas administradas con alcohol, bebidas energizantes y su combinación.

## **6 Objetivos**

### **6.10 Objetivo general**

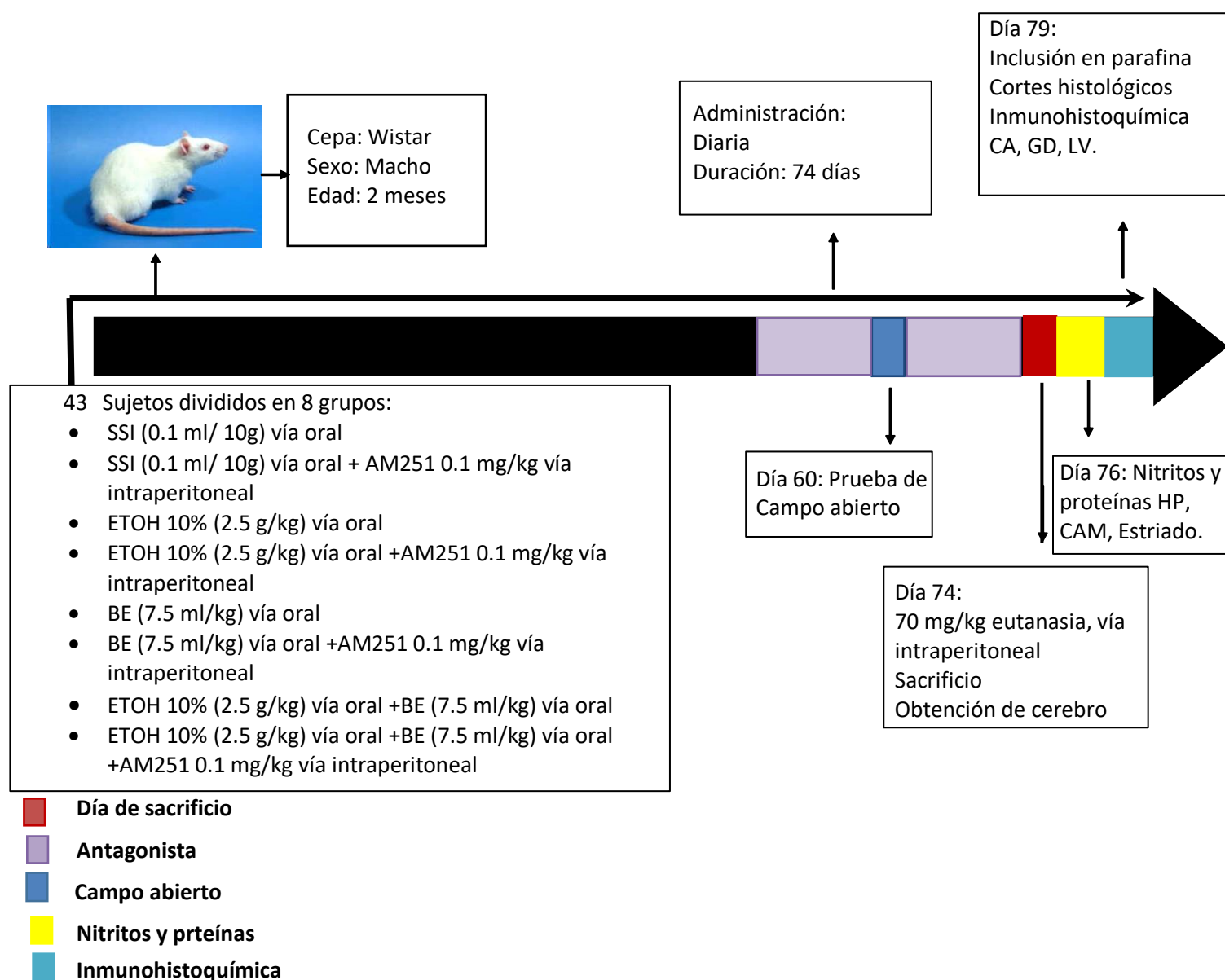
Estudiar el efecto del bloqueo de los receptores CB1 sobre la conducta ansiosa, el estrés oxidativo y la inflamación en ratas administradas con alcohol, bebidas energizantes y su combinación.

### **6.11 Objetivos particulares.**

- Evaluar la conducta ansiosa en ratas macho de la cepa Wistar, después de consumir alcohol, bebidas energizantes y/o su combinación.
- Analizar el efecto del bloqueo de los receptores CB1, sobre la producción de nitritos en el estriado, corteza prefrontal e hipocampo de ratas administradas con alcohol, bebidas energizantes y su combinación.
- Medir el proceso inflamatorio en el estriado, corteza prefrontal e hipocampo, después de bloquear a los receptores CB1 en ratas administradas con alcohol, bebidas energizantes y su combinación.

## 7 Metodología

### 5.1 Diagrama general de trabajo



## 5.2 Sujetos de experimentación

Se utilizaron 46 ratas (*Rattus norvegicus*) macho de 2 meses de edad de la cepa Wistar, con un peso entre 150-200 g provenientes del bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales fueron albergados en grupos de 4 a 6 individuos en condiciones controladas en el bioterio, a una temperatura de 24°C, con un 50% de humedad y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h / 12 h. Asimismo, el cuidado, alimentación y mantenimiento de los modelos estuvo a cargo del personal del mismo bioterio.

Cada procedimiento de manejo y disección de los animales se realizó bajo los lineamientos establecidos en la norma oficial (NOM-062-ZOO 1999) sobre el manejo y el uso de animales de laboratorio, además se obtuvo la acreditación en el “manejo y vías de administración en ratas de laboratorio”, expedido por el bioterio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Los animales fueron separados conforme a su peso para formar 8 grupos:

- SSI sin tratamiento vía oral
- SSI con tratamiento vía oral
- Alcohol sin tratamiento vía oral
- Alcohol con tratamiento vía oral
- Bebida energizante sin tratamiento vía oral
- Bebida energizante con tratamiento vía oral
- Bebidas combinadas (EtOH+BE) sin tratamiento vía oral
- Bebidas combinadas (EtOH+BE) con tratamiento vía oral

La bebida seleccionada para esta investigación fue de la marca “Red Bull” el cual se administró sin alguna dilución, en diferencia al EtOH este se disolvió en una dilución 1:10 con SSI

NaCl al (0.9%). Las bebidas fueron administradas vía oral con ayuda de una cánula de acero inoxidable, donde el tiempo de administración y las dosis de cada bebida fueron a partir de los estudios reportados en la literatura (Díaz et al, 2016) que se presentan a continuación:

- Bebida energizante (7.5 mg/Kg)
- Alcohol (2.5 g/kg)
- SSI = 0.1 ml/10 g

Después de administrar durante 60 días el ETO, la BE y su combinación, se procedió a la administración intraperitoneal del agonista inverso de los receptores CB1, denominado AM251, el cual se disolvió en SSI y dimetilsulfóxido (DMSO) al 2%. Para este momento, las ratas contaban con un peso de entre 250y 400 g.

### **5.3 Estudios conductuales**

Las pruebas conductuales se realizaron en el Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción de la BUAP en un cuarto aislado de sonido.

#### **5.8.1 Campo abierto**

En el día 60 de tratamiento, se administraron a las ratas con sus respectivos tratamientos, transcurrida una hora del procedimiento, se evaluó la conducta motora del animal a través de la prueba denominada campo abierto que se llevó a cabo en una caja de madera con medidas de 60 cm de ancho por 60 cm de largo con paredes oscuras y 60 cm de largo, dividida en nueve cuadros

marcados de 20 cm de ancho por 20 cm de largo cada uno. La cual consiste en situar al roedor en el cuadro central y grabarlo durante 10 minutos, para poder cuantificar los cuadros visitados y los erguidos. Al finalizar la prueba de cada rata, se limpió la caja con alcohol al 70% para que ningún olor o sustancia perturbara la conducta de la siguiente rata.

### **5.5. Obtención y procesamiento de tejido para técnicas histológicas.**

Posterior a la prueba de campo abierto, se administró una sobredosis de pentobarbital sódico (70 mg/kg) de acuerdo con los criterios de la NOM-064-ZOO-2000. Cuando la rata alcanzó un plano profundo de sedación, se realizó una perfusión intracardiaca con SSI al 0.9 %. Terminado esto, se extrajo el cerebro, y se colocó en paraformaldehído al 4 % en buffer salino de fosfatos (PBS).

Una vez obtenidos todos los cerebros de los grupos marcados, se cortaron con ayuda de un bisturí realizando 2 cortes longitudinales en el cerebro (en un solo movimiento evitando dañar el tejido) para obtener tres partes iguales donde cada una de las secciones obtenidas, se colocó en un casete diferente y rotulado. Las secciones se deshidrataron de la siguiente manera: se colocaron durante una hora en agua destilada, y posteriormente en porcentajes crecientes de etanol (70, 80, 96 % cada uno durante una hora), mientras que al llegar al 100% se dejaron reposar durante toda la noche. Al día siguiente, se realizó la aclaración de los tejidos; para esto, se elaboró con soluciones de etanol al 100% - xilol 50-50% y xilol durante una hora cada uno. Para la infiltración, los cerebros se sumergieron en parafina líquida a 48°C durante 1 hora.

Una vez transcurrido el tiempo dentro del recipiente con parafina, los casetes fueron colocados en los moldes en dirección a facilitar la localización de los núcleos hipocampo, corteza

y estriado. Se agregó parafina líquida al molde del tejido hasta el límite de su capacidad, evitando que el tejido se mueva, una vez que el tejido se ubicó en la posición ideal se colocó la tapa del casete sobre el molde y se añadió más parafina, y se dejaron enfriar a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, una vez cerciorado que los bloques se encontraban uniformes se desmontaban con precaución del molde. Al culminar la inclusión de cada casete, cada uno fue cortado en un microtomo (Leica) para obtener cortes sagitales con un espesor de  $5\ \mu\text{m}$ ; posteriormente, fueron montados en laminillas gelatinizadas al 3 %.

## **5.6. Técnicas bioquímicas**

### **5.6.1 Inmunohistoquímica para inflamación**

Para medir el proceso inflamatorio, se determinó por medio de inmunohistoquímica acoplada a fluorescencia, la presencia de la proteína TNF- $\alpha$ . Los cortes se desparafinaron con xilol y rehidrataron con alcohol en concentraciones decrecientes. Una vez culminados esos dos procesos las laminillas se sometieron a un lavado en PBS 1X al 5%, posteriormente, se dibujó con parafina una barrera alrededor del tejido, para poder añadir  $100\ \mu\text{L}$  de albúmina sérica de bovino (BSA) libre de IgG al 3%, durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Culminado el tiempo, se realizaron más lavados con PBS 1X cinco veces consecutivas y se añadió Tritón X-100 al 0.2 % a un pH de 7.4 durante 10 minutos.

