



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

“FUNCIÓN DE LOS CANABINOIDES
ENDÓGENOS EN EL NÚCLEO ACCUMBENS
SHELL SOBRE LA MODULACIÓN DE LA
INGESTIÓN DE ALIMENTO EN RATAS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A :
EDGAR JESÚS SORIA GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. OSCAR PROSPERO GARCÍA

REVISOR DE TESIS :

DR. CESAR CASASOLA CASTRO



Facultad
de Psicología

MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que me apoyaron siempre con la realización de este trabajo. Esto es para y por ustedes.

Al Dr. Oscar Prospéro por ser el mejor tutor que se pueda tener y por compartir el conocimiento. Por enseñarme Método. Gracias por creer en los Genetistas de la Conducta y en la Verdad.

Al Dr. Cesar Casasola por sus valiosos comentarios y aportaciones al desarrollo de este trabajo. Por el uso del punto y coma.

Al Mtro. Gustavo Bachá por tan "motivante" seminario realizado en la Facultad de Psicología y por creer en la conducta.

A la Mtra. Gabriela Orozco por las modificaciones de mi trabajo. Por su amistad y comprensión.

A la Lic. Alejandra Ruiz por la minuciosidad con que reviso de mi trabajo.

Un agradecimiento especial a la Mtra. Gabriela Castillo Parra por enseñarme estadística y ayudarme en el análisis de mis datos.

DEDICATORIAS

A mi Madre (Joss): Gracias por soportarme, apoyarme, quererme y por siempre estar conmigo. Este trabajo es tuyo también.

A mi Padre: Gracias por formarme, educarme, regañarme, quererme y por siempre estar conmigo. Aunque no estés físicamente, te tengo en mi memoria y desde ahí dentro influyes en mí.

A Marko por ser el mejor hermano y compartir la música.

A toda mi familia empezando por mi abuela, mis tías y tíos: Carmen, Estela, Lola, Lourdes, Lupe, Pepe, Raúl. Gracias por soportarme y consentirme de niño y de "adulto". A Mary, Linda, Lalo y Fermín.

A Lizareme, una Psicóloga Industrial y mi cuñada.

A Mar: Por el sol, la luna, nuestra estrella y lo que falta. Por el apoyo y cariño en la distancia. Aaaaauuu!!!

A mis amigos: Mi trabajo es el fruto de ustedes.

Charly: Por el buen humor.

Ernesto: Gracias por la infinidad de consejos y por el apoyo incondicional. Y claro, por esos juegos de ajedrez.

Pablo: Por la necesidad en la discusión (de lo que sea).

Pavel: Gracias por las buenas discusiones (¿peleas?), por ayudarme con las diluciones y el boliche.

Rayo: Un paso más en la conquista. Nos vemos pronto.

Andrea: Por su cariño y apoyo.

Angélica: Por el tiempo para escucharme.

Corinne: Por la pasión a la ciencia y por esas reuniones tan productivas. Gracias por el cariño.

Guadalupe (frutis): Todo fluye. Por las sesiones de t...t en internet.

Natalia: Ya casi dos años y nos seguimos soportando. Gracias por estar y apoyarme en todo.

Paty: Por ser tan tolerante.

Zeidy: Por ser tan buena científica.

A mis amigos de la prepa: Jessica, Erandi, Elizabeth y Agustín. Gracias por compartir la vida.

A todos los miembros del seminario de neurociencias (los que están y los que fueron) y a los que no también: Beatriz, Jana, Elian, Charly, Emiliano, Luisa y David.

A todo el Grupo de Neurociencias de la Facultad de Medicina: Alejandro, Constanza, Lizbeth, Luz, Marina C., Marina M., Rubén y muy especialmente a Khalil por toda la ayuda en mis experimentos y por ser un excelente amigo.

ÍNDICE

1. Abstract.....	1
2. Resumen	2
3. Introducción.....	3
4. Motivación: Perspectiva Psicobiológica.....	4
4.1. Neurobiología de la Recompensa.....	6
4.2. Mecanismos Fisiológicos de la Ingestión de Alimento.....	9
4.3. Fisiología del Núcleo Accumbens	18
5. Las Moléculas de la Motivación.....	21
5.1. Dopamina.....	21
5.2. Opioides.....	25
5.3. GABA.....	26
6. Canabinoides.....	29
6.1. Cannabis Sativa (Marihuana).....	29
6.2. Fisiología de los Canabinoides.....	30
6.3. Canabinoides y el Sistema de Reforzamiento: Evidencias electroquímicas y conductuales.....	36
7. Planteamiento del Problema.....	47
7.1. Hipótesis.....	47
7.2. Objetivos.....	48
8. Método.....	49
8.1. Sujetos.....	49
8.2. Fármacos.....	49

8.3. Aparatos	50
8.4. Procedimiento.....	50
9. Resultados.....	53
10. Discusión.....	60
11. Conclusión.....	73
Anexo.....	74
Abreviaturas.....	75
Referencias.....	77

1. ABSTRACT

The cannabinergic system is composed by the endogenous cannabinoids, anandamide (ANA), oleamide (OLE) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), the cannabinoid receptors (CB1 and CB2) and the enzymes involved in biosynthesis and degradation of these molecules. This system has a wide distribution in the central nervous system. It is found in structures such as: hippocampus, caudate nucleus, hypothalamus and nucleus accumbens. The nucleus accumbens (NAc) is part of the reinforcement system and is divided in two compartments: the shell (NAcS) and the core (NAcC). The shell participates in the action of drugs of abuse and has been involved in the hedonic regulation of natural rewards like food. GABAergic agonists administration into the nucleus accumbens shell increases food intake and produces an activation of the lateral hypothalamus. These suggest a dialogue between systems: one related to hedonic regulation (NAcS) and other associated to homeostatic regulation (hypothalamus). The administration of 2-AG into the NAcS produces hyperphagia. These data suggest a possible role of the cannabinergic system in the regulation of food intake. In this study we administrated ANA and OLE into the NAcS and measured the amount of food intake during four hours. We evaluated if the administration of these cannabinoids produces an activation of the hypothalamic areas related with food intake. We found that ANA and OLE increases food intake and activates the paraventricular nucleus of the hypothalamus.

2. RESUMEN

El sistema canabinérgico está compuesto por los canabinoides endógenos (anandamida, oleamida, 2-AG, entre otros), los receptores a canabinodes (CB1 y CB2) y las enzimas encargadas de su biosíntesis y degradación. Este sistema se encuentra distribuido en estructuras como el hipocampo, el núcleo caudado, el hipotálamo y el núcleo accumbens. El núcleo accumbens es parte del sistema de reforzamiento; se divide en dos compartimentos, el shell (NAcS) y el core (NAcC). El shell participa en la acción de las drogas de abuso, así como en la regulación hedónica de los reforzadores naturales como el alimento. Se ha observado que la administración de agonistas GABAérgicos dentro del NAcS produce un aumento en el consumo de alimento y una activación del hipotálamo lateral. Lo que sugiere un dialogo entre sistemas: uno encargado de la regulación hedónica (NAcS) y otro de la regulación homeostática (hipotálamo). El 2-AG administrado en el NAcS produce de igual forma hiperfagia. Esto hace pensar que el sistema canabinérgico puede estar implicado en la regulación de la ingestión de alimento. En este estudio administramos anandamida y oleamida en el NAcS y medimos la cantidad de alimento ingerido durante cuatro horas. También evaluamos si la administración de estos canabinoides producía una activación de áreas hipotalámicas relacionadas con la ingestión de alimento. Encontramos que tanto anandamida como oleamida aumentan el consumo de alimento y producen una activación del hipotálamo paraventricular.

3. INTRODUCCIÓN

¿Qué sabe una persona acerca de su medio ambiente? ¿Cómo el medio ambiente modifica al organismo y viceversa? ¿Cómo cambia el cerebro ante las demandas del medio? Para responder estas preguntas utilizamos aproximaciones que implican metodologías, conceptos, modelos, técnicas, etc. Constructos como *Memoria, Aprendizaje, Percepción, Pensamiento, Motivación*, entre otros, han sido esencialmente desarrollados dentro de la Psicología, y junto con la neurobiología se ha tratado de encontrar sus sustratos anatómo-funcionales. El que nos atañe para este proyecto es el de Motivación, el cual refiere conducta orientada a metas o propósitos normalmente de carácter adaptativo. Es decir, nos lleva a lo que el sujeto quiere o "desea". Aquello que es "deseado" debe cumplir con ciertas características que lo hacen significativo para el organismo. El resultado de la conducta no siempre es adaptativo como en el caso de las adicciones a fármacos, pero en este caso lo consideramos patología. Todo esto nos hace sugerir que la Motivación no sólo es una respuesta al desequilibrio del medio interno, sino que es una respuesta a las demandas del medio ambiente. El negociador entre la demanda del medio interno y la oferta del medio externo es sin duda el Cerebro que, como veremos más adelante, cuenta con un sistema específico que se encarga de regular a la Motivación. Es decir, un complejo de estructuras trabajando en conjunto y sirviendo de mediador entre el ambiente y las necesidades del organismo.

4. MOTIVACIÓN: PERSPECTIVA PSICBIOLÓGICA

Vista desde adentro, es decir, desde los estados internos al organismo (por ejemplo, desbalance energético), la motivación es un término que se refiere a una variedad de factores neuronales que inician, sostienen y dirigen la conducta (Salamone y Correa, 2002). En lo concerniente al medio ambiente se puede decir que la Motivación es un conjunto de procesos a través de los cuales el organismo regula la probabilidad, proximidad y disponibilidad del estímulo. La conducta motivada se lleva a cabo en fases que incluyen una terminal o consumatoria en la cual el organismo interactúa directamente con el estímulo motivacional, y también una fase instrumental donde el organismo regula la proximidad u obtención del estímulo (Salamone y Correa, 2002; Salamone, 1996; Kupfermann, Kandel y Iversen, en Kandel, Schwartz y Jessell, 2000). En otras palabras, para que el organismo consiga el estímulo que desea debe trabajar por él (aunque no siempre es el caso).

Existe una relación directa entre los conceptos de Motivación y Aprendizaje. Por ejemplo, nos podemos remontar hasta 1911 cuando Thorndike acuñó el término "Ley del Efecto" para describir el proceso involucrado en el condicionamiento instrumental. La conducta instrumental involucra funciones perceptuales, motoras y motivacionales. De acuerdo con Thorndike, si una respuesta ocurre en la presencia de un estímulo, y éste llega a ser "satisfactorio", entonces dicha respuesta será más probable que ocurra de nuevo ante la

presencia del mismo estímulo. Thorndike sostenía que las respuestas eran acompañadas por satisfacción para el animal, así sugirió los términos de "satisfactores" y "molestadores" para referirse a estímulos que aumentan la probabilidad de que una respuesta se presente o no se presente, respectivamente (Domjan, 1999; Staddon, 2001; Salamone et al., 2003, Salamone y Correa, 2002).

En este punto quisiera hacer una distinción entre dos términos que usare con frecuencia en este escrito: reforzador y recompensa; entendiéndose recompensa como el efecto fisiológico y psicológico (por ejemplo la experiencia de placer inducida por la ingestión de un alimento hipercalórico) que provoca un reforzador sobre el organismo. El reforzador es cualquier estímulo cuya presencia aumenta la probabilidad de que se presente una conducta..

En gran parte de la investigación sobre aprendizaje instrumental se usan como reforzadores estímulos biológicamente importantes como el alimento y el agua. A los participantes se les priva de alimento o agua por un periodo breve, estos sirven entonces como reforzadores. Toda vez que estos reforzadores son necesarios para el funcionamiento fisiológico del organismo. Una desviación del balance homeostático motiva al organismo a ejecutar su respuesta instrumental para obtener el reforzador que lo devolverá a la homeostasis (Domjan, 1999; Berridge y Robinson, 2003). Uno de los primeros teóricos en aproximarse al estudio de la Motivación a través de un mecanismo fisiológico fue Clark Hull. Él creía que los procedimientos de privación de agua y alimento crean un estado de pulsión biológica (estado donde el organismo tiene un déficit biológico); y dado

que los reforzadores –agua y alimento- tienen la característica común de reducir este estado de pulsión, a este mecanismo se le llamó teoría de la reducción de la pulsión. En consecuencia, de acuerdo con Hull, el grado de pulsión determina el grado de respuesta (Domjan, 1999; Staddon, 2001). La teoría de la reducción de la pulsión deja ver claramente que el análisis del reforzamiento es parte del campo más amplio que es la motivación. A la motivación inducida por un estado de pulsión biológica se le llama motivación primaria. A la motivación creada por el reforzador mismo se le llama motivación por incentivo (Domjan, 1999).

4.1. Neurobiología de la Recompensa

En 1953, James Olds y Peter Milner, inspirados por las técnicas de Rudolph Hess, Penfield y Magoun, descubrieron que las ratas aprendían a regresar a los sitios de su ambiente en donde se les había dado estimulación eléctrica directa al área septal del cerebro. La observación de una preferencia de lugar aprendida sugirió a Olds y Milner que la estimulación era reforzante, lo que subsecuentemente confirmaron ya que podían entrenar a ratas para presionar una palanca, que era contingente con la estimulación (pulsos eléctricos) del área septal (**Figura 1**). A partir de estas observaciones se postuló que la estimulación en el área septal podía servir como un “reforzador operante” y que activaba circuitos cerebrales relevantes para la búsqueda de incentivos naturales como la comida y el contacto sexual (Olds y Milner, 1954; Olds, 1956; Wise, 1996). Fue la primera demostración junto con los estudios de lesión hipotalámica llevados a cabo por Delgado en 1946 de los sistemas cerebrales que controlan la motivación.

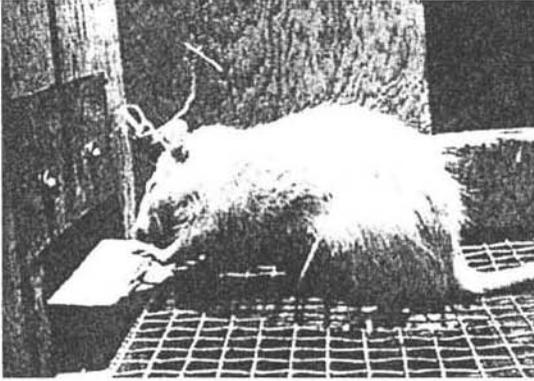


Fig. 1 Rata implantada con electrodos de estimulación en el área septal

Con este gran descubrimiento se abrió una nueva rama de las neurociencias, la neurobiología de la recompensa. A partir de esto, se ha descrito un "sistema de recompensa", constituido por un conjunto de estructuras mesocorticales, entre las más importantes se encuentran el Núcleo Accumbens (NAc), el Área Tegmental Ventral (VTA por sus siglas en inglés), el Hipotálamo (Hyp por sus siglas en inglés), la Amígdala (Amy por sus siglas en inglés) y la Corteza Prefrontal (PFCtx por sus siglas en inglés) (**Figura 2**) Cada una de estas estructuras desempeña una función dentro del sistema de la motivación. La PFCtx se encarga de la valoración del reforzador; el Hyp es el receptor de las señales internas que indican que hay un desequilibrio en la constancia del medio interno. Pero sin lugar a dudas la estructura que siempre es mencionada cuando se habla de motivación es el NAc, el llamado centro del "placer". Shizgal llama al sistema neuronal constituido por estas estructuras como el "canal afectivo" para la recompensa positiva. (Berridge, 2003; Berridge y Robinson, 2003; Fulton et al., 2000; Wise, 1996; Kelley y Berridge, 2002, Shizgal, 1999).