Posterior a esto se realizaron nuevamente lavados con PBS 1X cinco veces consecutivas y se añadió el anticuerpo primario anti- TNF- $\alpha$  (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:100 en BSA por 24 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Una vez terminada la incubación, los cortes se lavaron para después ser incubados

con el anticuerpo secundario Alexa 488 (Jackson Immuno) a una dilución de 1:200 en albúmina a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 horas. Nuevamente, las laminillas se lavaron 5 veces con PBS y finalmente se montaron con Vecta-Shield conjugado con DAPI.

Para analizar y observar resultados de inmunorreactividad en hipocampo, estriado, y corteza se realizó a una magnificación de 63X, por medio de un Microscopio Confocal NIKON C2 plus con software de captura NISS- Elements, perteneciente al Instituto de Fisiología de la BUAP. Las fotografías se tomaron con el apoyo del biólogo José Luis Córdova.

### **5.6.2 Cuantificación de nitritos por la técnica de Griess**

El día del sacrificio, se obtuvo el hipocampo, estriado y corteza prefrontal de las ratas de estudio y estos fueron almacenados en tubos y congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para la cuantificación de nitritos, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de PBS 1 X a pH a 7.4 al tejido y se homogeneizaron durante 1 minuto en un espacio frío, posteriormente, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  más. Estas muestras se centrifugaron en una centrífuga refrigerada a 12000 rpm durante media hora, culminado el tiempo, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

Primero, se realizó una curva de calibración de  $\text{NANO}_2$  con una concentración de 0.1  $\mu\text{L}$  y un aforo de 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Para las muestras se llevó a cabo la reacción agregando 50  $\mu\text{l}$  de muestra (sobrenadante), 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de reactivo de Griess en oscuridad, dejando reposar durante media hora. La absorbancia se midió con un filtro de 540 nm en un espectrofotómetro Multiskan-Thermo Labsystems.

### **5.6.3 Proteínas de totales de Bradford**

La cuantificación de proteínas totales se determinó por el método de Bradford. Se realizó, una curva de calibración con BSA en una concentración de 0 a 7  $\mu\text{L}$  por pozo aforando a 10  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Para las muestras se llevó a cabo la reacción agregando 10  $\mu\text{l}$  de muestra y 200  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford, dejando reposar 10 minutos en oscuridad. La absorbancia se midió con un filtro de 620 nm en un espectrofotómetro Multiskan-Thermo Labsystems, una vez obtenidos los valores la concentración de proteínas fue obtenida a través de la curva de calibración a partir de la densidad óptica de la muestra con la curva de calibración de la BSA.

### **5.6.4 Análisis estadístico**

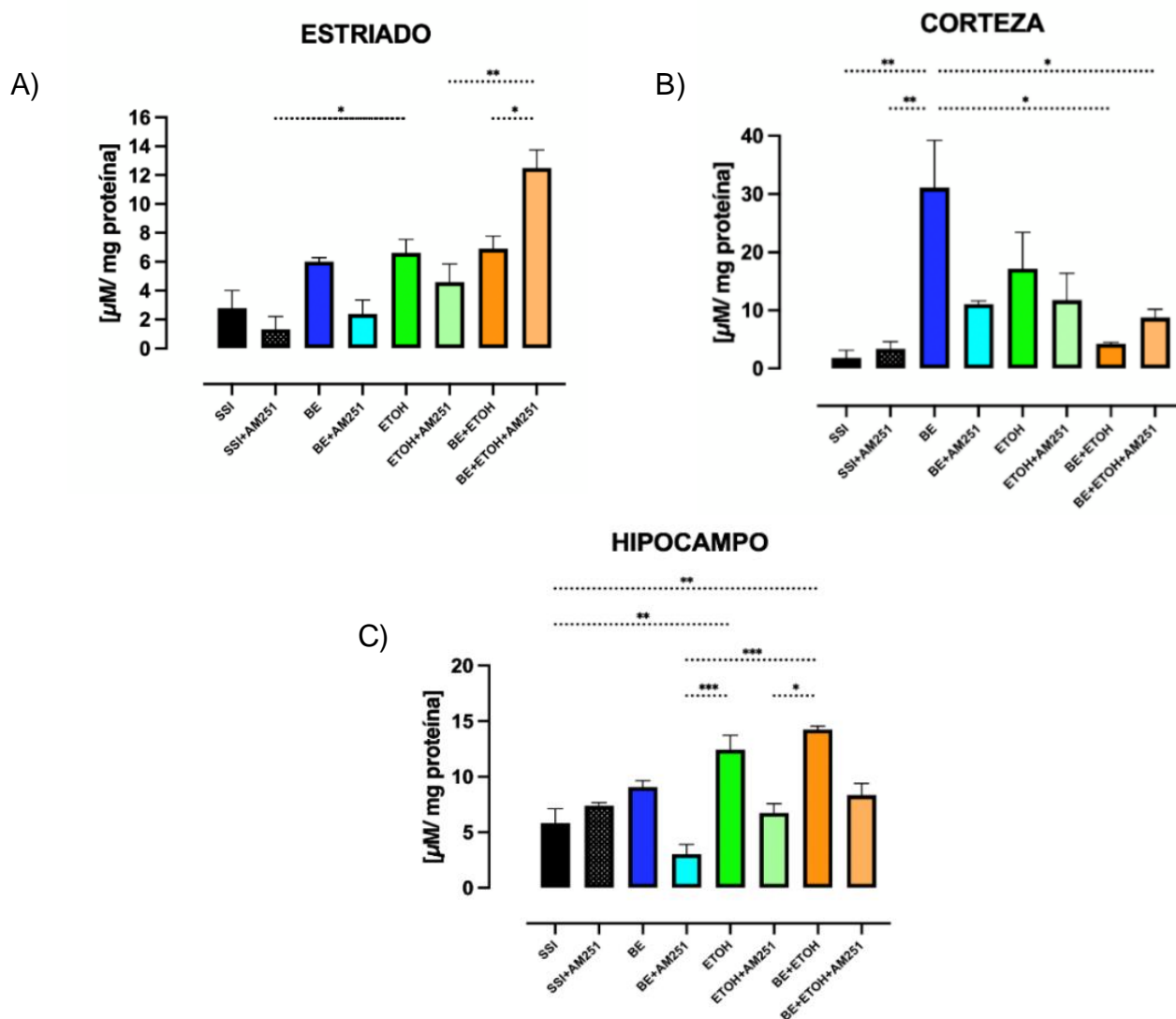
Con el uso del software GraphPad Prism 10.1, se evaluaron los datos experimentales de cada prueba, estos fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido de una prueba de post-test Bonferroni. Donde en cada prueba se consideró que  $p < 0.05$  era significativo.

## **6 Resultados**

### **6.1 Efecto de la administración de la combinación de BE con EtOH y AM 251 en la disminución de niveles de nitritos.**

El ON ha sido caracterizado en la actualidad en el desarrollo de dependencia física, en el síndrome de abstinencia, de diferencias sustancias adictivas y también se encuentra implicado en efectos neurotóxicos. Es por esta razón que se evaluaron los niveles de nitritos empleando de manera

indirecta de medida a la producción de ON, en hipocampo, estriado y corteza evidenciando una disminución de nitritos en los grupos administrados con el fármaco AM 251, en los tres núcleos, los grupos que fueron administrados con BE y EtOH separadas y también bajo la combinación de ambas bebidas que podemos ver en las figuras 1A, 1B y 1 C.



**Figura 1.** ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni de nitritos A) estriado y B)

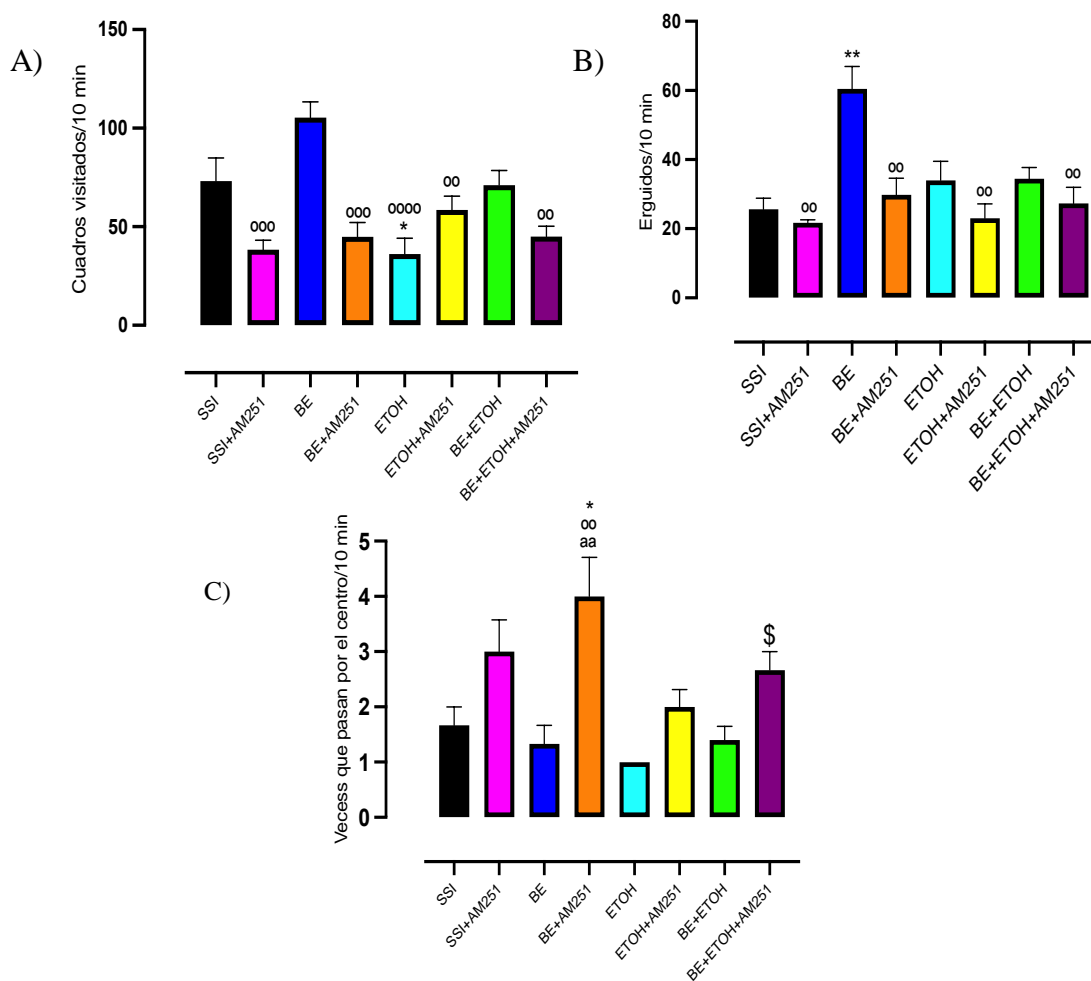
Corteza.