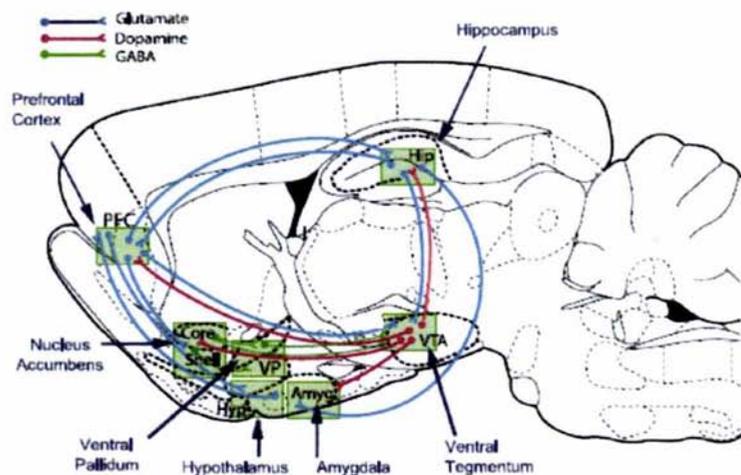


Fig. 2. Esquema que muestra las estructuras del sistema de reforzamiento en el cerebro de la ratona con algunas de las moléculas involucradas.

En resumen podemos decir que este sistema detecta el desbalance de la homeostasis y en consecuencia modula la respuesta ante estímulos motivacionales (comida, agua, sexo), desplegando una serie de conductas para llegar a una meta. Aunque también, permite el reforzamiento de conductas que no tienen valor homeostático, como el consumo de drogas de abuso (Kelley y Berridge, 2002).

Estudios en neurobiología de la recompensa brindan datos sobre el funcionamiento normal del cerebro y cómo persigue metas. Así mismo sobre psicopatologías, que incluyen adicción a drogas, desórdenes alimenticios, obsesión y depresión. En los siguientes párrafos se describirán algunos estudios

que se enfocan en una de las conductas motivadas preferidas por los investigadores, me refiero a la ingesta de alimento y de cómo puede ser regulada por sistemas homeostáticos y de recompensa.

Los circuitos neuronales que son afectados por las drogas de abuso, y que se presumen ser los más alterados en la adicción, son aquellos que controlan la ingesta de nuestro más valioso reforzador natural, la comida. Por este motivo, resulta de gran importancia conocer cuáles son los mecanismos fisiológicos que regulan la ingesta de alimento.

4.2. Mecanismos Fisiológicos de la Ingestión de Alimento

Los sistemas reguladores que controlan las funciones biológicas (ingesta de alimento, conducta sexual, ingesta de agua, regulación de la temperatura) de todos los organismos se han desarrollado como un resultado de la selección natural. Debido a que la selección natural es un proceso lento, la adaptación de un organismo a su ambiente cambiante ocurre con cierto retraso. Los sistemas reguladores actuales en los humanos, particularmente los relacionados al balance de fluidos corporales y a los almacenes energéticos, reflejan la adaptación a un ambiente preindustrializado y no se ajustan de forma óptima a las demandas del presente. Para que un organismo se mantenga en homeostasis energética debe existir un balance entre la ingesta de alimento (energía de entrada) y el metabolismo (energía de salida). Conforme a este objetivo, el organismo debe contar con sistemas fisiológicos de regulación de la energía, sensores que

indiquen un desbalance en el cuerpo. (Schwartz et al., 2000; Strubbe y Van Dijk, 2002; Saper, et al., 2002)

En los mamíferos, incluyendo los humanos, la ingesta de alimento es una conducta reguladora cuya función primordial es la de respaldar la continua demanda energética de los tejidos corporales. Bajo esta perspectiva la ingesta de alimento es influenciada por el hambre, la saciedad y los mecanismos biológicos y ambientales (factores sociales, hora del día, costo, entre otros) que hacen que un determinado organismo reestablezcan la constancia del medio interno. En el caso de la rata y otros roedores, la mayoría de las actividades conductuales son organizadas durante la fase oscura, mientras que el sueño se presenta regularmente durante la fase de luz. Conforme a este patrón de actividad-reposo, las ratas comen más durante la fase de oscuridad, registrándose dos picos, uno en las primeras horas de oscuridad y el otro en las últimas (Strubbe y Van Dijk, 2002; Clifton, 2000).

Aunque puede resultar simplista el hecho de reducir una conducta tan compleja como lo es la ingesta de alimento a una serie de interacciones moleculares, los descubrimientos que se han realizado en las décadas pasadas han identificado moléculas señalizadoras que afectan la ingesta de alimento y que son críticas para el balance energético. Los modelos murinos (modelos en ratones) han resultado ser sumamente exitosos para estudiar la obesidad humana. Esto indica que existe una homología sustancial entre los mamíferos en la organización funcional de los sistemas reguladores del peso corporal. Aunado a

esto, la identificación de moléculas que controlan la ingesta de alimento ha generado nuevos blancos para el desarrollo de drogas que se usan para combatir la obesidad y otros desórdenes relacionados (Clifton, 2000).

En 1940, Hetherington y Ranson fueron los primeros en proponer a una estructura cerebral en particular como centro de regulación homeostática: se referían al Hyp. Encontraron que lesiones electrolíticas de la porción ventromedial del hipotálamo (HVM) causa que las ratas lleguen a ser hiperfágicas y obesas, mientras que una lesión en el hipotálamo lateral (HL) produce lo opuesto. Más tarde, Delgado, Anand y Brobeck confirmarían y extenderían estos resultados (Tepperman et al., 1943, Delgado y Anand, 1953). Así, durante años se postuló al HL como el centro del hambre y al HVM como el centro de la saciedad (**Figura 3**).

Estudios más recientes han demostrado que aunque estos núcleos son importantes en la regulación de la ingesta de alimento, no son los únicos. Pero lo que es un hecho es que el hipotálamo tiene una función indispensable en la alimentación, en esta estructura convergen señales de la periferia y del sistema nervioso central que regulan la constancia del medio interno (Schwartz et al., 2000).

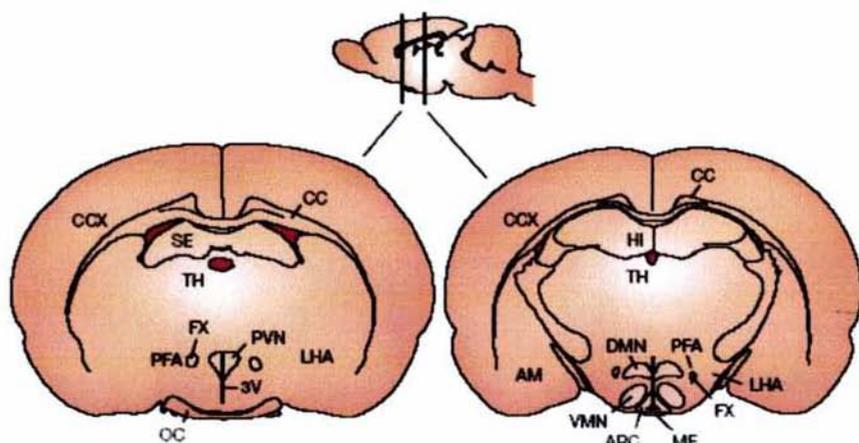


Fig. 3 Núcleos hipotalámicos relacionados con la regulación de la ingestión de alimento, mostrados en un corte coronal de cerebro de rata. PVN, núcleo paraventricular; LHA (HL), hipotálamo lateral; PFA, área perifornical; ARC, núcleo arcuato; ME, eminencia media; VMN (HVM), hipotálamo ventromedial; DMN, núcleo dorsomedial. Otras áreas no involucradas en la ingestión de alimento: FX, fornix; OC, quiasma óptico; CC, cuerpo calloso; CCX, corteza cerebral; AM (Amy), amígdala; HI, hipocampo; TH, tálamo (Schwartz, et al., 2000)

En 1953, Kennedy propuso que había señales inhibitorias que se generaban en proporción a los almacenes de grasa del cuerpo y que actuaban en el cerebro para reducir la ingesta de alimento. Veinte años después, Gibbs y Smith propusieron que las señales que se generaban durante una comida (llamados factores de saciedad), que incluyen a péptidos secretados del tracto gastrointestinal que proveen de información al cerebro para inhibir la conducta y lleve al término la ingesta (Schwartz, et al., 2000).

En 1979, Porte y Woods observaron que cuando administraban directamente en el fluido cerebroespinal de primates no humanos una pequeña cantidad de la hormona metabólica insulina resultaba en un decremento significativo de la ingesta de alimento y del peso corporal de los animales. Esta molécula funciona como una señal del adiposito (tejido graso) cuyos niveles cerebrales reflejan el tamaño del mismo. Esto sirve como retroalimentación negativa que liga a la conducta alimenticia con el tamaño de los almacenes adiposos.

A mediados de los 90, un segundo candidato como señal del adiposito emergió, la proteína Ob o leptina; cuya función en el organismo parece ser la misma que la de la insulina. Estas dos moléculas actúan en el HVM, en donde se encuentran los receptores de ambas. Se ha observado una obesidad severa en animales modificados genéticamente que no expresan el gen ob (**Figura 4**). Entonces, tanto insulina como leptina desempeñan una función inhibitoria de la ingesta de alimento. (Saper et al., 2002; Schwartz et al., 2000)

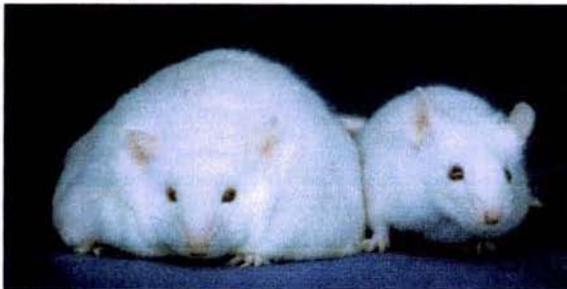


Fig. 4 A la izquierda una rata que no expresa el gen Ob (leptina). A la derecha una rata normal.

Las sustancias responsables para que se lleve a cabo la alimentación después de un déficit energético, incrementan su señalización. Es decir, aumenta su expresión o su ARNm (molécula encargada de traducir el ADN a proteínas) después de una privación de alimento. Cuando el organismo se alimenta, las concentraciones del neuromodulador decaen. Existen muchos neuroreguladores que incrementan la ingesta de alimento que incluyen Neuropéptido Y (NPY), Galanina (GAL), Norepinefrina (NE), Orexinas (ORX), entre otros. (Levine y Billington, 1997)

En el Hyp, el NPY se sintetiza en el núcleo arcuato (ARC) es conducido transporte axonal hacia el núcleo paraventricular del hipotálamo (HPV) en donde es liberado; en este mismo núcleo se ha detectado una gran densidad de receptores a NPY. Las manipulaciones experimentales en donde se priva de alimento a las ratas produce un incremento del ARNm del NPY en el ARC. La inyección de NPY directamente en los ventrículos cerebrales o en el Hyp de ratas estimulan potentemente la ingesta de alimento. Existe una interacción directa entre las señales de saciedad y de hambre, esto queda mucho mas claro con la relación entre leptina y NPY. La leptina inhibe la producción del NPY en el ARC y en ratones que no expresan NPY se reduce la hiperfagia que se observa en ratones que no expresan el gen ob. Indicando que existe una relación bidireccional entre estas dos moléculas: cuando una aumenta, la otra baja (Levine y Billington, 1997; Di Marzo et al., 2001b).

La hormona estimuladora de melanocitos (MSH por sus siglas en inglés), la hormona liberadora de corticotropina (CRH por sus siglas en inglés), la proteína relacionada al gen agutí (AgRP por sus siglas en inglés), la pro-opiomelanocortina (POMC), el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART por sus siglas en inglés) y ORX se han caracterizado como moléculas reguladoras de la ingesta de alimento. La síntesis neuronal de MSH y de CRH se incrementa en respuesta a una mayor actividad de las señales del adiposito. Cuando se administra el AgRP de forma intracerebroventricular se produce hiperfagia. En el ARC se encuentran neuronas que co-expresan NPY/AgRP y POMC/CART (estos últimos inhibidores de la ingesta de alimento). En estas mismas células se ha detectado la presencia de receptores a leptina. En resumen, leptina jugaría una doble función en estas neuronas, inhibiendo a las productoras de NPY/AGRP y excitando a las que contienen POMC/CART. Ambos tipos de neuronas proyectan al HPV y al HL. El HL es el sitio de producción de las ORX, caracterizadas como estimuladoras de la ingesta de alimento y recientemente relacionadas con el sueño. Así, cuando se presente un desbalance energético a la baja, por ejemplo, en situaciones de privación de alimento, las señales del adiposito (leptina e insulina) decaerán, lo que provocará una desinhibición de las neuronas productoras de señales orexigénicas (NPY/AgRP y ORX) y una consecuente inhibición de POMC/CART.

Los mecanismos intracelulares que están involucrados con la regulación de la ingesta de alimento han sido poco estudiados. Sin embargo, existen datos de que la proteína cinasa activada por AMP cíclico (PKA) puede ser clave para el mantenimiento del balance energético. La administración *in vivo* de leptina

decrementa la actividad de la PKA en el Hyp. Por el contrario, la administración de grelina, un estimulante de la ingesta de alimento, estimula la actividad de la PKA. La inyección en el HPV de 5-amino-4-imidazole carboxamida (AICA), un activador farmacológico de la PKA, incrementa significativamente la ingesta de alimento (Schwartz et al., 2000; Saper et al., 2002; Plata-Salaman, 2001; Andersson et al., 2004).

Si la alimentación fuera solamente controlada por mecanismos homeostáticos, muchos de nosotros nos mantendríamos en nuestro peso ideal y las personas compararían a la ingesta de alimento con la respiración o la eliminación, una parte de la existencia necesaria pero no excitante. Los seres humanos llegamos a pagar grandes cantidades de dinero por una excelente comida (un indicador de que la comida *per se* es reforzante) y casi cualquier mamífero come más allá de sus necesidades energéticas si se les presenta comida altamente apetitosa, por ejemplo, dulces, carbohidratos, entre otros. Este postulado nos lleva a cuestionar si las moléculas encargadas de mantener el balance energético interactúan con el sistema de recompensa (Figlewicz y Woods, 2000; Figlewicz, 2003).

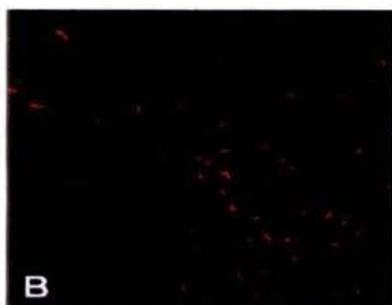


Fig. 5 Expresión de receptores a leptina (rojo) en el VTA de cerebro de rata. (Figlewicz et al., 2003)

Se ha sugerido que leptina puede mediar el valor hedónico del alimento a nivel periférico a partir de los datos que muestran que esta hormona inhibe las respuestas a lo dulce en la lengua. Bajo esta línea de investigación Shizgal usó el modelo de autoestimulación intracraneal para evaluar si leptina afecta la conducta reforzada. Él observó que la privación de alimento crónica incrementa la conducta de autoestimulación y la administración de leptina bloquea este efecto. Esto sugiere que la leptina esta actuando directamente en el sistema de recompensa, y el hecho de que se haya detectado la presencia de receptores a leptina e insulina en el VTA favorece dicha interpretación. (Fulton et al., 2000; Figlewicz, 2003; Figlewicz y Woods, 2000) (**Figura 5**)

Hasta aquí hemos visto cómo señales de la periferia (leptina, insulina) interactúan con señales centrales (NPY, POMC) para la regulación de la ingesta de alimento, aparte de que el sitio de acción de dichas moléculas es el Hyp, el *non plus ultra* de la homeostasis. Sin embargo, como ya vimos, el sistema homeostático y el sistema de recompensa parecen tener una relación directa en su funcionamiento. A continuación se describirá a uno de los participantes más importantes y con más historia del sistema de recompensa, el NAc, lo cuál ayudará a esclarecer cómo distintas moléculas interactúan en este núcleo para la modulación de la motivación.

4.3. Fisiología del Núcleo Accumbens

Los núcleos de la base del cerebro constituyen estructuras cerebrales que desempeñan una función prominente en las acciones motoras, en particular en la planeación, iniciación y ejecución del movimiento. También se ha aceptado que más allá de sus funciones motoras, estos núcleos están regulando conductas motivadas (Carelli, 2002; Fernández-Espejo, 2000; Kelley, 2004; Zahm, 2000). Este sistema de núcleos de la base está presente en aves, reptiles y mamíferos, también se ha observado aunque de forma menos organizada en los peces y anfibios. En los mamíferos los núcleos de la base son subdivididos en dos componentes, que comprenden las estructuras estriatales y palidales. Es decir, los sistemas dorsal y el ventral. El sistema dorsal consiste del estriado dorsal (núcleo caudado y putamen en felinos y primates, caudado-putamen en otros mamíferos como la rata) y el pálido dorsal. El sistema ventral se constituye por el estriado ventral (el NAc) (Figura 6) y el pálido ventral (Marín et al., 1998).

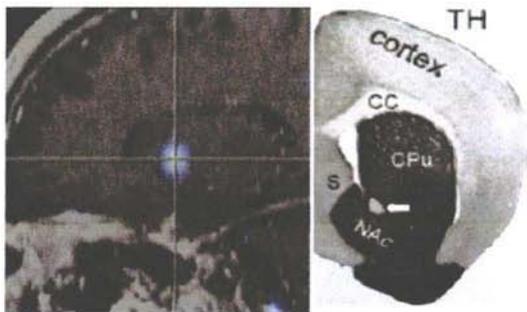


Fig. 6 Izquierda: localización del NAc

(marca azul) en un corte sagital de cerebro de humano. Derecha: localización del NAc en un corte coronal de cerebro de rata (CC cuerpo calloso, CPu caudado-putamen, S septum, NAc núcleo accumbens)

El NAc posee dos territorios diferentes tanto en sus conexiones como neuroquímicamente: el core (centro o núcleo) (NAcC) y la shell (corteza) (NAcS). La shell presenta conexiones de abierto carácter límbico: recibe importantes entradas glutamatérgicas desde el hipocampo y la amígdala centromedial, así como dopaminérgicas desde el área tegmental ventral. También presenta aferencias glutamatérgicas de la PfCtx (infralímbica) y recibe entradas serotoninérgicas desde el núcleo Rafe medial. El core, de acusado carácter motor, recibe aferencias glutamatérgicas de la corteza motora y dopaminérgica de la sustancia negra. Las neuronas principales en la shell y el core son las espinosas de mediano tamaño que contienen el neurotransmisor inhibitor GABA. Estas células GABAérgicas contienen sustancia P (SP) y dinorfina (DYN), así como encefalina (ENK). En el NAc, al igual que en el estriado restante, existen interneuronas colinérgicas y GABAérgicas (Marín et al., 1998; Zahm, 2000).

Una rápida observación de la anatomía del NAc nos indica que su función más probable es la de la integración límbicomotora (**Figura 7**). Numerosos estudios neurobiológicos han destacado su papel en la emergencia de respuestas motoras ante la presencia de estímulos tanto apetitivos como aversivos y se sabe que participa en procesos diversos como la ingesta de alimento, conducta sexual y la autoadministración de drogas (Albertin, 2000; Fernández-Espejo, 2000; Zahm, 2000; Hernández et al., 2002; Baldo y Kelley, 2001, Cabeza de Vaca y Carr, 1998).

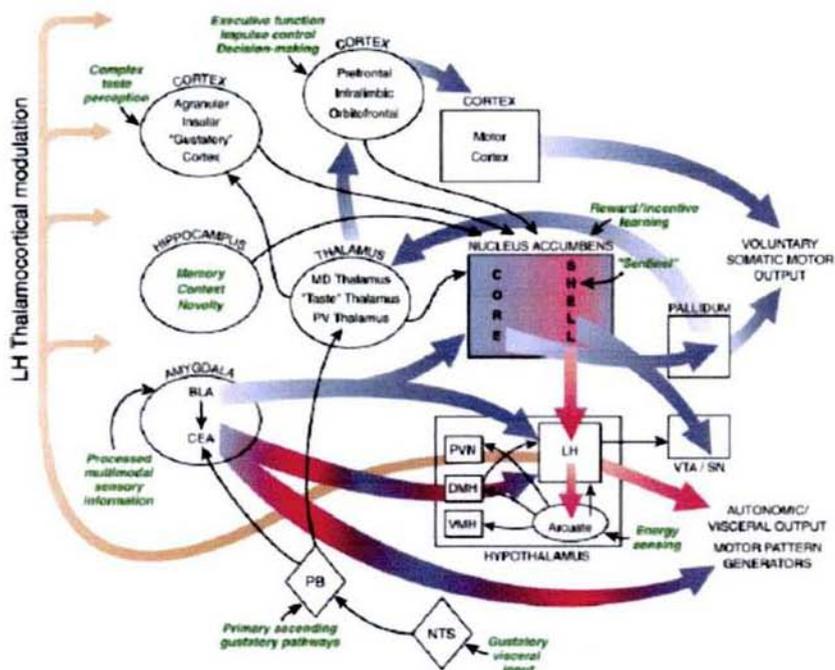


Fig. 7 Esquema que muestra al NAc (shell y core) como una posible interfase límbico-motora. Integra señales límbicas y somáticas del hipocampo, amígdala, corteza prefrontal, entre otras estructuras, y las traduce en acciones a través de la corteza motora, el estriado dorsal y el globo pálido. Las flechas rojas indican transmisión GABAérgica o glutamatérgica. Las flechas azules indican transmisión opioidérgica. (Kelley, 2004)

5. LAS MOLÉCULAS DE LA MOTIVACIÓN

5.1. Dopamina

El encéfalo humano tiene relativamente pocas neuronas dopaminérgicas, y estas se reparten por igual entre la vía nigroestriatal y las proyecciones mesocorticolímbicas que se originan en el VTA (Nicola y Malenka, 2000; O'Donnell, 2003) este último sistema es el que está implicado en la regulación de la motivación. Por varias décadas se ha sugerido que la dopamina (DA), especialmente la liberada en el NAc, media las respuestas reforzadas evocadas por los estímulos naturales como la comida, al igual que las evocadas por las drogas de abuso. Por este motivo, la DA frecuentemente ha sido nombrada el neurotransmisor del placer. Las evidencias actuales señalan a la DA como mediadora en la modulación de la conducta instrumental, el aprendizaje, la relevancia de los estímulos y la responsividad al ambiente. Sin embargo, estos descubrimientos no respaldan la idea desarrollada por Roy Wise que sugiere que la DA tiene una función selectiva en regular la motivación. La hipótesis dopaminérgica del reforzamiento se postuló para explicar los mecanismos neuronales subyacentes a la autoestimulación intracraneal (en la actualidad se sabe que hay solamente una actividad neuronal débil de las proyecciones dopaminérgicas cuando se presenta la autoestimulación) y fue extendida eventualmente para incluir a los reforzadores naturales y a las drogas de abuso. Esta hipótesis se conoce como el Modelo de Anhedonia Generalizada. (Berridge y

Robinson, 1998; Cannon y Palmiter, 2003; Wise, 1996; Salamone y Correa, 2002; Ikemoto y Panksepp, 1999)

Los antagonistas dopaminérgicos y la depleción de la DA del NAc no reducen el apetito. Sin embargo, la falta de acción dopaminérgica en el NAc parece reducir el esfuerzo que realiza un organismo para conseguir su alimento. Esto se ha observado en tareas donde el animal, en este caso la rata, tiene que elegir entre trabajar (presionar una palanca a un determinado intervalo) por un alimento apetitoso y el alimentarse de forma libre con uno menos apetitoso. Posterior a que la rata aprende a palanquear por el reforzador se le administra *intra accumbens* antagonistas a los receptores D1 y D2 dopaminérgicos y lo que se observa es que el animal deja de trabajar por el alimento apetitoso mientras que el consumo del alimento menos apetitoso, pero más fácil de conseguir, aumenta. (Salamone et al., 2002)

Al parecer, la función de la DA en el NAc sobre la modulación de la motivación depende de la región donde se este liberando. Es decir, en el shell o en el core del NAc. Un estudio realizado por Bassareo y Di Chiara indica que la DA esta involucrada en la regulación de la ingesta de alimento, en este caso, un alimento apetitoso (Fonzies; un alimento con alto contenido energético). Utilizando la técnica de microdiálisis, midieron las concentraciones de DA en los dos compartimentos del NAc, NAcS y NAcC, durante las dos fases (que son comunes a todas las conductas motivadas) de la ingesta de alimento, la fase apetitiva y la fase consumatoria en ratas alimentadas *ad libitum*. Observaron un aumento en la

concentración de DA en el shell, en comparación con el core, en la fase consumatoria de la ingesta de alimento. Es decir, cuando el animal ingiere el alimento. También registraron un aumento en el core, comparado con el shell, en la fase apetitiva de la ingesta de alimento. Es decir, cuando el animal detecta el estímulo apetitivo y se aproxima al mismo. Estas observaciones fortalecen la participación del NAc en el estado motivado, asignando a sus componentes estructurales diferentes funciones con relación a dos distintas etapas secuenciales de las conductas motivadas. (Bassareo y Di Chiara, 1999)

Estos datos hacen suponer que la DA en el NAc ejerce una función facilitadora de la ingesta de alimento. El grupo de Ann Kelley se dio a la tarea de investigar el efecto de un antagonismo dopaminérgico en el NAc sobre la ingesta de alimento. Estos autores administraron antagonistas selectivos a los receptores D1 y D2 (SCH23390 y Raclopride, respectivamente) en el NAcS y en el NAcC de ratas y posteriormente midieron la ingesta de alimento durante 30 minutos. El bloqueo de los D1 y D2 en el shell y en el core no modificó la cantidad de alimento ingerido por los animales. Sin embargo, la conducta motora se vio afectada a la baja. A pesar de que no se modificó la cantidad de alimento ingerido, hubo un aumento en la frecuencia de alimentación (Baldo et al., 2002).

La activación del NAc y la liberación de DA también son provocadas por reforzadores secundarios, tales como estímulos condicionados (estímulos visuales o auditivos) que han sido pareados con la comida, drogas o sexo (Pontieri et al., 1995; Bassareo y Di Chiara, 1999; Ikemoto y Panksepp, 1999).

El grupo de Kent Berridge, guiados por la hipótesis de que DA es igual a placer, midieron las diferentes reacciones conductuales (expresiones faciales de placer que son comunes en la escala evolutiva) de las ratas ante estímulos alimenticios. Se esperaba que en los animales que tuvieran un déficit en la transmisión dopaminérgica, principalmente la que ocurre en el NAc, este tipo de reacciones tendería a anularse. Sin embargo, esto no ocurre; ni la depleción de DA en el NAc ni el bloqueo de D1 y D2 en la misma estructura, deterioran el impacto hedónico, evaluado por las reacciones faciales. (Berridge y Robinson, 1998)

Existen datos que indican que en sujetos humanos que ingieren una droga placentera (por ejemplo, cocaína) a los cuales se les suprime la transmisión dopaminérgica, su reporte placentero no se modifica aun cuando su deseo por la droga se reduce. (Salamone y Correa, 2002)

Todos estos datos apuntan a la DA en el NAc como la encargada de regular los aspectos motores de la motivación, relacionados con la aproximación al estímulo motivante así como con la relevancia del estímulo o "wanting", más que con el placer o el impacto hedónico. (Correa et al., 2002; Berridge y Robinson, 1998; Berridge y Robinson, 2003; Zhang et al., 2003)

5.2. Opioides

Otra familia de moléculas posiblemente involucradas en la regulación de la motivación, específicamente la relacionada con la ingesta de alimento, es la de los péptidos opioides (Op). Entre los miembros de esta familia se encuentran las encefalinas (ENK) y las endorfinas (END). A diferencia de la DA, los Op parecen estar modulando la parte placentera, el impacto hedónico del alimento. Esta sugerencia se formuló principalmente por el grupo de Ann Kelley y de Kent Berridge. Se ha visto que la administración de morfina (opioide, agonista opioidérgico) de forma intracerebroventricular y sistémica favorece el consumo de agua azucarada y los patrones de reactividad gustativa que se presentan ante el consumo del líquido, dichos estudios se realizaron en ratas (Peciña y Berridge, 1995). Los patrones de reactividad son conjuntos de conductas hedónicas y aversivas que pueden ser usadas para medir el impacto hedónico de un sabor. Existen datos en humanos que apoyan la función de los Op en el impacto hedónico. Por ejemplo que la naltroxona (antagonista opioidérgico) administrada de forma sistémica en humanos suprime las calificaciones subjetivas de la palatabilidad de un alimento apetitoso (alimento de alta energía como los que contienen grasa y azúcar). Kelley y Berridge se dieron a la tarea de encontrar el sustrato fisiológico en el sistema nervioso central de la función de los opioides sobre la modulación de la ingesta de alimento, en su parte hedónica. Entre los candidatos se encontraban la amígdala y el NAc. Se realizaron administraciones de agonistas opioidérgicos directamente en estas dos estructuras y lo que se encontró fue un incremento significativo de la ingesta de alimento,

específicamente de un alimento apetitoso, así como un incremento en las reacciones conductuales placenteras (Soderpalm y Berridge, 2000; Kelley et al., 2002; Peciña y Berridge, 2000). Dicho efecto parece ser mediado por los receptores μ opioidérgicos. (Tanda et al., 1997) Bajo esta línea de investigación se sometió a ratas a una dieta a base de chocolate y posteriormente se midió la expresión genética de las ENK. Los resultados se compararon con los de ratas alimentadas con su dieta normal. Esta expresión se vió reducida en el estriado ventral (NAc), hecho que refleja una habituación del sistema opioidérgico a la comida altamente energética (Kelley et al., 2003). Toda esta evidencia fortalece la hipótesis sobre la participación del sistema opioidérgico en la regulación del impacto hedónico del estímulo alimenticio.