## **6.2 Efecto de la administración de la combinación de bebidas energizantes con alcohol y AM 251 sobre la conducta de campo abierto.**

Los modelos de experimentación fueron sometidos a la prueba de campo abierto para la evaluación de ansiedad figura 1, se realizaron después de haber administrado 7 días el antagonista en el día 60 de la administración continua con SSI, BE y EtOH solas y combinadas. Con esta prueba se cuantificó el tiempo de locomoción de los sujetos durante 10 minutos, en la figura 3A se muestran los resultados del tiempo de cuadros visitados donde se puede observar que el grupo BE presenta una diferencia significativa respecto a los demás grupos al recorrer más cuadros, así mismo se puede destacar que el antagonista si genero un efecto importante con respecto a los cuadros visitados, ya que en el grupo BE + Anta se observa una disminución al número de cuadros visitados, mostrando que los receptores CB1 están produciendo una acción importante sobre la conducta motora del modelo animal, los resultados que se muestran en la figura 3B representa el número de erguidos que realizo el animal, los grupos administrados con el antagonista muestran una diferencia a los que no fueron administrados demostrando que el bloqueo de los receptores CB1 demuestra una disminución de la conducta ansiosa ya que el roedor administrado con el antagonista no buscaba salir de la caja, en la figura 3C se analizan las veces que paso por el centro, donde se presenta una diferencia significativa con relación al grupo administrado con el antagonista mostrando una disminución del estado ansiogénico de la rata en diferencia a los grupos administrados con las bebidas.



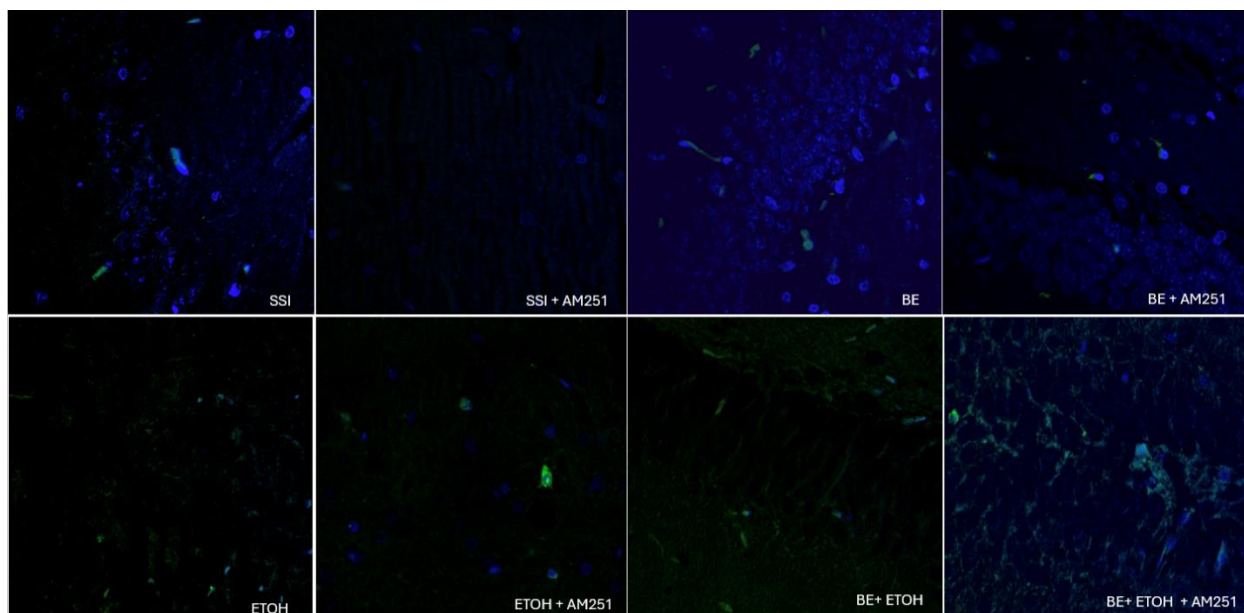
**Figura 2. Campo abierto** Realizada en una de 60 cm de ancho por 60 cm de largo con paredes oscuras y 60 cm de largo, dividida en nueve cuadros marcados de 20 cm de ancho por 20 cm de largo cada uno durante 10 min.



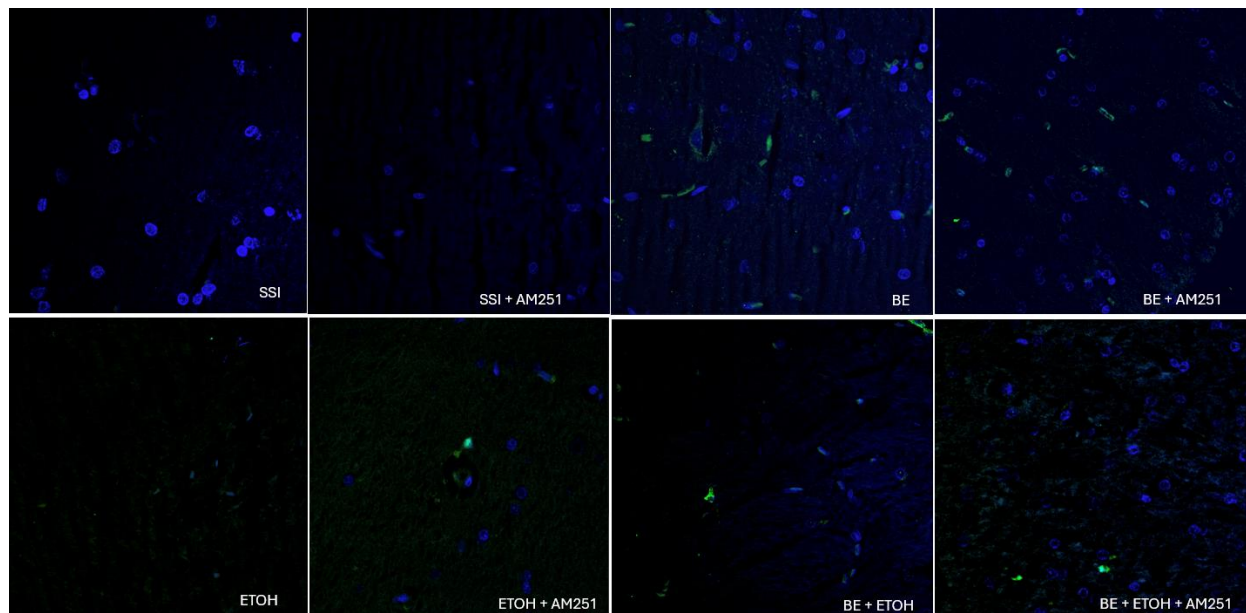
**Imagen 3. Efecto del AM 251 sobre la ansiedad de un modelo administrado con BE y EtoH.** A) Cuadros visitados B) Erguidos C) Centros visitados ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni.

### 6.3 EL TRATAMIENTO CON AM 251 DISMINUYE LA INFLAMACIÓN EN CEREBRO.

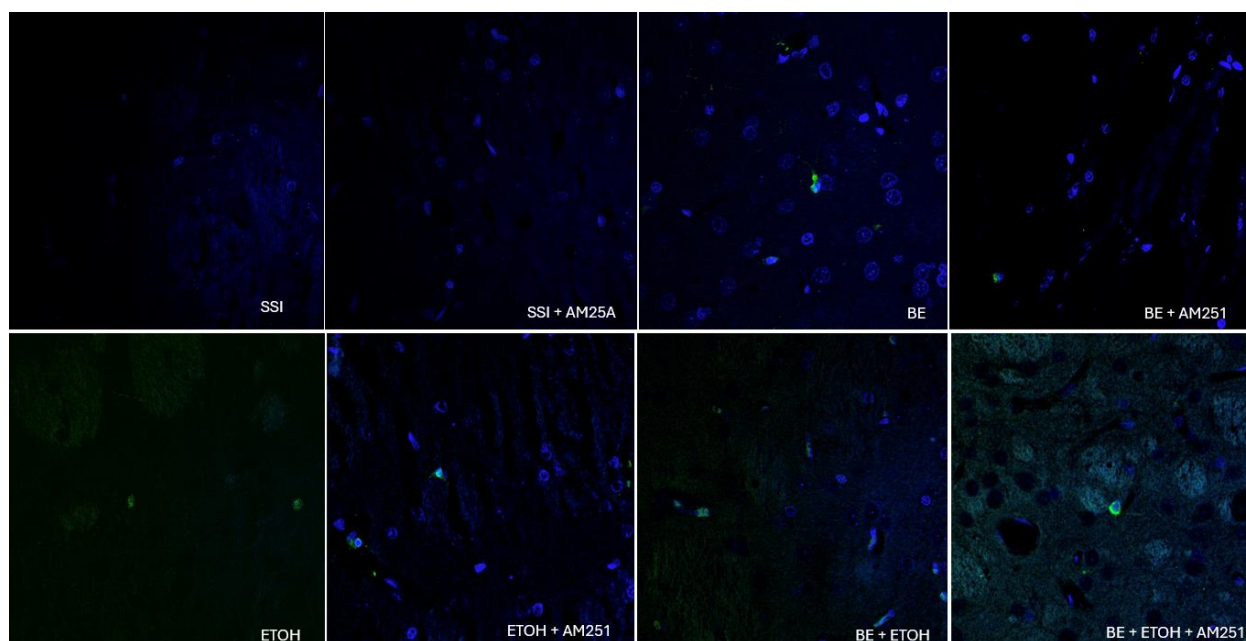
Al evaluar la inmunohistoquímica por fluorescencia de  $TNF\alpha$  se observó un incremento significativo en la inmunorreactividad positiva de  $TNF\alpha$  que se puede observar en la figura 5. Lo que demostraría que existe una actividad de citocinas proinflamatorias no obstante los grupos que fueron administrados con el antagonista no muestran una alta reactividad positiva a esta citocina figura 4, a diferencia de los grupos que fueron administrados con las bebidas solas donde si se ven marcas ligeras y aumentadas en los grupos donde las bebidas fueron combinadas.