5.3. GABA (ácido gama aminobutirico)

El 95% de las células principales del NAc son GABAérgicas y reciben proyecciones glutamatérgicas de la Amy, hipocampo (Hipp por sus siglas en inglés) y PfCtx. Es probable que tanto la DA y los Op's en el NAc, que comparten propiedades inhibitorias, puedan ejercer su efecto positivo sobre la ingesta de alimento a través de una potenciación de la actividad GABAérgica o de un bloqueo de las aferencias glutamatérgicas (Martín et al., 1998). A partir de este supuesto, se abrió una nueva línea de investigación para averiguar cuál es la función del GABA en el NAc sobre la ingesta de alimento. Se han realizado administraciones de agonistas GABAérgicos, tanto para el receptor GABA_A y GABA_B, en el NAcS de ratas como el muscimol, lo que produce es un aumento en la ingesta de

alimento (Stratford y Kelley, 1997; Soderpalm y Berridge, 2000). El muscimol hiperpolariza a las neuronas espinosas de mediano tamaño en el NAc a través de receptores postsinápticos. El aumento producido en la ingesta de alimento por el muscimol depende del sitio de inyección en el NAc (Hanlon et al., 2003). Por ejemplo, si se administra rostralmente aumenta la ingesta de alimento y conductas apetitivas, así como una facilitación del condicionamiento de lugar, lo contrario se ve cuando se administra caudalmente, lo que produce conductas aversivas. Esta bivalencia en los efectos del muscimol nos habla de la diferenciación del NAcS en la regulación de conductas motivadas, tanto apetitivas como aversivas (Reynolds y Berridge, 2002).

Para probar si la inhibición del NAcS es necesaria para que se presente un aumento en la ingesta de alimento, Maldonado-Irizarry en 1995 (Maldonado-Irizarry et al. 1995) observaron que el bloqueo de receptores a glutamato (AMPA y kainato) por medio de fármacos como el DNQX produce un aumento significativo en la ingesta de alimento (Maldonado-Irizarry et al., 1995).

El efecto de los agonistas GABAérgicos y antagonistas glutamatérgicos sobre la ingesta de alimento parece ser mediado por una activación del HL que, como ya se había mencionado es una estructura clásicamente relacionada con la regulación homeostática de la ingesta de alimento. Por ejemplo, la administración de MK-801 en el NAcS más una infusión de muscimol en el HL reduce el efecto del antagonista glutamatérgico. Otro dato que apoya fuertemente la relación funcional entre el NAcS y el HL es el hecho de que la infusión de muscimol en el NAcS

produce una activación de c-Fos (**ver anexo**) en neuronas orexinérgicas del HL (Maldonado-Irizarry et al., 1995; Baldo et al., 2004). (**Figura 8**)

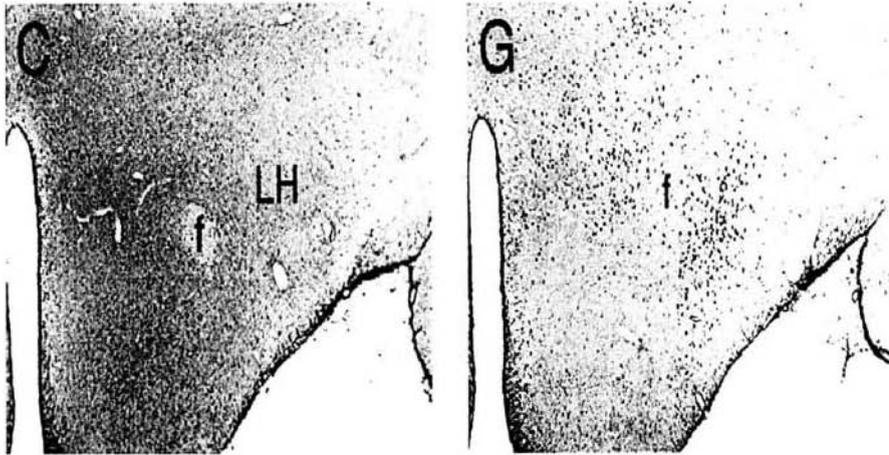


Fig. 8 Expresión de c-Fos en el HL de ratas administradas con muscimol (G) en el núcleo accumbens shell y de ratas administradas con vehículo (C) (Maldonado-Irizarry et al., 1995).

6. CANABINOIDES

6.1. Cannabis Sativa (Marihuana)

La *Cannabis Sativa*, mejor conocida como marihuana, es la droga ilegal de uso más frecuente en nuestra sociedad. Su consumo ha despertado todo tipo de polémicas, desde políticas hasta filosóficas, pasando por la moral y la religión. La Cannabis se ha estigmatizado o divinizado, de acuerdo con la época y las circunstancias, y sigue despertando ardientes discusiones. Sin embargo, dicha planta ha servido de ayuda médica durante cientos de generaciones (Brailowsky, 1995).

La primera descripción que encontramos de la planta data del 2737 a. C., por el emperador chino Shen Nung, quien prescribía la marihuana para el tratamiento de la gota, la malaria, algunos dolores y la falta de concentración. En lo relativo a la química de la cannabis se han identificado más de 400 sustancias sintetizadas por la planta, de las cuales más de 60 son cannabinoides. Los tres más abundantes son el canabidiol, el canabinol y varios derivados del tetrahidrocanabinol (Δ^9 THC o THC), que es el principal componente psicoactivo de la planta. Fumado el THC se absorbe rápidamente hacia la sangre, que la transporta al cerebro y de ahí al resto del organismo. La vida media del THC es de aproximadamente 19 horas, pero varios de sus metabolitos son detectados

durante días a semanas después de la última administración. Esta elevada persistencia del THC y sus metabolitos se debe a su gran solubilidad en las grasas, con la consecuente tendencia a acumularse en el tejido adiposo del cuerpo para después liberarse lentamente (Brailowsky, 1995, Ameri, 1998; Próspero-García et al., en Lydic y Baghdoyan, 1999).

En consumidores habituales de la marihuana, la memoria a corto plazo se encuentra deteriorada y la capacidad para realizar tareas que requieren secuencias precisas de movimientos se deteriora. El balance y el equilibrio también se alteran. Los fumadores de marihuana reportan frecuentemente más apetito, sequedad de la boca y garganta, aumento de la frecuencia cardíaca, enrojecimiento de los ojos y mayor agudeza sensorial. Otro problema, ligado al uso crónico de marihuana, que ha recibido mayor confirmación es el llamado síndrome amotivacional. Este se ha descrito como un cuadro de apatía generalizada (Brailowsky, 1995; Próspero-García et al., en Lydic y Baghdoyan, 1999)

6.2. Fisiología de los cannabinoides

El principal componente psicoactivo de la cannabis, el Δ^9 THC, fue aislado en forma pura hace más de 30 años, en 1964, por el químico Rafael Mechoulam (Mechoulam, 1970). Sin embargo, las bases bioquímicas de la actividad cannabinérgica permaneció como un enigma por algunas décadas, hasta que a

finales del los ochentas, en 1988, se logra identificar el receptor por el cual el THC ejerce su efecto en el cerebro (Devane, 1988). A este receptor se le llamó receptor a cannabinoides 1 o CB1 (Martín et al., 1999). Este receptor es metabotrópico de siete dominios transmembranales acoplado a una proteína G inhibitoria (Gi), la cual inhibe a la adenilato ciclasa y bloquea los canales de calcio importantes para que se presente la despolarización y una posible liberación del neurotransmisor (Ameri, 1998; Mechoulam et al., 1998; Wilson y Nicoll, 2002; Schickler y Kathmann, 2001) (**Figura 9**).

El CB1 es uno de los receptores más abundantes en el sistema nervioso central y se expresa en altos niveles en el hipocampo, el cerebelo, hipotálamo, corteza cerebral y los núcleos de la base. De importancia para este trabajo es que el CB1 se expresa en el estriado ventral, mejor conocido como Núcleo Accumbens (Petit et al., 1998; Moldrich y Wenger, 2000; Hermann et al., 2002) (**Figura 10**). Esta localización hace suponer que los efectos del THC sobre la memoria y la motricidad, así como en la motivación, sean mediados a través de este receptor (Ameri, 1998). Un segundo receptor a cannabinoides (CB2) acoplado a proteína Gi parece estar ausente en el sistema nervioso central pero se encuentra en concentraciones altas en el sistema inmunológico.

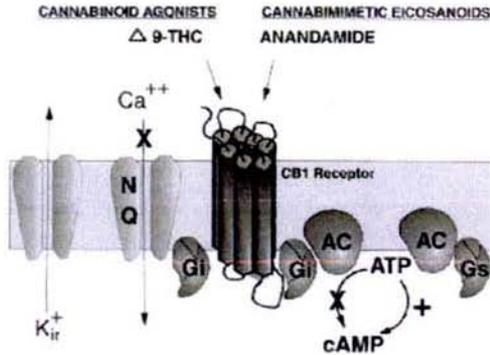


Fig. 9 Esquema que muestra al receptor a cannabinoides 1 (CB1) y las moléculas que activa. Gi proteína G inhibidora, AC adenilato ciclasa, ATP adenosin trifosfato, cAMP adenosin monofosfato ciclico, Kir canales de potasio, N Q canales de calcio.

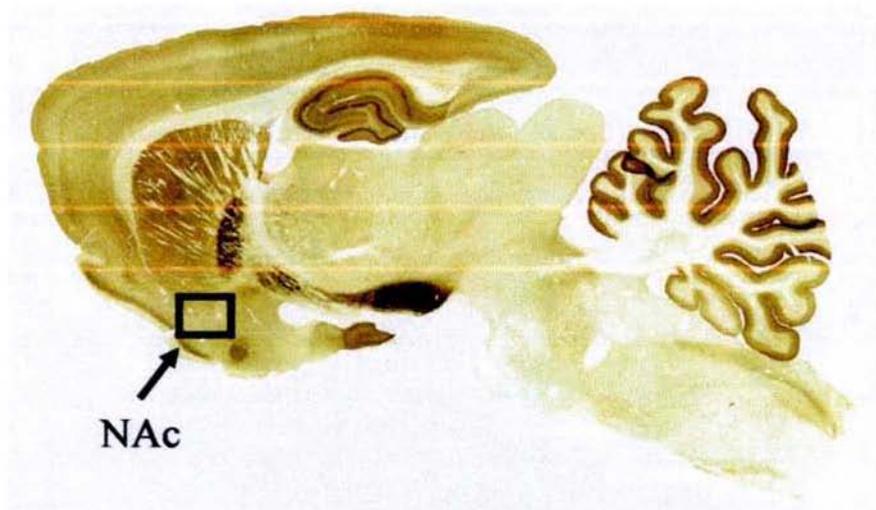


Fig. 10 CB1 en el NAc detectado por inmunohistoquímica en un corte sagital de cerebro de rata

A partir de la caracterización del CB1 se han descrito varios ligandos endógenos de naturaleza lipídica, los llamados endocannabinoides. Entre ellos se encuentran la anandamida (ANA), cuyo nombre en sánscrito significa “el que trae bendición y tranquilidad eterna”; aislada en 1992 (Devane et al., 1992) y el 2-araquidonil glicerol (2-AG) en 1995 (Mechoulam et al., 1995). ANA fue aislada del cerebro del cerdo y el 2-AG de intestino canino. La oleamida (OLE) fue caracterizada como un factor inductor de sueño ya que fue aislada de gatos privados de sueño en 1995 (Cravatt et al., 1995). Así, existen otros lípidos con propiedades canabimiméticas como el noladin eter, virodamina y el N-araquidonil dopamina (Mechoulam et al., 1998; Matsuda et al., 1990). Estos ligandos no son almacenados en vesículas como otros neurotransmisores (GABA, ACh) sino que son producidos a demanda (Wilson y Nicoll, 2000). Esto quiere decir que se producen al instante en el que el sistema lo requiera; se sintetizan en respuesta a la despolarización y a la consecuente entrada de calcio (Schlicker y Kathmann, 2001). Es importante decir que se sintetizan a partir de ácido araquidónico, un elemento constituyente de la membrana celular que como recordaremos es una bicapa lipídica. La ANA se produce de la hidrólisis de N-araquidonil-fosfatidiletanolamida catalizada por una fosfolipasa D. El 2-AG tiene dos vías de síntesis, una independiente de la acción de fosfolipasa C y posiblemente a través de la acción del diacilglicerol (DAG). La otra vía involucra directamente a la fosfolipasa C (Mechoulam et al., 1998). Los endocannabinoides fueron considerados principalmente como mensajeros retrógrados, es decir, se sintetizan en la postsinapsis y tienen su acción en la presinapsis, aunque ahora se sabe que también ejercen efectos en la postsinapsis. Dependiendo del circuito neuronal, los

endocannabinoides pueden activar o inhibir la neurotransmisión. Se piensa que la despolarización de la membrana postsináptica de las neuronas es clave para la síntesis y liberación de los endocannabinoides, los cuales difunden a la membrana presináptica en donde se unen al CB1, lo que causa una inhibición de las señales glutamatérgicas o GABAérgicas (Wilson y Nicoll, 2001). La vida media de los endocannabinoides en el espacio extracelular es limitado por un rápido proceso de eliminación que consiste de una recaptura específica dentro de la célula a través de un transportador y una subsiguiente degradación por la amida hidrolasa de los ácidos grasos (FAAH). Los receptores a cannabinoides, los endocannabinoides y las proteínas necesarias para sus biosíntesis y degradación constituyen el sistema endocannabinérgico. (Ameri, 1998; Mechoulam et al., 1998; Martín et al., 1999)

(Figura 11)

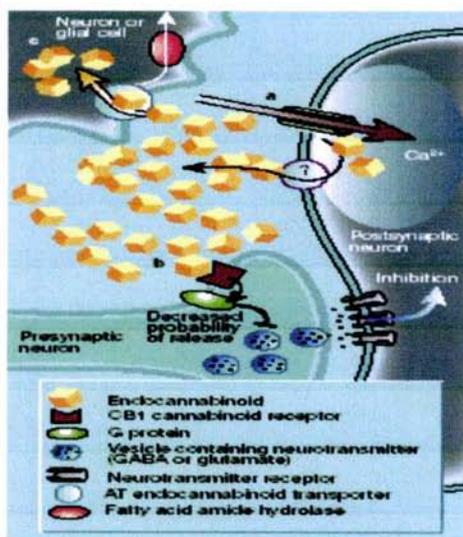


Fig 11 Esquema del sistema canabinérgico y de su mecanismo de acción a nivel celular. Vaughan, 2001.

La ANA es la que posee mayor afinidad al CB1 pero no es tan potente como el 2-AG (Di Marzo et al., 2001). Estos dos endocannabinoides han sido los más estudiados y de los que se puede encontrar mayor bibliografía. Por otro lado, la OLE no ha recibido la atención merecida, perdiéndose en discusiones sobre si debe o no ser catalogada como endocanabinoide. Sin embargo, se sabe que se une al CB1 (Leggett et al., 2004) y comparte muchas de las características de canabinoide endógeno tipificado por anandamida (Fowler, 2004). La OLE tiene efectos sobre receptores serotoninérgicos (5-HT₂ y 5-HT₇) (Cheer et al., 1999; Thomas et al., 1999) y sus mecanismos de acción así como su función potencial aún esta por dilucidarse, aunque se ha postulado que puede estar interactuando directamente con las proteínas G (Fedorova et al., 2001). De la ANA se conoce que aparte de pegarse al CB1 tiene efectos a través del receptor Vaniloide (VR1), cuyo ligando es la capsaicina (molécula que se encuentra en los chiles) (Di Marzo et al., 2001) y se ha demostrado su pegado a receptores colinérgicos metabotrópicos, los llamados muscarínicos, específicamente al M1 y M4 (Christopoulos y Wilson, 2001). A los endocannabinoides (ANA y 2-AG) se les ha adjudicado un papel neuroprotector dentro del sistema nervioso central. Es decir, como un mecanismo de defensa contra los insultos ambientales, aunque existe evidencia en contra, esto es, como posibles neurotóxicos (Ameri, 1998; Iversen, 2003).

La OLE es ambientalmente ubicua, se encuentra en una gran variedad de aceites vegetales y es usada como lubricante industrial. Existe evidencia de la síntesis *de novo* de OLE por parte de los microsomas cerebrales. Se ha propuesto

que OLE puede inhibir competitivamente el catabolismo de ANA que lleva a cabo la FAAH. La oleamida tiene claras propiedades hipnóticas, se ha observado que la latencia al sueño se reduce con OLE sin modificar el tiempo total del sueño de movimientos oculares rápidos (Murillo-Rodríguez et al., 1998). A pesar de todos estos datos, aún no queda claro si su única función es la de inductor de sueño. En este trabajo nosotros postulamos a OLE como un posible regulador de la ingesta de alimento debido a sus propiedades canabiméticas.

6.3. Canabinoides y el sistema de reforzamiento: evidencias electroquímicas y conductuales

Como ya se mencionó, el sistema canabinérgico está ampliamente distribuido en todo el cerebro. Está presente en estructuras involucradas con la motivación, memoria y control motor. A continuación se explicará a partir de los datos existentes como este sistema puede estar regulando ciertas conductas motivadas, en específico la ingesta de alimento. Se iniciará por una breve descripción de los datos electrofisiológicos de la interacción entre los endocannabinoides y las estructuras del llamado sistema de reforzamiento (NAc, VTA, PfCtx) (Kelley y Berridge, 2002).

Las drogas de abuso, como el THC, actúan a través del sistema de recompensa que regula a la motivación por incentivo de los reforzadores naturales, como la comida y el sexo (Kelley y Berridge, 2002). Lo que reportan sujetos que han ingerido THC es un aumento en el apetito, entre otros tantos

efectos. Todo parece indicar que al momento de actuar, el THC modifica al sistema de tal forma que también afecta a los reforzadores naturales (Gardner y Lowinson, 1999; Van der Stelt y Di Marzo, 2003). Es de esperarse entonces, que como contamos con un sistema endógeno de cannabinoides, una de las funciones que desempeñarían sería la regulación de la ingesta de alimento (Mechoulam y Fride, 2001).

Debido a sus características fisiológicas, la modulación de la motivación por parte del sistema endocannabinérgico tendría que estar ocurriendo a través de la interacción con otros sistemas de neurotransmisión; por ejemplo, DA, GABA, glutamato (GLU), Op y acetilcolina (ACh).

Es generalmente aceptado que todas las drogas de abuso aumentan la DA extracelular en el NAc y que esta acción contribuye a sus propiedades reforzantes. (Pontieri et al., 1995). Los cannabinoides (exógenos y endógenos) también tienen efectos sobre la actividad electroquímica del NAc (Chen et al., 1993; Szabo et al., 1999). Se ha demostrado que los cannabinoides activan la liberación de DA en la PfCtx y el NAc, esto a través de la excitación del VTA (French et al., 1997), aunque permanece en controversia si este efecto es mediado por el CB1 o por receptores opioidérgicos μ (French, 1997; Tanda et al., 1997; Gessa et al., 1998). Sin embargo, se ha propuesto que la interacción entre cannabinoides y DA podría explicar el factor adictivo que tiene el THC, aunque falta por aclarar cuál es la fisiología de esta interacción (Van der Stelt y Di Marzo, 2003; Maldonado y

Rodríguez de Fonseca, 2002). Otro dato que apoya esta relación es que el tratamiento crónico con THC facilita la formación de ANA en estructuras límbicas. Esta respuesta puede ser mediada por DA a través de los receptores D2 (Patel et al., 2003).

El sistema canabinérgico también interactúa con la transmisión GABAérgica en el NAc. El CB1 se encuentra presente en las prolongaciones colaterales de las células espinosas de mediano tamaño del NAc (células GABAérgicas) que inervan a otras células principales del mismo núcleo. Se ha observado en preparaciones *in vitro* del NAc y VTA de ratón y de rata es que la administración de canabinoides reduce las corrientes inhibitorias producidas por GABA, lo que sugiere una posible función desinhibitoria por parte de los canabinoides en el NAc. (Szabo et al., 2002; Manzoni y Bockaert, 2001, Hoffman y Lupica, 2000). Tomemos como ejemplo a dos células principales del NAc: MSNa y MSNb. La función de MSNa es inhibir por medio de sus colaterales a MSNb. La activación del CB1 presináptico en MSNa la hiperpolariza, lo que trae como consecuencia una reducción en la liberación de GABA en dicha célula y una excitación de MSNb que proyecta a otras estructuras (p. e. Hyp) (Lupica et al., 2004)

El CB1 esta ampliamente distribuido en regiones que brindan innervaciones excitadoras al NAc, tales como la Amy, el Hipp y la PfCtx (Glass et al., 1997). Se ha observado que los canabinoides, en común con otras drogas de abuso, inhiben la excitabilidad de las neuronas de la PfCtx (Pistis et al., 2001, Lupica et al., 2004).

En resumen, los cannabinoides inhiben la liberación de glutamato y GABA en el NAc. Sin embargo, aún esta por determinarse de que depende que sea uno u otro. Independientemente de esto, el resultado será una prevalencia en la actividad GABAérgica que, posiblemente traiga como consecuencia una inhibición de las estructuras a donde proyecten las células del NAc. **Figura 12** (Lupica et al., 2004)

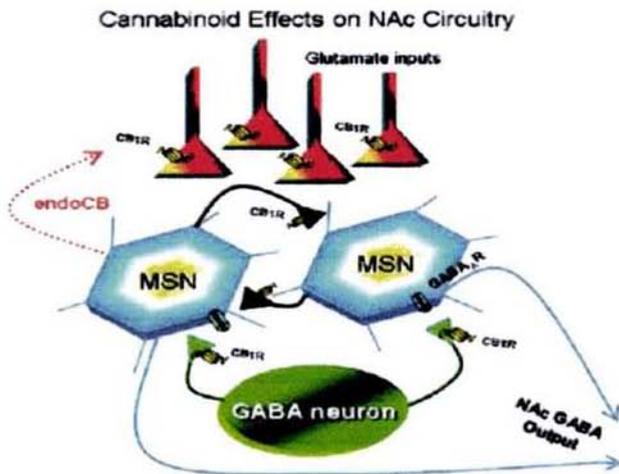


Fig. 12 Esquema que muestra la localización del CB1 en el NAc (Lupica et al., 2004)

Estos datos nos sirven para entender como los cannabinoides (exógenos y endógenos) afectan fisiológicamente al sistema de reforzamiento, y pueden explicar el efecto farmacológico del THC por lo que tiene propiedades adictivas al interactuar con otros sistemas de neurotransmisión. Pero sólo los datos conductuales nos servirán para verificar la función de los cannabinoides endógenos en la regulación de los reforzadores naturales, como el alimento.

La combinación de mecanismos centrales y periféricos modulan la ingesta de alimento y el consumo de energía para mantener el metabolismo y la composición corporal en los mamíferos. Se necesita al menos dos sistemas para su regulación: el primero, encargado de la detección de un déficit, a este sistema también podemos llamarlo Sensor Homeostático; el segundo, encargado de la ejecución de conductas dirigidas hacia una meta que le permite al organismo buscar, aproximarse y consumir el alimento; funciona también como un Sensor Hedónico, éste es el llamado sistema de reforzamiento o recompensa. Como veremos adelante, las estructuras cerebrales involucradas en estos sistemas pueden ser claramente diferenciadas.

Como se ha mencionado, uno de los efectos del THC sobre la conducta es el estimular la ingesta de alimento. Con el descubrimiento de los cannabinoides endógenos se abrió un campo de estudio relacionado a la función potencial de estas moléculas en la regulación de la ingesta de alimento. Así, se ha tratado de dilucidar el mecanismo por el cual el THC y los endocannabinoides ejercen su acción sobre la alimentación.

Mucho de nuestro conocimiento del sistema endocannabinérgico es debido a reportes de los efectos de la marihuana en los humanos. El primer reporte de que la marihuana incrementaba el apetito data del año 300 a. C. (Brailowsky, 1995). Existe evidencia considerable que indica que el principal componente activo de la marihuana, el Δ^9 -THC, incrementa la ingesta de alimento, y su uso fue aprobado

en 1992 por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de Norteamérica para el tratamiento de la anorexia que acompaña al cáncer.

Actualmente se ha tratado de dilucidar cuál es la función fisiológica del sistema endocannabinérgico sobre la modulación de la ingesta de alimento. Para esto se han realizado distintos estudios con el uso de agonistas y antagonistas cannabinérgicos, así como el uso de animales modificados genéticamente y en distintos paradigmas conductuales (Kirkham, 2003; Higgs et al., 2002; Kunos y Batkai, 2001; McGregor et al., 1998).

La conducta alimenticia se puede dividir en dos fases: la fase apetitiva, donde el animal trabaja por el alimento; y la fase consumatoria, donde el animal consume o ingiere el alimento. (Figura 13)

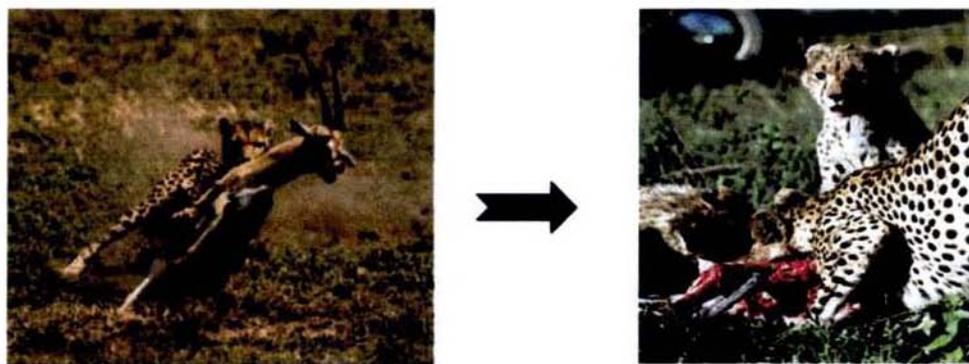


Fig. 13 Fases de la ingestión de alimento. Izquierda: fase de aproximación. Derecha: fase de consumación.

En 1999 Williams y Kirkham mostraron por primera vez que la administración aguda de ANA de forma sistémica producía una marcada hiperfagia en ratas, dicho efecto es mediado por el CB1 (Williams y Kirkham, 1999). Este dato junto a otros como que el Δ^9 -THC produce un aumento en el consumo de alimento en humanos y en animales de laboratorio y que el SR141716A, un antagonista del receptor CB1, provocaba el efecto inverso, es evidencia clara acerca de la potencial función de los endocannabinoides en la ingesta de alimento (Williams y Kirkham, 2002). Sin embargo faltaría por descubrir el sitio donde estas moléculas ejercen su efecto orexigénico.

El Hyp es la estructura en el sistema nervioso central que originalmente se demostró estar relacionada con la ingesta de alimento. En esta estructura convergen señales orexigénicas como el NPY, MCH, ORX, entre otras; y de saciedad como leptina y CART. El sistema endocannabinérgico ha sido descrito en esta misma región. El ARN mensajero del CB1 ha sido detectado en el Hyp co-expresándose con neuropéptidos como el CART, MCH y la preproorexina (Cota et al., 2002). En ratones que no expresan el CB1 se ha observado una marcada hipofagia que va en conjunto con una alta tasa de mortalidad, así como un incremento significativo en los niveles del ARN mensajero de CRH en el HPV, y una marcada reducción en el mensajero de CART en el HL, comparados con la cepa silvestre (Cota et al., 2002; Di et al., 2001). Entonces, parecería lógico que si el efecto hiperfágico de los cannabinoides fuera mediado por el sistema nervioso central, la estructura candidata sería el Hyp. Se ha observado que la restricción

alimenticia por 24 horas, estado donde las señales de saciedad se encuentran a la baja, produce un aumento en las concentraciones de 2AG pero no de ANA en el Hyp, lo que sugiere un efecto diferencial de ambos endocannabinoides y una posible interacción con señales de saciedad (Kirkham et al., 2002).

Para comprobar esta hipótesis el grupo de Di Marzo se dio a la tarea de estudiar la interacción entre el sistema endocannabinérgico y leptina. Ellos utilizaron ratones que no expresaran los genes que codifican para leptina y su receptor (*ob/ob* y *db/db*, respectivamente) para observar como se encontraban las concentraciones de ANA y 2AG. Lo que encontraron fue un aumento de estas dos moléculas en el hipotálamo, específicamente en el ventromedial. Posterior a este experimento administraron distintas dosis de leptina y midieron de igual forma a los dos endocannabinoides, dando como resultado una baja en sus concentraciones. Esto sugiere fuertemente una regulación a la baja de los endocannabinoides a causa de leptina (Di Marzo et al., 2001). Jamshidi y Taylor en el 2001 encontraron que la ANA administrada directamente en el VMH, que es el principal sitio de acción de leptina, producía un incremento en la ingesta de alimento (Jamshidi y Taylor, 2001). Esta fue la primera evidencia de una interacción entre señales de saciedad y los endocannabinoides. Adicionalmente da la primera localización a nivel del sistema nervioso central de los efectos de la ANA sobre la ingesta de alimento. Sin embargo, la presencia del sistema canabinérgico en estructuras del llamado sistema de reforzamiento sugería a los investigadores que la regulación homeostática de la ingesta de alimento mediada

por el Hyp parecería no ser la única forma en la que estos lípidos ejercieran su acción.

Existe evidencia donde se indica que el agonismo y antagonismo del CB1 produce un efecto en los aspectos apetitivos y consumatorios del proceso de reforzamiento. El uso de agonistas favorece la conducta de búsqueda de alimento, es decir, aumentando el esfuerzo que tiene que realizar un animal para conseguir alimento. Pareciera ser que la activación del sistema endocannabinérgico modifica el valor del reforzador. Los datos anecdóticos de consumidores de marihuana apoyan esta hipótesis, ellos reportan un aumento en la palatabilidad de los alimentos, en otras palabras se puede decir que los alimentos les parecen más "sabrosos", favoreciendo así el consumo de alimento con alto valor energético como chocolates, dulces y galletas.