**Figura 4.** Fotomicrografías correspondientes a la inmunohistoquímica para  $TNF\alpha$  en las regiones de Giro Dentado (GD), de hipocampo donde se observa la presencia de la disminución de la inmunorreactividad en los grupos administrados con AM 251, las marcas verdes representan inmunorreactividad a  $TNF\alpha$  y las marcas de color azul a DAPI. Tomadas con un objetivo de 40X

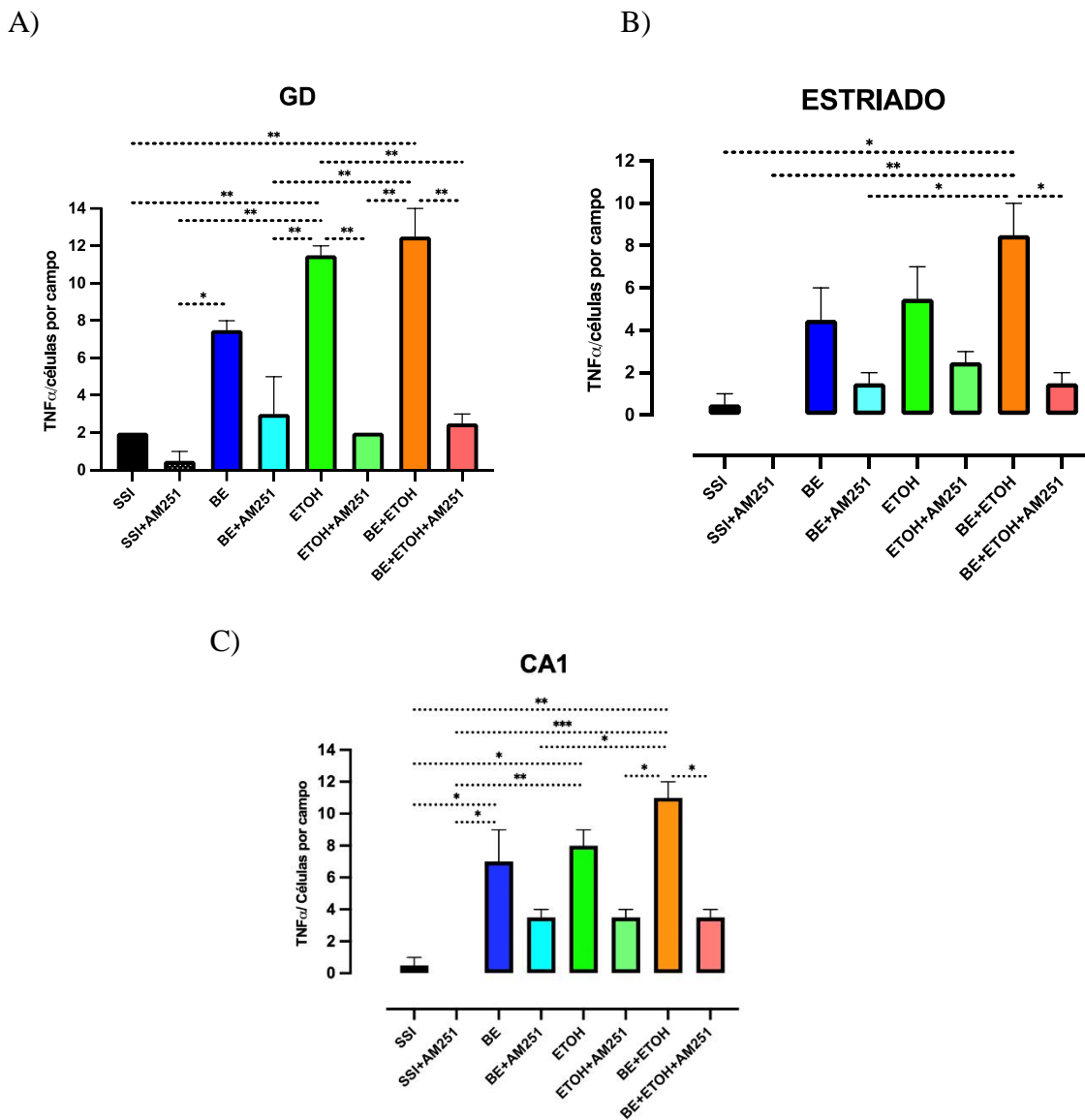


**Figura 5. Análisis morfológico del número de orden dendrítico CPFm III.** Fotomicrografías correspondientes a la inmunohistoquímica para  $TNF\alpha$  en las regiones de Cuerno de Amón (CA) de hipocampo donde se observa la presencia de una mayor inmunorreactividad en el grupo BE+EtOH las marcas verdes representan inmunorreactividad a  $TNF\alpha$  y las marcas de color azul a DAPI. Tomadas con un objetivo de 40X



**Figura 6. Análisis morfológico del número de orden dendrítico CPFm III.** Fotomicrografías correspondientes a la inmunohistoquímica para  $TNF\alpha$  en las regiones de Ventrículo lateral (LV) de estriado y corteza, donde se observa la presencia de una mayor inmunorreactividad en el grupo BE+EtOH las marcas verdes representan inmunorreactividad a  $TNF\alpha$  y las marcas de color azul a DAPI. Tomadas con un objetivo de 40X

Para comprobar que el efecto de antagonizar al R CB1, se observó que su administración disminuye la expresión de TNF- $\alpha$  por la inactivación del receptor CB1. El grafico A y C muestra que el efecto de inflamación del TNF- $\alpha$  disminuye significativamente mediante el bloqueo del receptor CB1 por AM-251, mientras que en el B si tenemos una diferencia pero es menor.



**Imagen 2. Efecto del AM 251 sobre la inflamación de un modelo administrado con BE y EtoH.** A) Giro dentado B) Ventrículo lateral (LV) C) Cuerno de amón en una ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Bonferroni.

## 7 Discusión de resultados

Existen múltiples factores que generan a un consumidor de bebidas alcohólicas y energizantes ya sea sociales, deportivos y económicos, lo que ha fomentado daños en la salud, de jóvenes y adultos. Esto ha conllevado a la comunidad científica a buscar un tratamiento eficiente debido a la prevalencia de enfermedades cardiovasculares, daño neuronal y hepático los cuales han sido asociados al consumo de estas bebidas. (García-Villacorta et al, 2019, Glasinovic, 2014, Ahumada-Cortez et al, 2017). Hoy en día se han desarrollado varios tratamientos para combatir el alcoholismo y las afecciones que lo componen, a través de campañas de prevención en las cuales se incluye a las bebidas energizantes debido a su mal consumo en deportistas que los ha llevado a tener problemas cardiacos o hasta incluso resultados letales, otros recursos que se utilizan para tratar el alcoholismo suelen ser las técnicas motivacionales que buscan la desintoxicación del afectado, sin embargo cuando el consumo es crónico estos programas suelen generar un cuadro de abstinencia en los cuales algunos centros de ayuda recurren al uso de sustancias en función de las características y necesidades del paciente, para poder estar preparados o tener una precaución de un cuadro de abstinencia, suelen recurrir esencialmente a la administración de benzodiazepinas (Haro, G 2003), sin embargo también han hecho uso del clometiazol aunque, también se ha recurrido a fármacos como la gabapentina o el topiramato, como coadyuvantes de la desintoxicación. (Ochoa M. et al 2009).

Hoy en día se han desarrollado varios tratamientos para combatir el alcoholismo y las afecciones que lo componen, a través de campañas de prevención en las cuales se incluye a las bebidas energizantes debido a su mal consumo en deportistas que los ha llevado a tener problemas cardiacos o hasta incluso resultados letales, otros recursos que se utilizan para tratar el alcoholismo

suelen ser las técnicas motivacionales que buscan la desintoxicación del afectado. (Haro, G 2003)

Diversos estudios bioquímicos han permitido evidenciar que los endocannabinoides tienen influencia sobre los efectos y del abuso del alcohol, uno de los más característicos es Rimonabant o SR 141716 que ha mostrado tener potencial para el tratamiento del ansia, en 1997 Arnone y compañeros demostró que puede reducir la ingestión de etanol en ratones C57BL/6 los cuales fueron expuestos a cuatro sesiones de 6 h bajo un experimento de dos botellas donde las ratas tenían la opción de beber en botellas con alcohol o con agua (Arnone 1997) Sin embargo la prueba de elección de botellas a pesar de ser relacionada a ser una prueba buena debido a su relación de la elección voluntaria del roedor a la elección humana de elegir el acceso a la bebida, esta prueba puede tener inconvenientes como la pérdida del control en el consumo, sobre todo si se encuentra más de una rata en la caja ya que a pesar de que la botella de alcohol este vacía no se sabe si el consumo fue por parte de una o las dos ratas, y en cuanto al agua la misma situación, es por eso que el presente estudio busco generar un modelo de alcoholismo y consumo de bebidas energéticas bajo la administración con dosis a partir de su peso, donde la administración se llevó a cabo con ayuda de una cánula de acero para poder asegurar que la rata consumido estas bebidas, el cual es efectivo gracias a que las ratas no poseen vesícula biliar y no pueden vomitar (Mamani, 2020)

La prueba de campo abierto se seleccionó debido a las ventajas que presenta ante otras pruebas que comprometen la integridad de los animales de laboratorio, esta demostró que la locomoción incrementa en los animales que fueron tratados con BE y BE +EtOH, a diferencia de los grupos administrados con el antagonista que disminuyó en el número de cuadros visitados, mientras que hubo una menor actividad motora con base al número de erguidos realizados por el grupo que fue administrado con BE+ AM 251 demostrando una disminución en el estado ansiogénico del modelo, este resultado puede ser relacionado a la distribución cerebral de los

endocannabinoides y el receptor CB1 porque implementa algunas funciones modulares como la actividad de neurotransmisores y la regulación del comportamiento motor el cual interactúa con dopamina y GABA (Atance & Ruiz 2000).

Es por esta interacción que puede relacionar con el estado ansiogénico de los grupos administrados sin el antagonista a diferencia de la disminución al administrarlo ya que la ansiedad se ha visto involucrada bajo la desregularización de estos neurotransmisores, ya que se ha reportado que el etanol es un reforzador positivo relacionado en la activación de la función dopaminérgica, donde el etanol aumenta la tasa de disparo de neuronas dopaminérgicas en el área ventral tegmental (Gessa, et al 1985) así mismo la exposición al EtOH provoca cambios en la composición y función de la subunidad GABA<sub>A</sub> del cerebro de los roedores, lo que desempeña un papel crucial en los síntomas de abstinencia y la dependencia del EtOH. Diversos autores han relacionado que existe un aumento de la liberación de DA, con la potenciación de la transmisión de glutamato y la disminución de la actividad inhibitoria de GABA. Ahora bien, se sabe que la actividad de señalización del sistema endocanabinoide, puede medirse en los receptores CB1 de una neurona presináptica, que puede bloquear la liberación de glutamato o GABA (Pava & Woodward 2012, Ridley et al 2013) lo que sería la razón por la cual DA aumenta favoreciendo que bajo el consumo crónico de EtOH desencadene la estimulación de receptores opiáceos ( $\mu$  y  $\delta$ ), generando una liberación elevada de dopamina, que provoca estimulación excesiva de los receptores dopaminérgicos del tipo 2 (D2) estimulando la necesidad del consumo descontrolado de etanol favoreciendo el estado ansiogénico del modelo (Wise & Borazth, 1987, Samson & Harris 1992, Finn, & Crabbe, 1997, Vetreno 2011), en este estudio al antagonizar al CB1 impedimos esta acción permitiendo la liberación de GABA, el cual inhibe la secreción de dopamina (Bogusz, 2008).