Las moléculas que clásicamente han estado relacionadas con el consumo de alimentos altamente energéticos son los opioides. Se ha observado que la administración de agonistas opioidérgicos en humanos y roedores produce un aumento en el consumo de alimentos como el chocolate. El sitio de acción de este efecto parece ser el núcleo accumbens en su porción shell. Este tipo de datos son de gran importancia ya que la hiperfagia se ha visto que se presenta en animales saciados, lo que sugiere que el valor homeostático no parece intervenir en este proceso, sino más bien sería el solo placer producido por el consumo de esa clase de alimentos. Existen reportes que mencionan una interacción entre los sistemas opioidérgico y cannabinérgico, necesaria para la regulación de la ingesta de

alimento, como por ejemplo que hay un sinergismo entre la naloxona y el SR141716A para la reducción de la ingesta de alimento (Kirkham y Williams, 2001).

Se ha reportado que agonistas GABAérgicos y antagonistas glutamatérgicos administrados independientes en el NAcS producen hiperfagia. El mecanismo de estos fármacos es potenciar la actividad inhibitoria de este núcleo. Estos son datos electroquímicos que apoyan los estudios conductuales que relacionan a los endocannabinoides con el sistema de reforzamiento (Gallate et al., 1999)

En un estudio realizado en el 2002 (Kirkham et al., 2002) se reportan los cambios en los niveles cerebrales de endocannabinoides (ANA y 2-AG) en diferentes estructuras cerebrales como el Hyp, el cerebro basal anterior (conteniendo al NAc) y el cerebelo como control. Estas mediciones se realizaron en distintas fases de la ingesta de alimento: en privación de alimento y en saciedad, mientras que las ratas estaban comiendo un alimento sabroso y en ratas control. Los cambios que se observaron fueron los siguientes: en el cerebro basal anterior los niveles de anandamida y 2-AG aumentaron cuando las ratas estaban privadas de alimento. En el Hyp solo se registró un alza en los niveles de 2-AG pero no de ANA durante el mismo estado. El cerebelo se mantuvo sin cambios. En la condición donde las ratas comían algo sabroso, el único cambio significativo que se encontró fue en el Hyp y fue una baja en los niveles de 2-AG comparados con el control. Estos resultados indican que los endocannabinoides regulan la

ingesta de alimento en su fase inicial, es decir, parece que están influyendo en la generación de conductas apetitivas lo cual produciría un aumento en el consumo de alimento. En este mismo estudio, se administró 2-AG directamente en el NAcS de ratas saciadas y se midió el consumo de alimento. Encontraron un efecto estimulante de la ingesta de alimento, es decir, un aumento en el alimento ingerido comparado con ratas a las cuales se les administro vehículo. Dicho efecto fue bloqueado por el SR141716A (Kirkham et. al., 2002). En nuestro laboratorio hemos seguido esta línea de investigación y observamos que ANA y OLE cuando se administra en el NAcS producen una marcada hiperfagia. Dicho efecto parece ser mediado por una coactivación de áreas hipotalámicas.

En este momento existe una considerable evidencia que respalda los datos anecdóticos acerca de los cannabinoides (exógenos y endógenos) y su posible regulación de la ingesta de alimento. El sistema endocannabinérgico está presente en el sensor homeostático y en el sensor hedónico que en conjunto forman el sustrato de la motivación. El mecanismo exacto por el cual estas moléculas afectan a este sistema aún está por aclararse. Es también necesario, delimitar la fase de la conducta alimenticia a la que afectan los endocannabinoides. Pero algo sí es seguro, son necesarios para modular la alimentación. Y se puede sugerir que un sistema cannabinérgico disfuncional puede contribuir a que se presenten desordenes psiquiátricos como la anorexia nerviosa.

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque aún está por determinarse la función del sistema endocannabinérgico en la regulación de la motivación, en este caso la relacionada con la ingesta de alimento, existe bastante evidencia que respalda el papel de los endocannabinoides como moléculas potenciales involucradas en los aspectos apetitivos y consumatorios de la alimentación. Se ha sugerido que su participación está mediada por estructuras del sistema de reforzamiento o recompensa o por estructuras clásicamente relacionadas con la ingesta de alimento como el Hyp. Hay datos que apoyan ambas hipótesis, sin embargo falta por aclarar si el efecto de los endocannabinoides sobre la ingesta de alimento depende de la interacción de ambos sistemas y si este efecto es exclusivo de un solo endocanabinoide.

Por esta razón nos planteamos la siguiente hipótesis:

7.1. Hipótesis

La Anandamida y la oleamida administradas en el Núcleo Accumbens Shell producen un incremento en la ingesta de alimento y una activación de áreas hipotalámicas relacionadas con esta conducta en ratas.

Para probar la hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

7.2. Objetivos

Administrar ANA y OLE en tres diferentes dosis (0.1, 1.0 y 10.0 μg) en el NAcS y evaluar la ingesta de alimento durante 4 horas, midiendo cada hora la cantidad de alimento ingerido.

Administrar ANA y OLE el NAcS en una determinada dosis y contar células inmunoreactivas a c-Fos en el núcleo arcuato, hipotálamo paraventricular e hipotálamo lateral para tratar de establecer una relación funcional entre el NAc y el Hyp.

8. MÉTODO

8.1. Sujetos

Se utilizaron 100 ratas macho de la cepa Wistar de 250 a 300 gramos de peso.

Se mantuvieron en ciclo invertido 12/12 (las luces se encienden a las 8 p.m.) y a una temperatura constante de 22° C.

8.2. Fármacos

- Araquidoniletanolamida o anandamida (ANA), en tres diferentes concentraciones: 0.1, 1.0 y 10.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- cis-9,10-octadecenoamida u oleamida (OLE), en tres diferentes concentraciones: 0.1, 1.0 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- Se utilizó como vehículo (VEH) etanol al 5% en solución salina.

Ambos endocannabinoides fueron obtenidos de la casa comercial Sigma Aldrich, St Louis MO. EUA.

8.3. Aparatos

Bomba de Infusión KD Scientific.

Jeringas Hamilton de 10 μ l.

Crióstato Leica.

Báscula Ohaus CS-200.

Aparato estereotáxico

8.4. Procedimiento

Las ratas fueron sometidas a cirugía estereotáxica e implantadas bilateralmente en el NAcS (AP:+2, L:-1 y DV:-6); las coordenadas fueron obtenidas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson. Las cánulas (acero inoxidable de 23 gauge (diámetro interno) y de 1 cm) quedaron colocadas en la parte superior del NAcS y solo hasta el día de la administración hicimos contacto con este núcleo bajando el inyector 1.5 mm desde la punta de la cánula. Posterior a la cirugía las ratas fueron alojadas en cajas individuales de acrílico transparente y mantenidas con agua y alimento *ad libitum*. Los experimentos se realizaron después de 10 días de recuperación. Los fármacos se administraron (0.2 μ l / min. en 5 min.) al inicio de la fase de oscuridad (8 a.m.), que es el periodo de mayor actividad de la rata y donde se registra el mayor consumo de alimento.

El estudio constó de dos experimentos:

Experimento 1

Evaluación de la ingesta de alimento con la administración de endocannabinoides.

GRUPOS	DOSIS $\mu\text{g}/\mu\text{l}$		
ANA	0.1 (N=10)	1.0 (N=10)	10.0 (N=10)
OLE	0.1 (N=10)	1.0 (N=10)	10.0 (N=10)
VEH	1.0 μl (N=10)		

Se realizó una curva dosis respuesta para determinar la dosis efectiva. Las dosis de los fármacos fueron administradas directamente en el NAcS de las ratas en forma bilateral. El orden de las administraciones fue de forma contrabalanceada. Posterior a la administración, a cada rata se le pesó alrededor de 50 gramos de alimento en forma de pellets (Rat Laboratory Chow), los cuales se le colocaron en la reja de su caja. La primera medición se realizó una hora después de la administración de cada rata, y así sucesivamente durante cuatro horas, midiendo hora por hora. Al final de las cuatro horas se contó el alimento total ingerido por la rata.

Para verificar la posición de las cánulas las ratas fueron perfundidas con 200 ml de paraformaldeido al 4% y con buffer de fosfatos (PBS 0.01M). Los cerebros fueron extraídos y colocados en refrigeración para posteriormente ser cortados, con ayuda de un crióstato. Se tomaron rebanadas de 50 μ cuando el tracto de la cánula era visible. Los cortes se tiñeron con violeta de cresilo. Las ratas que no estaban implantadas en el sitio correcto fueron desechadas del experimento y sustituidas hasta alcanzar la N de 10 correspondiente a cada grupo.

Experimento 2

Activación de áreas hipotalámicas con la administración de endocannabinoides.

Utilizamos la dosis de 1.0 μ g para los dos endocannabinoides porque fue la concentración mas efectiva durante la primera hora de medición.

GRUPOS	DOSIS μ g/ μ l	
ANA	1.0 (N=5) Con alimento	1.0 (N=5) Sin alimento
OLE	1.0 (N=5) Con alimento	1.0 (N=5) Sin alimento
VEH	1.0 μ l (N=5) Con alimento	1.0 μ l (N=5) Sin alimento

Los grupos se dividieron de esa forma (con alimento y sin alimento) para reducir las variables que pudieran afectar la expresión de c-Fos. En este caso, el alimento mismo pudiera causar una activación de c-Fos La forma de

administración fue idéntica a la del experimento 1. Después de una hora y media de la administración las ratas fueron perfundidas con el procedimiento ya descrito. Los cerebros fueron extraídos y seccionados en rebanadas a 50 μ . Los cortes fueron seleccionados con el objetivo de observar la posición de las cánulas y las áreas hipotalámicas de interés (núcleo paraventricular, núcleo arcuato e hipotálamo lateral) para posteriormente hacer inmunohistoquímica para c-Fos .

Inmunohistoquímica para c-Fos

Los cortes ya seleccionados se colocaron en pozos para cultivo celular (Corning Incorporated COSTAR®) y fueron lavados tres veces (10 minutos cada lavada) en Tritón-PBS al 3%. Enseguida de esto se incubaron por 48 horas a 4° con el anticuerpo primario; c-Fos H-125 rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology) mas Tritón-PBS y suero normal de cabra. La dilución fue de 1:1000. Los cortes fueron lavados tres veces con Tritón-PBS e incubados por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario; anti-rabbit IgG anticuerpo biotinilado (Vectastain®). Las secciones se lavaron tres veces mas y se colocaron en el complejo AB (Vectastain®). Se lavan nuevamente y se revela con 3,3-diaminobencidina (Sigma Aldrich®) disuelto en TRIS-HCl pH 7.4 y agua oxigenada. Cuando los cortes adquieren un color café intenso se detiene la reacción lavando con PBS 0.1M, dos veces. Posteriormente, los cortes se montan en portaobjetos y se deshidratan con alcohol ácido para ser cubiertos y observados al microscopio.

El conteo de células inmunoreactivas a c-Fos se realizó con un microscopio Olympus y una cámara lucida.

Análisis estadístico

En el primer experimento se midió el consumo de alimento en ratas y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Los factores fueron: Fármaco (ANA vs. OLE vs. VEH) por hora de medición (1, 2, 3, 4).

Para el segundo experimento se midió la activación de c-Fos y se empleó un ANOVA de una vía. La prueba *Post Hoc* que se aplicó fue LSD. Nivel de significancia $p < 0.05$.

Todas las pruebas fueron realizadas con el programa Statistics para Windows.

9. RESULTADOS

Interacción entre ANA (0.1, 1.0 y 10 µg) y el vehículo durante las cuatros horas de medición de la ingesta de alimento.

Como se observa en la figura 12 la ANA en la dosis de 0.1 µg produjo un aumento significativo en la ingesta de alimento comparado con el VEH hasta la tercer hora después de su administración (4.7 ± 0.2 $p < 0.05$)

La dosis intermedia de ANA (1.0 µg) produjo un aumento significativo en la ingesta de alimento sólo durante la primera hora (4.2 ± 0.5 $p < 0.05$)

La dosis más alta (10.0 µg) no tuvo efecto sobre la ingestión de alimento en ninguna hora.

Al momento de contabilizar el total del consumo de alimento durante las cuatro horas, todas las dosis de anandamida fueron significativamente diferentes comparados con el vehículo. ANA 0.1 µg (11.5 ± 1.0 $p < 0.05$), ANA 1.0 µg (9.5 ± 1.0 $p < 0.05$) y ANA 10 µg (9.9 ± 1.1 $p < 0.05$). (**Figura 14**)

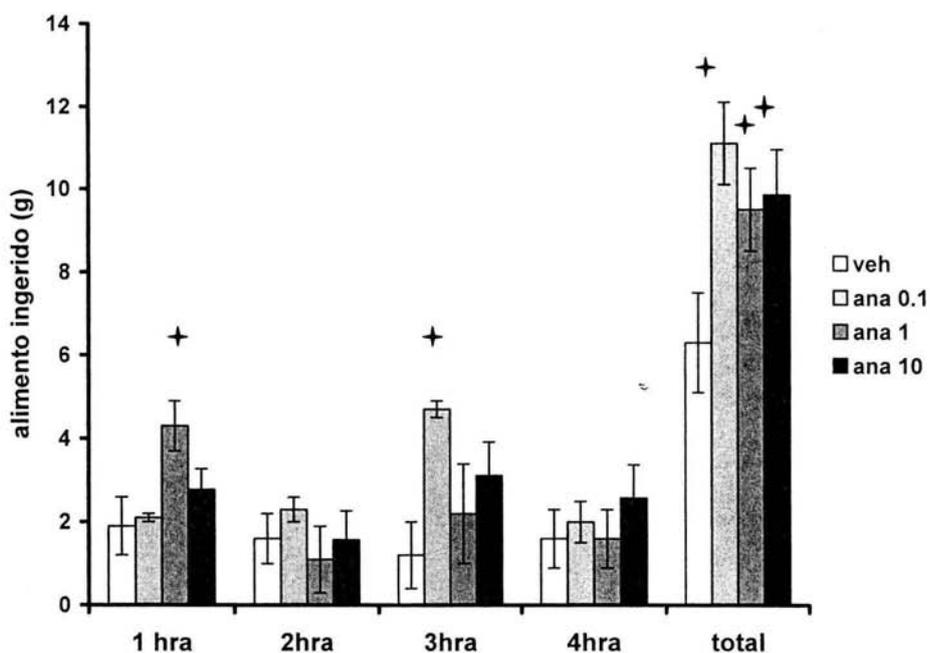


Fig. 14. Ingestión de alimento posterior a la administración de anandamida en el NAcS. Medias \pm error estándar.

Interacción entre OLE (0.1, 1.0 y 10 μ g) y el vehículo durante las cuatro horas de medición de la ingesta de alimento.

Las dosis de 0.1 μ g y de 1.0 μ g de oleamida no produjeron cambios significativos en la ingesta de alimento. Sin embargo la dosis de 10 μ g produjo un aumento significativo en la ingesta de alimento en la segunda hora (3.9 ± 1.0 $p < 0.05$) (Figura 15)

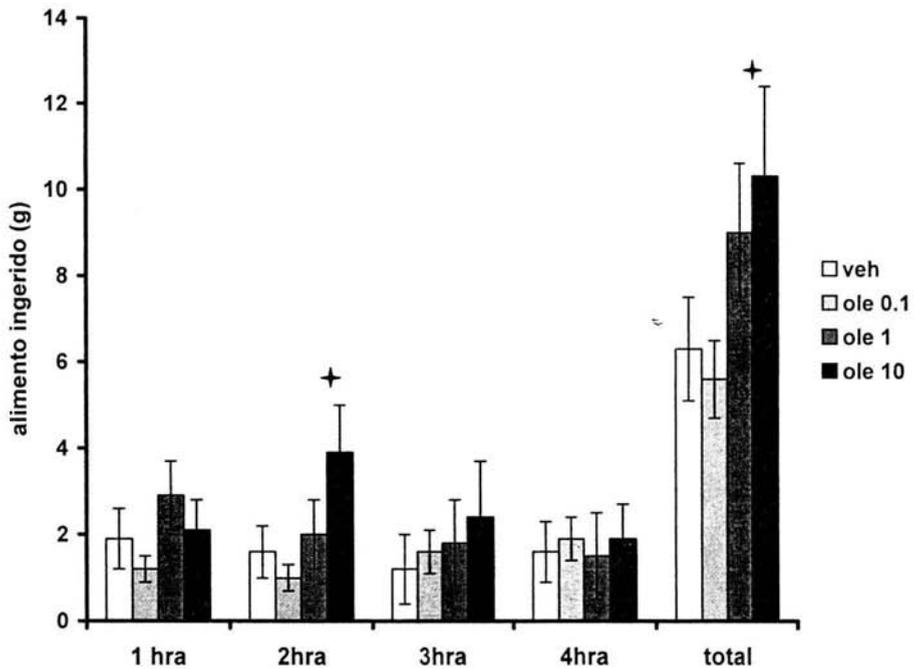


Fig. 15. Ingestión de alimento posterior a la administración de oleamida en el NAcS. Medias \pm error estándar.

Al momento de contabilizar el total del consumo de alimento durante las cuatro horas, solo la dosis de 10 μ g de oleamida fue significativamente diferente comparado con el vehículo. (10.3 ± 2.0 $p < 0.05$) (Figura 15)

c-FOS

La ANA y la OLE en la dosis de 1.0 μg administradas en el NAcS solo produjeron una activación del PVN en las dos condiciones: alimento disponible y alimento no disponible ($p < 0.05$) (Figuras 16, 17 y 18). No se observaron cambios en el HL ni en el ARC.

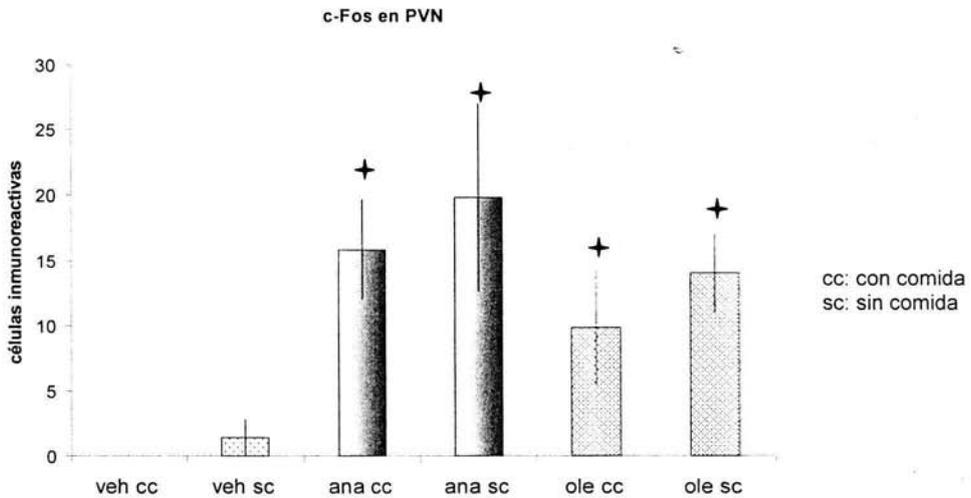


Fig. 16. Promedio de células positivas a c-Fos en el PVN.

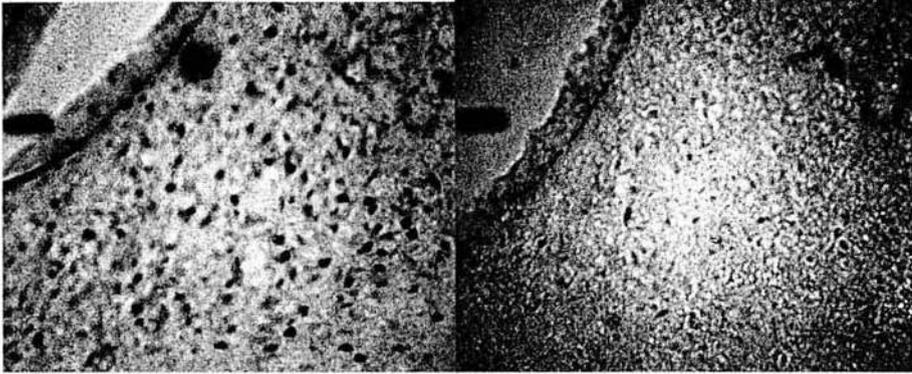


Fig. 17. PVN de ratas administradas con anandamida en el NAcS (izq) y con vehículo (der)

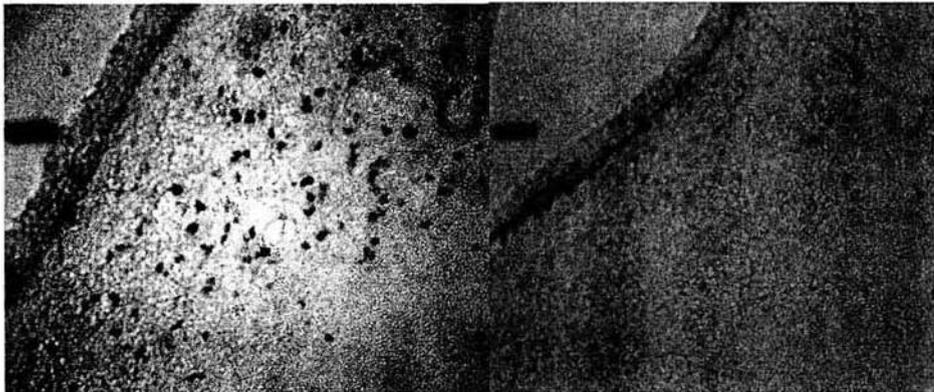


Fig. 18. PVN de ratas administradas con oleamida en el NAcS (izq) y con vehículo (der)

10. DISCUSIÓN

De acuerdo a la extensa literatura que hay sobre el tema, podemos concluir que el sistema canabinérgico está involucrado en la regulación de procesos cognoscitivos como la memoria, el aprendizaje y la motivación. Grandes avances se han hecho en este campo. Por ejemplo, estudios de manipulación genética, produciendo ratones que no expresan el CB1; administración de endocannabinoides, antagonistas, inhibidores de las enzimas involucradas en la síntesis así como en su degradación. Sin embargo, estos datos no serían de trascendencia si no existiera una conducta que observar. En nuestro proyecto, la conducta investigada es la de la ingestión de alimento, una de las conductas preferidas por los investigadores interesados en la motivación.

Como se mencionó en la introducción, la ingestión de alimento se puede dividir en distintas fases: fase de detección de un déficit energético o de la presencia de un alimento apetitoso, fase de aproximación al estímulo deseado, consumo del estímulo y fase de saciedad. Se cree que en esta secuencia de conductas participa el sistema de reforzamiento, también llamado de recompensa o comúnmente como sistema del placer. Este sistema está conformado por el Hyp, el VTA, el NAc y la PfCtx. Distintos sistemas de neurotransmisión también se han asociado específicamente con cada una de las fases. Podemos decir que la DA está involucrada en la detección de la relevancia del estímulo y con el trabajo que tenga que realizar el organismo para conseguir el alimento, el "wanting" en el

modelo de Berridge y Robinson (Berridge y Robinson, 2003). Los opioides están involucrados con el consumo de alimentos apetitosos, mientras que los neuropéptidos como el NPY y el AgRP funcionan como señalizadores del hambre. Asimismo entre las señales de saciedad están la leptina y la CCK (Schwartz et al., 2000).

Con todo, la función del sistema canabinérgico en la regulación de la ingestión de alimento ha sido poco esclarecida. Se sabe que la administración de anandamida en el VMH induce hiperfagia (Jamshidi y Taylor, 2001) y que cuando se administra 2AG en el NAcS produce el mismo efecto (Kirkham et al., 2002). Ahora, nuestros resultados muestran que la ANA y la OLE cuando se administran en el NAcS producen un aumento en el consumo de alimento y una activación del PVN. Lo que estos hallazgos indican es la cooperación entre sistemas; uno hedónico y otro homeostático, y su potencial regulación por el sistema canabinérgico.

A continuación se discutirán los datos obtenidos:

Anandamida

En general podemos decir que el efecto de la ANA cuando se administra en el NAcS, independientemente de la dosis, produce una marcada hiperfagia. Dicho efecto sólo se vio a lo largo de las tres horas siguientes a la administración. Sin

embargo, el NAcS parece ser susceptible a las distintas dosis de ANA ya que observamos un efecto diferencial a lo largo de las cuatro horas de medición.

La dosis de anandamida 0.1 μg sólo tuvo efecto sobre la ingestión de alimento hasta la tercera hora de medición, produciendo un aumento de más del 300% en el consumo de alimento; manteniéndose igual que el grupo control durante las dos primeras horas. En la cuarta hora, la ingestión de alimento volvió a sus niveles basales, ya que fue comparable con la ingestión de las ratas administradas con el vehículo.

La latencia para observar el efecto sugiere una interacción con otros sistemas de neurotransmisión como por ejemplo los péptidos opioides. Se ha observado que el $\Delta 9$ -THC induce liberación de dopamina en el NAc y que este efecto es bloqueado cuando se administra un antagonista opioidérgico que se refleja en la ingesta de alimento.

La dosis de ANA 1.0 μg tuvo su efecto durante la primera hora de medición. El aumento en la ingesta de alimento fue de un 100% comparado con el vehículo. Aunque este aumento no fue tan robusto como el de la dosis de 0.1 μg en la tercer hora. Este resultado coincide con el encontrado por Kirkham (Kirkham et al., 2002) con el 2 AG administrado en el NAcS donde ellos encuentran un aumento similar en la ingestión de alimento.

En la segunda hora de medición se registró una caída en la ingestión de alimento inclusive por debajo del control pero sin alcanzar significancia. Esto nos puede indicar que la administración exógena y masiva de ANA produce un desbalance en la homeostasis de los sistemas, por lo que se intenta restituir dicho balance.

En la tercera y cuarta hora de medición el consumo se mantuvo constante sin diferencias respecto al control.

La dosis de ANA 10.0 μg no tuvo efecto significativo sobre la ingestión de alimento en ninguna de las cuatro horas de medición. Sin embargo, el consumo de alimento se mantuvo arriba del control. De tal forma que si contabilizamos el total del alimento ingerido durante las cuatro horas podemos observar un efecto hiperfágico que alcanza significancia estadística.

Asimismo, en las dosis de 0.1 μg y de 1.0 μg se observa un efecto significativo sobre la ingestión de alimento si contabilizamos el total del alimento ingerido durante las cuatro horas en comparación con el VEH. Siendo la dosis de 0.1 μg la más potente produciendo un aumento de casi el 100%. Sin embargo estas diferencias debemos atribuírselas a las primeras tres horas ya que para la cuarta todos los grupos se estabilizan. Lo que sugiere que la anandamida es catabolizada en un tiempo máximo de tres horas.

Oleamida

La participación de la OLE en la regulación de la ingestión de alimento ha sido poco estudiada. Solo existe un trabajo, realizado en nuestro laboratorio (Martínez-González, 2004), en donde se muestra que la administración sistémica de esta molécula produce hiperfagia. Nuestros resultados son los primeros en mostrar un efecto orexigénico de esta molécula cuando se administra de forma central, en este caso en el NAcS. Al igual que sucedió con la ANA, las distintas dosis de OLE produjeron cambios diferenciales en el consumo de alimento.

La dosis de OLE 0.1 μg no tuvo efectos significativos sobre la ingestión de alimento. Inclusive en las primeras dos horas de medición se mantuvo abajo del control sin alcanzar significancia y el consumo de alimento se reestableció en las dos horas siguientes. Con la dosis de 1.0 μg se observó una tendencia a aumentar la ingestión solo durante la primera hora, al igual que la misma dosis de ANA. Posiblemente si aumentamos el número de sujetos en este grupo puede llegar a alcanzar significancia.

La dosis de OLE que tuvo un efecto hiperfágico significativo solo en la segunda hora de medición fue la de 10.0 μg , con un aumento de la ingesta de más del 100% aunque durante las cuatro horas se mantuvo arriba del control. Fue la única dosis que alcanzó significancia si contabilizamos el total de las cuatro - horas, donde podemos observar un claro efecto dosis dependiente teniendo a la

dosis de 0.1 μg como la menos efectiva, seguida de la de 1.0 μg y la de 10 μg como la más efectiva.

Anandamida vs. Oleamida

Si comparamos los efectos sobre la ingesta de alimento de estos dos endocannabinoides cuando se administran en el NAcS podemos observar que de forma general ANA tiene un efecto hiperfágico mayor independientemente de la dosis utilizada. Esto es lógico si recordamos un poco sobre la fisiología de los cannabinoides. ANA tiene mayor afinidad y selectividad por el receptor CB1 comparado con OLE, que ya se ha demostrado que también se une a este receptor (Leggett et al., 2004). Debido a esto se esperaría, como se observó en este estudio, que para que OLE pudiera tener un efecto sobre la ingestión de alimento es necesario una dosis mayor que la utilizada para ANA que fue lo que se observó en el consumo total. Cuando comparamos el efecto de ambos endocannabinoides en la primera hora observamos que siguen la misma tendencia. Sin embargo, solo ANA causa una marcada hiperfagia.

Interacción entre el NAc y el HPV: Regulación canabinérgica

En este estudio hicimos la medición durante cuatro horas bajo el siguiente razonamiento: la medición de la primera hora nos da como información el efecto agudo de ANA y OLE en el NAcS sobre la ingestión de alimento. Hay que tomar en cuenta que las primeras horas de la fase de oscuridad que es la fase de mayor actividad de los roedores, es donde se puede registrar el mayor consumo de alimento de las ratas. Es decir, estamos observando qué sucede si potenciamos la actividad GABAérgica en una parte esencial del sistema de recompensa cuando el organismo despliega conductas necesarias para su supervivencia como lo es la ingestión de alimento.

Ahora bien, si pensamos que el sistema canabinérgico esta involucrado en la regulación de la ingestión de alimento podemos suponer que este sistema se encuentra en su mayor pico de actividad durante la fase de oscuridad en las estructuras relacionadas con esta conducta como el Hyp y en este caso el NAc. Existen estudios donde se reportan las variaciones diurnas de la ANA en el NAc indicando que esta molécula se encuentran en sus niveles mas altos en la fase de oscuridad comparados con la fase de luz (Valenti et al., 2004). En trabajos de nuestro laboratorio se observa la misma tendencia en el hipotálamo.