En 1980, se introdujo un conjunto de biomarcadores para medir niveles de ROS y NOS los cuales permiten realizar la medición de estrés oxidativo o nitrosativo, (Mañón, et al. 2016). En esta investigación se pudo evidenciar un aumento de nitritos en los grupos que fueron administrados con ambas bebidas ya sea combinadas o separadas. Esto se puede deber principalmente a el metabolismo oxidativo del EtOH ya que libera pequeñas cantidades de anión superóxido pero solo en condiciones fisiológicas, pueden ser reducidas por enzimas y sustancias antioxidantes. Cuando las dosis superan este estado fisiológico, se produce la activación de CYP2E1 generando grandes cantidades de anión superóxido. Pero como se necesita reducir estas moléculas y se encuentran en altas cantidades se genera una sobre activación del complejo CYP2E1 pero en consecuencia este consume altas tasas de oxígeno al generar un hipermetabolismo lobular e hipoxia pericentral. Lo que induce al factor nuclear kappa B (NFkB), que incrementa la síntesis de ERO y aumento de la producción de ON en búsqueda de compensar la hipoxia. (Soto, M. & Miranda, 2020). Así mismo este aumento puede deberse a que se ha descrito que pacientes con alcoholismo crónico índice gliosis y neuroinflamación debido a la activación del sistema innato con ayuda de los TLR 4 de las células gliales. (Pla Rodríguez, 2014). Cuando el organismo se encuentra ante una prominente gliosis, se ha descrito que en el SNC ocurre un incremento en el número de células gliales que expresan NOSi (Hunot et al., 2001). Así mismos como se mencionó anteriormente en presencia de DA NO se sintetiza en altas cantidades, este activa selectivamente las ERK-1/2 en células gliales, el cual tiene un papel importante en la producción de TNF-  $\alpha$  que es una citoquina inducida en procesos inflamatorios por esta razón se realizaron inmunohistoquímicas para analizar la cantidad de estas citoquinas en nuestros tejidos y si existió una disminución, en este análisis se observó que el grupo que recibió alcohol y BE mostró una mayor inmunorreactividad a TNF $\alpha$  tanto en la corteza como en el hipocampo en comparación con el alcohol o la BE sola, esto podría

deberse al aumento de liberación de glutamato ya que las metilxantinas del BE aumentan la liberación de glutamato por la acción sobre los receptores A2 y también a que el consumo de ETOH, participa en el estrés oxidativo en las neuronas del hipocampo, que potencia la actividad inflamatoria a través del aumento de TNF-  $\alpha$  y otras citocinas (Tiwari & Chopra 2013, Díaz et al, 2016). Sin embargo, al administrar el antagonista la presencia de esta citoquina inflamatoria disminuyo significativamente lo cual sugiere que dicho efecto efectivamente requiere de la activación del receptor CB1, ya que la dopamina tiene un papel crucial para su activación.

Aunque cabe resaltar que todos los grupos que fueron administrados con EtOH no mostraron una correcta tinción de núcleos, los cuales fueron teñidos con la molécula sintética 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que es uno de los marcadores específicos del ADN más populares que se une al ADN bicatenario (Beckman Coulter, 2000), cuando la molécula de DAPI se une al ADN, su fluorescencia azul se incrementa notablemente, no obstante en los grupos con EtOH esta tinción no se logra percibir como los demás grupos, a excepción de los que fueron administrados con el antagonista puesto que a estos grupos si se pueden visualizar los núcleos, esto puede estar relacionado en gran parte al EtOH que es ingerido y que se metaboliza a acetaldehído en el hígado mediante la alcohol deshidrogenasa citosólica (ADH), el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) y la catalasa de los peroxisomas. Posteriormente, el acetaldehído es oxidado a acetato gracias a la aldehído deshidrogenasa (ALDH). Cuando ADH metaboliza a EtOH, esta enzima utiliza nicotinamida adenina dinucleótido (NAD + ) como cofactor, que provoca una reducción de NAD + (NADH) y acetaldehído que se caracteriza por ser reactivo y tóxico y este compuesto a través de uniones covalentes a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos busca generar aductos derivados del acetaldehído que pueden dañar la estructura y función de estas macromoléculas ( Mauch et al.

1986)

En 2018 Garaycochea y colaboradores trabajaron con un modelo de ratones que carecía de la enzima ALDH, que los hacía incapaces de metabolizar el acetaldehído en acetato su investigación demostró que la acumulación de acetaldehído producía inestabilidad en el genoma y roturas en la doble cadena del ADN. Y, aunque la presencia de daños en el ADN estimulaba a los mecanismos de reparación de la célula, también daban lugar a reorganizaciones cromosómicas (Garaycochea et al. 2018) y en base a esto podemos inferir que esta podría ser la razón por la cual no quela de manera correcta el DAPI. Ahora bien, la ALDH clase 2 es una enzima que metaboliza eficientemente el acetaldehído producido durante el metabolismo del EtOH (Soto, M. & Miranda, 2020).

Diversos autores han evidenciado la ALDH-2 que puede ser inhibida por ERO y ERN debido a que pueden generar una modificación de la cisteína en su sitio catalítico y sobre todo porque el sitio activo de la ALDH-2 también puede tener cambios por mecanismos dependientes e independientes de ON (Beg et al, 2016), el cual se puede relacionar a los datos que se obtuvieron en nitritos, se tuvieron cantidades significativas en los núcleos a evaluar.

## 8 Conclusión

1. La administración de un antagonista del receptor CB1 a dosis 0.1 mg/kg muestra una disminución de la conducta ansiosa y el estrés nitrosativo en la evaluación en las pruebas conductuales y la prueba echas en ratas de la cepa wistar.

2. La combinación de bebidas energizantes y etanol es peligrosa para la salud.

3. El alcoholismo crónico en combinación con bebidas energizantes favorece un estado ansiogénico en los sujetos de estudio, demostrado en su aumento en la actividad del campo abierto.

## 9 Perspectiva:

- Utilizar técnicas que permitan determinar la cantidad de neurotransmisores GABA y DA en los grupos.

## Referencias

Abernathy K, Chandler LJ, Woodward JJ. (2010) Alcohol and the prefrontal cortex. *Int Rev Neurobiol.* 91:289- 320.

Adhikari A, Topiwala MA, Gordon JA. (2010) Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. *Neuron.* 65(2): 257 – 269

Aguilera, G., Colín-González, A. L., Rangel-López, E., Chavarria, A., & Santamaria, A. (2018). Redox signaling, neuroinflammation, and neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(18), 1626-1651.

Ahumada-Cortez, J. G., Gámez-Medina, M. E., & Valdez-Montero, C. (2017). El consumo de alcohol como problema de salud pública. *Ra Ximhai*, 13(2), 13-24.

Albrecht J, Schousboe A. (2005) Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: an update. *Neurochem Res.* 30:1615-21.

Alcalde, M. B., Mañas, J. A., & Puente, C. P. (2011). Trastornos de ansiedad en la infancia y adolescencia. *Tratado de Psiquiatría* Capítulo, 26.

Alcalde, M. B., Mañas, J. A., & Puente, C. P. (2011). Trastornos de ansiedad en la infancia y adolescencia. *Tratado de Psiquiatría* Capítulo, 26.

Alderton, W. K., Cooper, C. E., and Knowles, R. G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *The Biochemical journal* 357, 593-615

Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neurosci* 1989; 31:571-91.

American Psychiatric Association [APA] (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub.

Andrew PJ, Mayer B. (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43: 521-31.

Arnone, M., Maruani, J., Chaperon, F., Thiébot, M. H., Poncelet, M., Soubrié, P., & Fur, G. L. (1997). Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, 132, 104-106

Arolfo MP Yao L Gordon AS , et al.( 2004) Ethanol operant self-administration in rats is regulated by adenosine A2 receptors. *Alcohol Clin Exp Res.*;28:1308–1316.

Ashabi G, Oryan S, Ahmadi R, Valizadegan F. (2011) The effects of hippocampal opioidergic and septal GABAergic system interactions on anxiety-like behavior in rats. *Life Sci.* 89(21 – 22): 821 – 826.

Atance, J. R., & Ruiz, J. F. (2000). Sistema cannabinoide endógeno: ligandos y receptores acoplados a mecanismos de transducción de señales. *Adicciones*, 12(5), 59- 81

Audet MA, Descarries L, Doucet G. (1989) Quantified regional and laminar distribution of the serotonin innervation in the anterior half of adult rat cerebral cortex. *J Chem Neuroanat.* 29-44. PMID: 2789731.

Balazy, M., & Nigam, S. (2003). Aging, lipid modifications and phospholipases—new concepts. *Ageing Research Reviews*, 2(2), 191-209.

Beardsley, P. M., Thomas, B. F., & McMahon, L. R. (2009). Cannabinoid CB1 receptor antagonists as potential pharmacotherapies for drug abuse disorders. *International Review of Psychiatry*, 21(2), 134–142.

Beattie, E. C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J. C., Ha, B. K., Von Zastrow, M., ... & Malenka, R. C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF $\alpha$ . *Science*, 295(5563), 2282-2285.

Beaulieu J-M, Gainetdinov RR.( 2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 63(1):182-217

Becher, B., Spath, S., & Goverman, J. (2017). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*, 17(1), 49-59.

Beg M, Fisher S, Siu D, Rajan S, Troxell L, Liu VX. (2016) Treatment of alcohol withdrawal syndrome with and without dexmedetomidine. *Perm J.* 20:49-53

Bender, P. R., Brent, J., & Kulig, K. (1991). Cardiac arrhythmias during theophylline toxicity. *Chest*, 100(3), 884-885.

Bent J. (2005) *Critical Care Toxicology Diagnosis and Management of the Critically Poisoned Patient*. First ed. Philadelphia - Pennsylvania: Elsevier MOSBY.

Bigard AX.( 2010) Dangers des boissons énergisantes chez les jeunes. Risks of energy drinks in youths. *Arch Pédiatrie.* 17:1625-31

Bogusz, AL, Hardy, LS, Lehman, MN, Connors, JM, Hileman, SM, Sliwowska, H., Billings, HJ, McManus, CJ, Valent, M., Singh, SR, Nestor, CC, Coolen, LM, Goodman, RL 2008. Evidencia de que el ácido gamma-aminobutírico es parte del circuito neuronal que media la retroalimentación negativa del estradiol en ovejas en anestro. *Endocrinología.* 149: 2762-2772.

Bonomaully M, Khong T, Fotriadou M, Tully J. (2014) Anxiety and depression related to elevated dopamine in a patient with multiple mediastinal paragangliomas. *Gen Hosp Psychiatry.* 36(4): e447 – e448.

BROCK, W. (1998). *Historia de la Química*. Madrid: Alianza Editorial, Colección Ciencia y Tecnología.

Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995; 46: 223-34

Brownlee, MD, M. (1995). Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annual review of medicine*, 46(1), 223-234.

Bulbena, A. (1986). Psicopatología de la psicomotricidad. In J. Vallejo (Ed.), *Introducción a la psicopatología y la psiquiatría* (pp. 236- 255). Barcelona: Salvat. E

Cappelletti S., Piacentino D., Fineschi V., Frati P., Cipolloni L., Aromatario M..(2018) Caffeine-related deaths: manner of deaths and categories at risk. *Nutrients.*, 10, pp. 1-13

Casarrubea, M., Davies, C., Faulisi, F., Pierucci, M., Colangeli, R., Partridge, L., ... & Di Giovanni, G. (2015). La nicotina aguda induce ansiedad y altera la organización del patrón temporal del comportamiento exploratorio de las ratas en el tablero: un papel potencial para la habénula lateral. *Fronteras en neurociencia celular*, 9, 197.

Castaño, J., & Díaz, M. V. (2011). Neurocirugía ablativa estereotáctica en las adicciones. *Universitas Médica*, 52(4), 409-420.

Castro Carboni, Nino, Campos Villalobos, Ginnette, & López Castillo, Cinthia. (2003). Neurobiología y tratamiento del trastorno de estrés post- traumático. *Medicina Legal de Costa Rica*, 20(2), 5-14.

Cerimele JM, Stern AP, Jutras-Aswad D. (2010) Psychosis following excessive ingestion of energy drinks in a patient with schizophrenia. *Am J Psych.*167:353

Chao, C. C., & Hu, S. (1994). Tumor necrosis factor-alpha potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures. *Developmental neuroscience*, 16(3-4), 172-179.

Chen J-C, Moratalla R, Yu L, Martín AB, Hackett E, Alberti I, et al, Inactivation of adenosine A2A receptors selectively attenuates amphetamine-induced behavioural sensitization. *Neuropsychopharmacology*, 28 (2003), pp. 1086-95.

Chen J-F, Moratalla R, Impagnatiello F, Grandy DK, Cuellar B, Rubinstein M, et al,

Dispensable role of D2 dopamine receptors in A2A adenosine receptor-induced behavioral and cellular responses as revealed by A2A and D2 receptor knockout mice. 1970-5

Chen, J. F., Moratalla, R., Yu, L., Martín, A. B., Xu, K., Bastia, E., ... & Schwarzschild, M. A. (2003). Inactivation of adenosine A2A receptors selectively attenuates amphetamine-induced behavioral sensitization. *Neuropsychopharmacology*, 28(6), 1086-1095.

Cheng W.J. cheng Y Huang MC , et al,. (2012)Dependencia del alcohol, consumo de bebidas energéticas alcohólicas y características laborales asociadas en la población trabajadora de Taiwán.*Alcohol Alcohol*. 47:372–379.

Chokroverty S. (2017) Overview of normal sleep. In: Chokroverty S. Sleep disorders Medicine: basic science, technical considerations and Clinical aspects. New York: Springer. p. 5-21.

Cowley DS (1992). Alcohol abuse, substance abuse and panic disorder. *American Journal of Psychiatry*, 92 Supl., 41-47.

da Silva Aragão, R., Rodrigues, MAB, de Barros, KMFT, Silva, SRF, Toscano, AE, de Souza, RE, & Manhães-de-Castro, R. (2011). Sistema automático para el análisis de la actividad locomotora en roedores: un estudio de reproducibilidad. *Revista de métodos de neurociencia* , 195 (2), 216-221.

Davis, M., Whalen, P.J., 2001. The amygdala: vigilance and emotion. *Mol. Psychiatry* 6, 13–34.

De La Mora MP, Gallegos-Cari A, Arizmendi-Garcia Y, Marcellino D, Fuxe K. ( 2010) Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Prog Neurobiol*. 90(2): 198 – 216. 11.

De la Torre E., (2017). Papel del gen Mash1 en la determinación de la Eminencia

Ganglionar Medial. <https://hdl.handle.net/11000/4141>

De Manzano O, Cervenka S, Jucaite A, Hellenas O, Farde L, Ullen F. (2013) Individual differences in the proneness to have flow experiences are linked to dopamine D2–receptor availability in the dorsal striatum. *Neuroimage*. 2013; 67: 1 – 6

De Salud, S. (s. f.). Aumenta el consumo de alcohol entre jóvenes. gob.mx. [https://www.gob.mx/salud/articulos/aumenta-el-consumo-de-alcohol-entre-jovenes#:~:text=a%C3%B1os%20de%20edad,-,Las%20personas%20inician%20con%20el%20consumo%20de%20alcohol%20por%20diversas,de%20familiares%20\(2.9%25\)%20o](https://www.gob.mx/salud/articulos/aumenta-el-consumo-de-alcohol-entre-jovenes#:~:text=a%C3%B1os%20de%20edad,-,Las%20personas%20inician%20con%20el%20consumo%20de%20alcohol%20por%20diversas,de%20familiares%20(2.9%25)%20o)

Devane WA, Dysarz FA; Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 34:605-613.

Díaz, A., Treviño, S., Guevara, J., Muñoz-Arenas, G., Brambila, E., Espinosa, B., ... & Aguilar-Alonso, P. (2016). Energy drink administration in combination with alcohol causes an inflammatory response and oxidative stress in the hippocampus and temporal cortex of rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*.

DiChiara, G. & Emperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 85, 5274-8.

E. Nestler, S. Hyman y R. Malenka (2008) *Molecular neuropharmacology: A foundation for clinical neuroscience*, second edition, ép. McGraw Hill professional. McGraw-Hill Education.

Ebrahimi–Ghiri M, Nasehi M, Rostami P, Mohseni–Kouchesfehiani H, Zarrindast MR. (2012) The effect of cholestasis on rewarding and exploratory behaviors induced by opioidergic

and dopaminergic agents in mice. *Arch Iran Med.* 15(10): 617 – 624

Eskow Jaunarajs KL, George JA, Bishop C. (2012) L-DOPA-induced dysregulation of extrastriatal dopamine and serotonin and affective symptoms in a bilateral rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 218: 243 – 256.

Fernandez E. (2002) Bases neurobiológicas de la drogadicción. *Revista Neurología,* 34 (7): 659-664

Ferré, S. (2008). An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of neurochemistry,* 105(4), 1067-1079.

Ferré, S., Ciruela, F., Woods, A. S., Lluís, C., & Franco, R. (2007). Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends in neurosciences,* 30(9), 440-446.

Ferreira SE, de Mello MT, Pompéia S, de Souza-Formigoni MLO. (2006) Effects of energy drink ingestion on alcohol intoxication. *Alcoh Clin Exp Research.*;30:598-605

Finn, D. A., & Crabbe, J. C. (1997). Exploring alcohol withdrawal syndrome. *Alcohol health and research world,* 21(2), 149.

Fisone, G., Borgkvist, A., & Usiello, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS,* 61, 857-872.

Flórez J. (2008) *Farmacología humana,* quinta edición, Barcelona: Elsevier Masson. 503-505.

Fogaca MV, Aguiar DC, Moreira FA, Guimaraes FS. (2012) The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. *Neuropharmacology.* 63(2): 202 – 210.

Forman, J., Aizer, A., & Young, C. R. (1997). Myocardial infarction resulting from

caffeine overdose in an anorectic woman. *Annals of emergency medicine*, 29(1), 178-180.

Fragoso, J. M., Alarcón, G. V., Morales, S. J., Hernández, O. D. R., & Bello, J. R. (2014). El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México*, 150(4), 334-344.

Gallate J, McGregor I. (1999) The motivation for beer in rats: effects of ritanserin, naloxone and SR 141716. *Psychopharmacology* 142: 302-308

Garaycochea, J. I., Crossan, G. P., Langevin, F., Mulderrig, L., Louzada, S., Yang, F., ... & Patel, K. J. (2018). Alcohol and endogenous aldehydes damage chromosomes and mutate stem cells. *Nature*, 553(7687), 171-177.

Garcia A, Gomez E, Bellocchio L, Marsicano G. (2016) Cannabinoid receptor type-1: breaking the dogmas. *Research rev.* 1:1-9.

García-Villacorta, J. S., Eustaquio-Cosme, J. P., Esparza-Varas, A. L., Gonzalez-Angulo, L. T., Flores-Quiñones, G. F., Floriano-Leiva, M. A. A., & Llerena-Vásquez, C. F. (2019). Daño cardiaco frente a hepático por consumo de bebidas energizantes en ratas cepa Holtzman. *Revista Médica de Trujillo*, 14(3).

Garibay, S. E., (2002). Reseña de "Mecanismos neurobiológicos del trastorno de ansiedad social" .. *Investigación en Salud*, IV(3), 0.

GBD Results Tool. En: Global Health Data Exchange [sitio web]. Seattle: Institute for Health Metrics and Evaluation; 2019

Gessa, G. L., Muntoni, F., Collu, M., Vargiu, L., & Mereu, G. (1985). Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain research*, 348(1), 201-203

Gil, N., Gómez, J. C., & Gómez, A. (2008). Radicales libres y lesión cerebral. *Universitas Médica*, 49(2), 231-242.

Giuffrida A, Parsons L H, Kerr T M, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signalling in dorsal striatum. *Nature Neurosci* 2: 258–363

Glasinovic, J. C. (2014). Daño hepático por alcohol. *Curso integrado deficiencias médico quirúrgicas. MEC-246-GH*.

Golfrank, Lewis R. Golfrank's Toxicologic Emergencies. Seventh Edition ed. United States of America: Mc Graw Hill; 2002.

Gómez, C., Saldívar-González, J. A., & Rodríguez, R. (2002). Modelos animales para el estudio de la ansiedad: una aproximación crítica. *Salud Mental*, 25(1), 14-24.

Gurley B.J., Steelman S.C., Thomas S.L. (2015) Multiingredient, caffeine-containing dietary supplements: history, safety, and efficacy. *Clin Ther.*, 37, pp. 275-301

Hall, C. S. J. J. o. C. p. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. 18(3), 385.

Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 327, 1-5.

Haro, G., Cervera, G., Martínez-Raga, J., Pérez-Gálvez, B., Fernández-Garcés, M., & Sanjuan, J. (2003). Tratamiento farmacológico de la dependencia de sustancias desde una perspectiva neurocientífica (II): Alcohol, benzodiacepinas y nicotina. *Actas Españolas de Psiquiatría*, 31(5), 284–298

Herkenham M, Lynn AB, Little MD. (1990) Localización del receptor cannabinoide en el cerebro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1932-1936.

Howlett AC, Johnson MR, Melvin LS, Milne GM. (1988) Nonclassical cannabinoid

analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Mol Pharmacol* 33:297-302

Hurtado Bredda, F. J., Nin Vaeza, N., & Rubbo Amonini, H. (2005). Estrés oxidativo y nitrosativo en la sepsis. *Medicina Intensiva*, 29(3), 159–165. doi:10.1016/s0210-5691(05)74223-6

Ichimaru, Y., Egawa, T., & Sawa, A. (1995). 5-HT<sub>1A</sub>-receptor subtype mediates the effect of fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, on marble-burying behavior in mice. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 68(1), 65-70.

Jacobs BL, Fornal CA. (1993) 5-HT and motor control: a hypothesis. *Trends Neurosci* 16:346–352

Jung, M. E., Gatch, M. B., & Simpkins, J. W. (2005). Estrogen neuroprotection against the neurotoxic effects of ethanol withdrawal: potential mechanisms. *Experimental Biology and Medicine*, 230(1), 8-22.

Kalueff A, Nutt DJ. 1996. Role of GABA in memory and anxiety. *Depress Anxiety* 4:100–110

Kebabian, J.W., Calne, D.B., 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277, 93– 96.

Kenna, G. A., Mcgeary, J., & Swift, R. M. (2004). Farmacoterapia, farmacogenómicas y el futuro del tratamiento de la dependencia del alcohol. *RET: Revista de toxicomanías*, 41, 3-8.

Kenna, G. A., Mcgeary, J., & Swift, R. M. (2004). Farmacoterapia, farmacogenómicas y el futuro del tratamiento de la dependencia del alcohol. *RET: Revista de toxicomanías*, 41, 3-8.

Kienast T, Hariri AR, Schlagenhaut F, Wrase J, Sterzer P, Buchholz HG, et al., (2008) Dopamine in amygdala gates limbic processing of aversive stimuli in humans. *Nat Neurosci*. 11(12): 1381 – 1382. 12.

Kivisaari SL, Probst A, Taylor KI. The Perirhinal, Entorhinal, and Parahippocampal Cortices and Hippocampus: An Overview of Functional Anatomy and Protocol for Their Segmentation in MR Images In fMRI. Springer Berlin Heidelberg 2013. p. 239-67.

Kochenborger L, Zanatta D, Berretta LM, Lopes AP, Wunderlich BL, Januario AC, et al., (2012) Modulation of fear/anxiety responses, but not food intake, following alpha – adrenoceptor agonist microinjections in the nucleus accumbens shell of free–feeding rats. *Neuropharmacology*. 62(1): 427 – 435

Koob G. F. and Nestler E.J. (1997) The neurobiology of drug addiction. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* ): 842-497.

Korc, I., Bidegain, M., & Martell, M. (1995). Radicales libres. *Rev Med*, 11, 121-135.

L. Vonghia, L. Leggio, A. Ferrulli, M. Bertini, G. Gasbarrini, G. Addolorato,( 2008 ) Alcoholism Treatment Study Group. Acute alcohol intoxication. *Eur J Intern- Med*. 561-7

Lan, R, Q. Liu, P. Fan, S. Lin, SR Fernando, D. McCallion, R. Pertwee y A. Makriyannis. (1999) Relaciones estructura-actividad de los derivados de pirazol como antagonistas de los receptores de cannabinoides. *J. Med. Química*.

Lavenex P, Banta LP, Amaral DG: Postnatal development of the primate hippocampal formation. *Dev Neurosci* 2007; 29:179–19.

Lydiard RB. 2003. The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* 64(Suppl 3):21–27.

Machorro, M. S., & Moreno, L. C. (2007). Bebidas “energizantes”, educación social y salud. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 8(2), 189-204.

MacNaughton, W. K., Van Sickle, M. D., Keenan, C. M., Cushing, K., Mackie, K., & Sharkey, K. A. (2004). Distribution and function of the cannabinoid-1 receptor in the modulation

of ion transport in the guinea pig ileum: relationship to capsaicin-sensitive nerves. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(5), G863-G871.

Maldonado R. (2008) Sistema endocannabinoide: nuevas perspectivas en el tratamiento global de los factores de riesgo cardiometabólico. *Med Clin rev.* 130:615-622.

Mamani, J. J. V. (2020). Parámetros fisiológicos y metabólicos de la rata de laboratorio (*Ratus norvegicus*). *Revista Médica Basadrina*, 14(2), 64-68.

Mañon-Rossi, W., Garrido, G., & Nuñez-Selles, A. (2016). Biomarkers of oxidative stress in antioxidant therapy. *J Pharm Pharmacogn Res*; 4(2): 62-83

Marczinski CA, Fillmore MT. (2006) Clubgoers and their trendy cocktails: implications of mixing caffeine into alcohol on information processing and subjective reports of intoxications. *Exp Clin Phsycopharmacol.* 14(4):450-8.

Martí, B. A., San Molina, L., & Calvo, J. G. (1999). Marcadores serotoninérgicos de la dependencia del alcohol. *Trastornos adictivos: Organo Oficial de la Sociedad española de Toxicomanías*, 1(3), 173-182.

Martínez-Tapia, R., Estrada-Rojo, F., Alejandro Hernández-Chávez, A., Barajas-Martínez, A., Islas Escoto, S., Navarro, L., & Chavarría, A. (2018). Neuroinflamación: el ying-yang de la neuroinmunología. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 61(5).

Marx J. Clonación del gen del receptor de marihuana. *Ciencia* 1990;249:624-626.

Mathur BN, Lovinger DM. (2012) Endocannabinoid-dopamine interactions in striatal synaptic plasticity. *Front Pharmacol*;3(66):1-11.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. (1990) Estructura de un receptor cannabinoide y expresión funcional del ADNc clonado. *Naturaleza* :561-564.

McCall RB, Aghajanian GK. (1979) Serotonergic facilitation of facial motoneuron

excitation. *Brain Research*;169:11–27.

Millan, M.J., 2003. The neurobiology and control of anxious states. *Prog. Neurobiol.* 70, 83–244.

Montgomery, K. C., & Monkman, J. A. (1955). The relation between fear and exploratory behavior. *Journal of comparative and physiological psychology*, 48(2), 132.

Montgomery, S. L., & Bowers, W. J. (2012). Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *Journal of neuroimmune pharmacology*, 7(1), 42-59.

Moratalla, R. (2008). Neurobiología de las metilxantinas. *Trastornos Adictivos*, 10(3), 201–207.

Morikawa H, Paladini CA. (2011) Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms. *Neuroscience*. 2011; 198: 95 – 111

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M.( 1993) Caracterización molecular de un receptor periférico para cannabinoides. *Naturaleza* 365:61-65.

Muriel P. (2009) Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int*, 3, pp. 526-536

Nagy LE Diamond I Casso DJ , et al. (1990) Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. *J Biol Chem*. 265:1946–1951.

Nasechi M, Mafi F, Oryan S, Nasri S, Zarrindast M, 2011. The effects of dopaminergic drugs in the dorsal hippocampus of mice in the nicotine–induced anxiogenic–like response. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011; 98(3): 468 – 473.

Nemeroff CB. 2003. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull* 37: 133–146.

Niesink, R. J., & van Laar, M. W. (2013). Does cannabidiol protect against adverse

psychological effects of THC?. *Frontiers in psychiatry*, 4, 130.

Noble JM, Weimer LH. (2014) Neurologic complications of alcoholism. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*. (3 Neurology of Systemic Disease):624-41.

Nutt DJ, Malizia AL. 2001. New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Br J Psychiatry* 179:390–396.

Nutt DJ. 2001. Neurobiological mechanisms in generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 62(Suppl 11):22–27.

Ochoa Mangado, Enriqueta, Madoz-Gúrpide, Agustín, & Vicente Muelas, Natividad. (2009). Diagnóstico y tratamiento de la dependencia de alcohol. *Medicina y Seguridad del Trabajo*, 55(214), 26-40.

Olmos G, Lladó J, (2014) "Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity", *Mediators of Inflammation*, vol. 2014.

Organización Panamericana de la Salud (2019) Informe sobre la situación mundial del alcohol y la salud 2018. Resumen. Washington, D.C.: (OPS/NMH/19-012).

Organización Panamericana de la Salud (2019) Informe sobre la situación mundial del alcohol y la salud 2018. Resumen. Washington, D.C.: (OPS/NMH/19-012).

Osorio, J. H., & Tangarife, H. F. (2009). Cannabis, una opción terapéutica. *Biosalud*, 8(1), 166-177.

Paula-Barbosa, M. M., Brandao, F., Madeira, M. D., & Cadete-Leite, A. (1993). Structural changes in the hippocampal formation after long-term alcohol consumption and withdrawal in the rat. *Addiction*, 88(2), 237-247.

Pava MJ, Woodward JJ. A (2012) Review of the Interactions between Alcohol and the Endocannabinoid System: Implications for Alcohol Dependence and Future Directions for

Research. Alcohol.46(3):185–204.

Peleg–Raibstein D, Pezze MA, Ferger B, Zhang WN, Murphy CA, Feldon J, et al., (2005) Activation of dopaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex by N–methyl–d–aspartate stimulation of the ventral hippocampus in rats. *Neuroscience*. 132(1): 219 – 232.

Pérez-Rial, S., Ortiz, S., & Manzanares, J. (2003). Neurobiología de la dependencia alcohólica. *Trastornos adictivos*, 5(1), 4-12.

Pertwee, R. G. (1999). Evidence for the presence of CB1 cannabinoid receptors on peripheral neurones and for the existence of neuronal non-CB1 cannabinoid receptors. *Life sciences*, 65(6-7), 597-605

Pinel, J. P., & Treit, D. (1978). Burying as a defensive response in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92(4), 708.

Pitzele HZ, Tolia VM. ( 2010 ) Twenty per hour: altered mental state due to ethanol abuse and withdrawal. *Emerg Med Clin North Am*. 683-705

Pivac N, Muck–Seler D, Mustapic M, Nenadic–Sviglin K et al., (2004) Platelet serotonin concentration in alcoholic subjects. *Life Sci* 2004;76:521–531.

Pla Rodríguez, A. (2014). *Importancia de los mecanismos de degradación de proteínas en la neurodegeneración causada por el abuso de alcohol: papel de los receptores TLR4* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Polanco, L. A., Vargas, C., & Góngora, I. M. E. (2011). Modelos animales: una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma psicológica*, 18(2), 99-110.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 266(5604):730-2.

PROFECO. (2011). Estudio de calidad: bebidas energéticas: La chispa enlatada. *Revista*

del consumidor.

Quesada-Yamasaki, D., Arce-Soto, E., Ramírez, K., Fornaguera-Trías, J., & Mora-Gallegos, A. (2016). El papel de la microglía en la señalización neuroinflamatoria y la respuesta neuroinmune. *Revista electrónica eNeurobiología*, 7(16).

Quillfeldt, J. A. (2016). Behavioral methods to study learning and memory in rats. In *Rodent model as tools in ethical biomedical research* (pp. 271-311). Cham: Springer International Publishing.

Radi R, Denicola A, Ferrer G, Álvarez B, Rubbo H. (2000) The biological chemistry of peroxynitrite. En: Ignarro L, editor. Nitric Oxide Biology and Pathobiology. San Diego: Academic Press, p. 57-82

Rand MJ, Majewski H, Wong–Dusting H, Story DF, Loiacono RE, Ziogas J. (1987) Modulation of neuroeffector transmission. *J Cardiovasc Pharmacol* 10(suppl 12):s33–44.

Redgrave P, Vautrelle N, Reynolds JN. (2011) Functional properties of the basal ganglia's re-entrant loop architecture: selection and reinforcement. *Neuroscience*. 15(198):138-151

Reyes J. (2010) Trastornos de ansiedad guía práctica para diagnóstico y tratamientos. Trastornos de ansiedad 70-80.

Riby LM, Riby DM, eds. (2006) Glucose, ageing and cognition: the hippocampus hypothesis. In: Ageing, cognition, and neuroscience. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED) p. 79-92.

Ridley NJ, Draper B, Withall A. (2013) Alcohol-related dementia: an update of the evidence. *Alzheimers Res Ther*. 5(1):3.

Riley, J. N., & Walker, D. W. (1978). Morphological alterations in hippocampus after long-term alcohol consumption in mice. *Science*, 201(4356), 646-648.

Risold P Y, Thompson R H, Swanson L W. (1997) The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 24: 197-254.

ROSENSTINGL, R. (1978). El alcoholismo en la prehistoria. En Gassull, M. (dir.) La enfermedad alcohólica. Barcelona: Químicos Unidos S.A.

Rostami P, Hajizadeh–Moghaddam A, Zarrindast MR. (2006) The effects of histaminergic agents in the ventral hippocampus of rats in the plus– maze test of anxiety–like behaviours. *Physiol Behav.* 87(5): 891 – 896.

Rottlaender D, Motloch LJ, Reda S, Larbig R, Hoppe UC. (2012) Cardiac arrest due to long QT syndrome associated with excessive consumption of energy drinks. *Int J Cardiol.* 158:e51-2.

Rutledge M, Witthed A, Khouzam RN. (2012) It took a RedBull to unmask Brugada syndrome. *Int J Card.* 161:e14-5.

Ryabini A. E. (1998) Role of hippocampus in alcohol-induced memory impairment: implications from behavioral and immediate early gene studies, *Psychopharmacology (Berl)* 139:34-43

Saavedra, O. M., Vázquez, E. N. J., Vargas, M. R. B. G., & Reyes, G. M. C. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas.

Saito M, Cooper T, Hungund B. (2000) Stimulation of cannabinoid receptor agonist 2-arachidonylglycerol by chronic ethanol and its modulation by specific neuromodulators in cerebellar granule neurons. *Biochim Biophys Acta* 1535: 78-86.

Sallee R and Greenawald J. (1995) *Neurobiology*. In: *Anxiety Disorders in Children and Adolescents*. Ed. March JS. The Guilford Press. New York.

Samson HH, Harris RA. (1992) *Neurobiology of alcohol abuse*. Trends in Pharmacological

Science. 13: 206-11.

Santello, M., & Volterra, A. (2012). TNF $\alpha$  in synaptic function: switching gears. *Trends in neurosciences*, 35(10), 638-647.

Schneier FR, Liebowitz MR, Abi-Dargham A, Zea-Ponce Y, Lin SH, Laruelle M. (2000) Potencial de unión al receptor de baja dopamina D (2) en la fobia social. *Am J Psychiatry*. 157: 457-459.

Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (96), e52434.

Serra S, Carai M, Brunetti G, Gomez R, Melis S, Vacca G, Colombo G, Gessa G. (2001) The cannabinoid receptor antagonist SR 141716 prevents acquisition of drinking behavior in alcohol-preferring rats. *Eur J Pharmacol* 430: 369-371. f15i9

Shiloh R, Nutt D, Weizman A. (1999) *Atlas of Psychiatric Pharmacotherapy*. United Kingdom.

Shin LM, Liberzon I. (2010) The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*. 35(1): 169 – 191.

Shook BC Jackson PF . Adenosine A2A receptor antagonists and Parkinson's disease. *ACS Chem Neurosci*.2011;2:555–567.

Siegel, G. J., & Albers, R. W. (Eds.). (1994). *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. Raven Press.

Sierra J, Ortega, Virgilio, & Zubeidat, Ihab. (2003). Ansiedad, angustia y estrés: tres conceptos a diferenciar. *Revista Mal Estar e Subjetividade*, 3(1), 10-59.

Soto, M. T. D., & Miranda, J. M. C. (2020). Síndrome de abstinencia alcohólica: Resultado

del estrés oxidativo y desequilibrio neuronal. Estado del arte. *Revista Biomedica*, 31(2), 95-107

Spanagel R, Weiss F. (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci* 22: 521-527.

Steimer T, la Fleur S, Schulz PE. (1997) Neuroendocrine correlates of emotional reactivity and coping in male rats from the Roman high (RHA/Verh)- and low (RLA/Verh)-avoidance lines. *Behav Genet.* 27(6):503-12.

Steru L, Chermat R, Thierry B *et al.* (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3):367-370.

Sugita H, Kaneki M, Tokunaga E. (2002) Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282 (2): E386-94.

Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., ... & Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21362-21368.

Tellez Vargas, J., (2000). La Noradrenalina. Su rol en la depresión. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, XXIX(1), 59-73.

Terzian AL, Drago F, Wotjak CT, Micale V. (2011) The Dopamine and Cannabinoid Interaction in the Modulation of Emotions and Cognition: Assessing the Role of Cannabinoid CB1 Receptor in Neurons Expressing Dopamine D1 Receptors. *Front Behav Neurosci.* 5: 49

Tiwari, V., & Chopra, K. (2013). Protective effect of curcumin against chronic alcohol-induced cognitive deficits and neuroinflammation in the adult rat brain. *Neuroscience*, 244, 147-158.

Valdés G, José Luis, & Torrealba L, Fernando. (2006). La corteza prefrontal medial controla el alerta conductual y vegetativo: Implicancias en desórdenes de la conducta. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 44(3), 195-204.

van Dam, E. A., van der Harst, J. E., ter Braak, C. J., Tegelenbosch, R. A., Spruijt, B. M., & Noldus, L. P. (2013). An automated system for the recognition of various specific rat behaviours. *Journal of neuroscience methods*, 218(2), 214-224.

Vartak-Sharma, N., & Ghorpade, A. (2012). Astrocyte elevated gene-1 regulates astrocyte responses to neural injury: implications for reactive astrogliosis and neurodegeneration. *Journal of neuroinflammation*, 9(1), 1-14.

Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R. (2008) Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol* 154:299–315.

Verster JC, Aufricht C, Alford C. (2012) Energy drinks mixed with alcohol: misconceptions, myths, and facts. *Int J Gen Med.*;5:187-98.

Vetreno, R. P., Hall, J. M., & Savage, L. M. (2011). Alcohol-related amnesia and dementia: animal models have revealed the contributions of different etiological factors on neuropathology, neurochemical dysfunction and cognitive impairment. *Neurobiology of learning and memory*, 96(4), 596-608.

Vinklerová, J., Nováková, J., & Šulcová, A. (2002). Inhibition of methamphetamine self-administration in rats by cannabinoid receptor antagonist AM 251. *Journal of Psychopharmacology*, 16(2), 139–143. doi:10.1177/026988110201600204

Walsh, RN y Cummins, RA (1976). La prueba de campo abierto: una revisión crítica. *Boletín psicológico* , 83 (3), 482.

Wang J, Haj-Dahmane S, & Shen R (2006). Effects of Prenatal Ethanol Exposure on the

Excitability of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons in Vitro. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 319:857–863.

Wang Y, Harsanyi K, Mangel SC. (1997) Endogenous activation of dopamine D2 receptors regulates dopamine release in the fish retina. *J Neurophysiol*. 78(1): 439 – 449.

Weiger WA. (1997) Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biol Rev Camb Philos Soc* 72:61–95.

Willow, M. & WA Catterall. (1982) Inhibición de la unión de [3H]batracotoxina A 20- $\alpha$ -benzoato a los canales de sodio por los fármacos anticonvulsivos difenilhidantoína y carbamazepina. *Mol. Farmacéutico*. 22, 627–635.

Wise RA, Bozarth MA. (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psycho*. 469-92.

Yao L Arolfo MP Dohrman DP , et al.( 2002) Betagamma dimers mediate synergy of dopamine D2 and adenosine A2 receptor-mediated PKA signaling and regulate ethanol consumption. *Cell*. 109:733–743.

Zarrindast MR, Babapoor–Farrokhran S, Rezayof A. (2008) Involvement of opioidergic system of the ventral hippocampus, the nucleus accumbens or the central amygdala in anxiety–related behavior. *Life Sci*. 82(23 – 24): 1175 – 1181.

Zucconi, S., Volpato, C., Adinolfi, F., Gandini, E., Gentile, E., Loi, A., & Fioriti, L. (2013). Gathering consumption data on specific consumer groups of energy drinks. *EFSA Supporting Publications*, 10(3), 394

Zurn, JB, Hohmann, D., Dworkin, SI y Motai, Y. (2005). Un sistema de seguimiento de roedores en tiempo real para el análisis del comportamiento del ciclo de luz y oscuridad. En 2005, Séptimo Taller del IEEE sobre Aplicaciones de Visión por Computadora (WACV/MOTION'05),

Volumen 1 (Vol. 1, págs. 87-92). IEEE.