Con estos resultados se plantean varias preguntas acerca de los mecanismos que están siendo afectados por los endocannabinoides. Se han realizado estudios acerca de cómo la inhibición del NAc afecta la ingestión de

alimento, utilizando agonistas GABAérgicos, agonistas opioidérgicos y antagonistas glutamatérgicos. Todos estos fármacos producen un aumento en el consumo de alimento, al igual que los canabinoides endógenos.

Dentro del NAc, los endocannabinoides pueden interactuar con otros circuitos neuroquímicos que se han ligado con la motivación, como el sistema dopaminérgico mesolímbico. La liberación de DA en el NAc tiene una función crucial en los aspectos apetitivos de la alimentación. Se ha observado que determinadas dosis de marihuana que inducen hiperfagia también promueven la liberación de DA en el NAc. Aparte de estimular la formación de ANA en el cerebro límbico anterior.

Entonces, el punto es conocer cómo la participación de un sistema inhibitor como lo es el canabinérgico en el núcleo accumbens puede regular una conducta tan importante para la vida de los organismos como la ingestión de alimento.

La ingestión de alimento, como otras conductas motivadas, se puede dividir en dos fases, la de aproximación al estímulo motivante y la de consumación de dicho estímulo. Como ya hemos mencionado, el NAc, junto a otras estructuras, ha sido involucrado en la regulación de estas dos fases. Se ha observado que la actividad del NAc esta asociada a la fase de aproximación y la inhibición del mismo se relaciona con la consumación. Este ciclo podría presentarse de la siguiente manera: el NAc debe de estar activo, (actividad producida por las entradas glutamatérgicas provenientes de la PfCtx, Amy e Hipp, en conjunto con una modulación dopaminérgica del VTA) para buscar el reforzador; cuando el

organismo lo consigue el sistema se debe inhibir para que este óptimo a responder ante cualquier otro estímulo relevante en su entorno. Otros sistemas homeostáticos funcionan de esta manera. Así que podemos dar el siguiente ejemplo: las neuronas que detectan glucosa en el HL aumentan su frecuencia de disparo cuando detectan un déficit de glucosa, y se inhiben cuando la glucosa está en sus niveles normales.

Ann Kelley demostró que la potenciación de la actividad GABAérgica administrando muscimol en el NAcS produce una activación del HL (Maldonado-Irizarry et al., 1995), dando así los primeros indicios sobre la comunicación entre sistemas hedónicos y homeostáticos. Al momento de activar la transmisión GABAérgica en el NAc se inhiben las neuronas de salida que producen de igual forma GABA. Como resultado de dicha inhibición el HL, el cual es inhibido por el NAc, se activa. Infiriendo entonces que las manipulaciones del NAc traen como consecuencia una activación del hipotálamo lateral. Sin embargo esto solo se ha visto cuando se administran agonistas GABAérgicos y antagonistas glutamatérgicos en el NAcS, dejando al margen la participación de otros sistemas inhibidores, como el canabinérgico, que están presentes en este núcleo.

La activación del sistema canabinérgico en el NAc puede incidir en las dos fases de la ingestión de alimento dependiendo del sitio de acción. La activación del CB1 que esta presente en las entradas provenientes de la PfCtx produce una inhibición de la liberación de GLU en el NAc. Esto da como resultado una baja actividad del NAc (las MSN se silencian). Esta actividad esta relacionada con la

fase consumatoria de la ingestión de alimento. La activación del CB1 que está en las neuronas principales del NAc produce una hiperpolarización de estas células, que como recordamos son neuronas GABAérgicas e inhiben a otras MSN, y estas a su vez proyectan a otras estructuras como el pálido ventral y el Hyp.

Por esta razón, nosotros tratamos de inducir la misma activación de los núcleos hipotalámicos después de la administración de ANA y OLE en el NAcS con las dosis que tuvieron efecto durante la primera hora de medición de la ingestión de alimento.

Los núcleos hipotalámicos que analizamos con c-Fos (proteína nuclear que nos indica actividad celular) fueron el HL, el ARC y el PVN. Tres núcleos de gran importancia en la regulación de la ingestión de alimento.

Esta documentado que señales de la periferia como grelina estimulan al ARC produciendo la liberación de NPY, y este a su vez estimula al HPV (que libera OXY), que trae como consecuencia un aumento en el consumo de alimento.

Tanto ANA como OLE a la dosis de 1.0 μg en el NAcS producen una activación del HPV sin encontrarse cambios en el HL ni en el ARC.

Una de las explicaciones que se puede dar con estos datos es que la inhibición producida por los endocannabinoides en el NAc es diferente a la producida por agonistas GABAérgicos. Es decir, posiblemente ANA y OLE estén inhibiendo o activando un tipo de células que no sean las que proyectan al HL. No podemos descartar una vía de salida del NAc que proyecte directa o indirectamente al HPV.

La activación del HPV puede inducir la ingestión de alimento cuando en este núcleo convergen señales de la periferia como la GAL o centrales como el ya mencionado NPY; pero también es posible inducir saciedad debido a la activación de receptores para la POMC y el CART, inhibidores de la ingesta de alimento (Schwartz et al., 2000). Nuestros resultados sólo nos indican que el HPV está activo. Lo que esperaríamos, de acuerdo a la conducta, es que dicha actividad sea de las neuronas que producen las señales orexigénicas.

Una posible explicación es la siguiente: en el HPV se encuentra una población de interneuronas GABAérgicas que le marcan un tono inhibitorio a las neuronas principales del HPV, que como recordaremos producen OXY, vasopresina y CRH, las tres inhibitorias de la ingestión de alimento. Entonces, si estimulamos la actividad GABAérgica dentro de este núcleo se producirá un aumento en el consumo de alimento, ya que se estarían inhibiendo las señales de saciedad.

Si el NAc está conectado con el HPV, esperaríamos que las neuronas a las que está inervando sean las interneuronas GABAérgicas. Al inhibir la transmisión GABAérgica de las células principales del accumbens (debido a la activación del CB1 en las entradas de la PfCtx), con los cannabinoides ANA y OLE estamos provocando una desinhibición de las interneuronas GABAérgicas del HPV. Esto se puede entender mejor si observamos la figura 19 (**Figura 19a**)

También existe la posibilidad de que la conexión entre el NAc y el HPV no sea directa, sino que haya una estructura de relevo como el pálido ventral, cuyas neuronas son GABAérgicas. Al activarse el CB1 que esta en las colaterales de las MSN se produce una desinhibición de otras MSN que probablemente inhiban al pálido ventral y este a su vez desinhiba a las interneuronas GABAérgicas del HPV (**Figura 19b**).

Falta por dilucidar si el efecto orexigénico de los cannabinoides es a través de la activación del CB1, porque como podemos recordar tanto ANA como OLE pueden tener acción en otro tipo de receptores. Así, ANA se une a receptores vaniloides y OLE se une a receptores serotoninérgicos. Otra cosa que es importante aclarar es sobre que fase de la ingestión de alimento los endocannabinoides participan, ya sea en la de aproximación (el "wanting" en el modelo de Berridge) o en la de consumación (el "liking") (Berridge y Robinson, 2003)

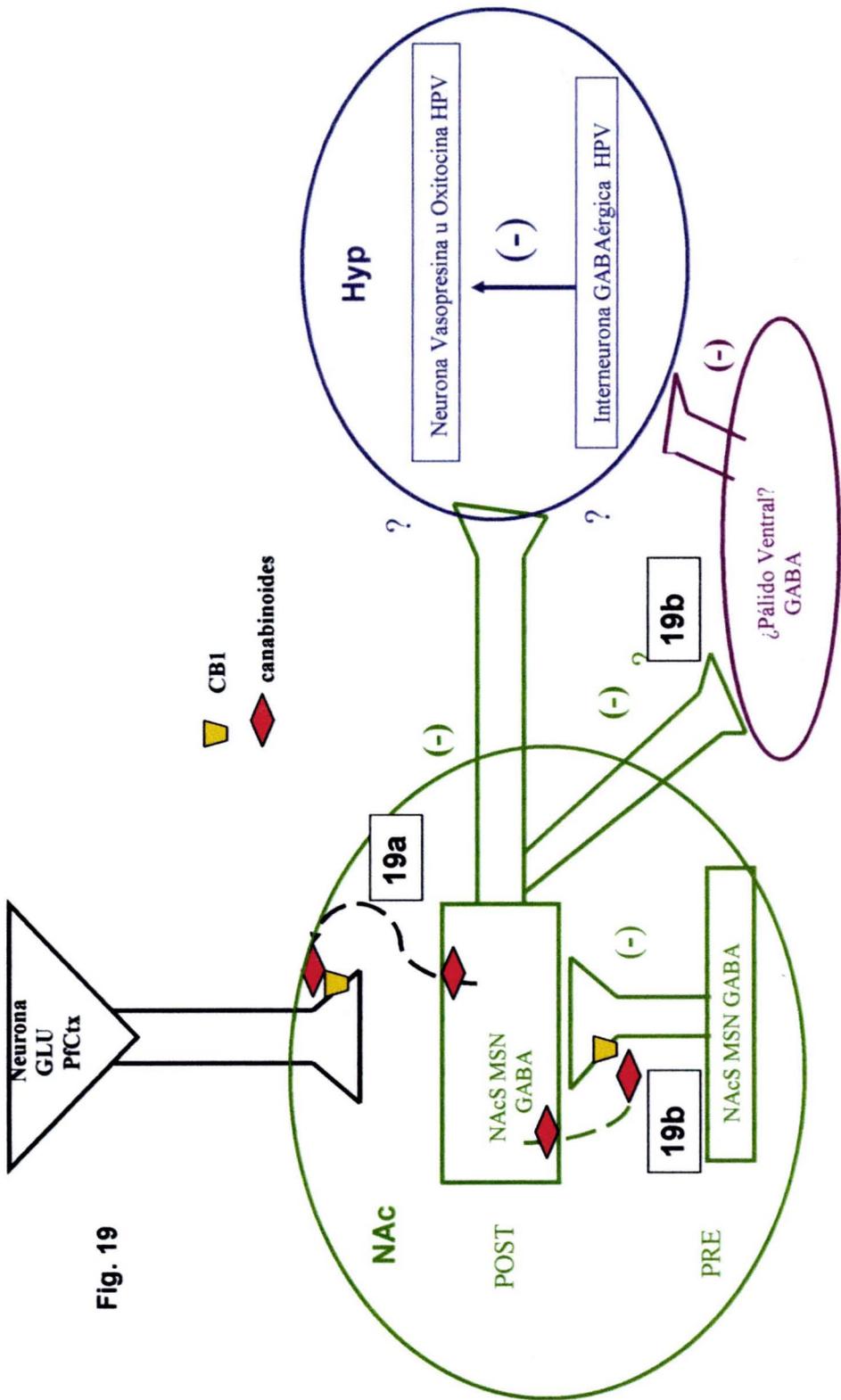


Fig. 19

Fig. 19 Esquema que muestra la posible regulación canabinérgica entre el NAc y el HPV que trae como resultado un aumento en el consumo de alimento. En **19a** el canabinoide se libera de la postsinápsis en el NAcS y actúa en la presinápsis de la PfCtx, produciendo una inhibición de la liberación de GLU y por consiguiente una baja en la actividad del NAcS. Poniéndolo en contexto, el NAcS ya no inhibe a las interneuronas GABAérgicas del HPV. En **19b** el canabinoide actúa en la presinápsis de una MSN inhibiendo la inhibición de otra MSN. Es decir, la actividad del NAcS aumenta y puede inhibir a otras estructuras como el pálido ventral, que también es GABAérgico. Sin embargo, el pálido ventral puede tener conexiones con las interneuronas GABAérgicas del HPV, pero al ser inhibido por el NAcS estas interneuronas se activarían y por consecuencia inhibirán a las neuronas principales del HPV.

11. CONCLUSIONES

Anandamida y oleamida administradas en el núcleo accumbens shell producen una marcada hiperfagia durante las cuatro horas de medición, que corresponden al inicio de la fase de oscuridad. Este efecto depende de la dosis utilizada de cada molécula. Se observó una clara curva dosis respuesta con oleamida, no así con anandamida.

Estos endocannabinoides producen una activación del hipotálamo paraventricular cuando se administran en el accumbens shell. Lo que sugiere una cooperación entre el sistema del reforzamiento (núcleo accumbens) y el sistema encargado de la regulación homeostática (hipotálamo) para la modulación de la ingestión de alimento. Estos resultados también nos hablan de la potencial función del sistema canabinérgico en un proceso tan importante como lo es la motivación por el alimento en este caso, pero se puede hacer extensivo a las conductas motivadas en general, como la conducta sexual y la adicción a fármacos de abuso.

ANEXO

C-Fos

c-fos es un miembro de la familia de genes de expresión temprana. Estos genes están presentes en muchos tejidos pero en condiciones basales usualmente son muy bajos. Estímulos variados inician el incremento en los niveles del ARN mensajero que van de minutos a semanas. La proteína Fos producida por el gen c-fos es una proteína reguladora que forma dímeros complejos con otros genes de expresión temprana que son producidos por el gen c-jun. Estos dímeros activan un factor de transcripción llamado AP1 que se une al ADN que controla la expresión genética. Este mecanismo es por el cual los estímulos externos se convierten en cambios a largo plazo dentro de la célula. El gen c-fos es activado rápidamente por neurotransmisores o drogas que estimulan el AMP cíclico o la entrada de calcio. Ambas vías producen la fosforilización del factor de transcripción CREB. Debido a su rápida inducción desde los niveles basales en respuesta a la despolarización neuronal (siendo la entrada de calcio la señal crítica) y a la segunda mensajería, algunos genes de expresión temprana han sido usados como marcadores celulares de activación neuronal, permitiendo aproximaciones novedosas a la neuroanatomía funcional (Curran y Morgan, 1994; Curran y Franza, 1988; Chiu et al., 1988).

ABREVIATURAS

Δ9 THC: Delta 9 Tetrahydrocannabinol.

2-AG: 2 araquidonil glicerol.

ACh: Acetilcolina.

AgRP: Gen Relacionado a la Proteina Agouti.

Amy: Amígdala.

ANA: Anandamida.

ARC: Núcleo arcuato.

CART: Transcrito Relacionado a Cocaina y Anfetamina

CB1: Receptor a cannabinoides 1.

CB2: Receptor a cannabinoides 2.

CRH: Hormona liberadora de corticotropina.

DA: Dopamina.

DAG: Diacilglicerol.

DYN: Dinorfina.

END: Endorfinas.

ENK: Encefalina(s).

FAAH: Amida hidrolasa de los acidos grasos.

GABA: Ácido gama amino butírico.

GAL: Galanina.

GLU: Glutamato.

HL: Hipotálamo Lateral.

HPV: Hipotálamo Paraventricular.

HVM: Hipotálamo Ventromedial

Hyp: Hipotálamo.

MSH: Hormona estimuladora de melanocitos.

MSN: Espinosas de mediano tamaño.

NAc: Núcleo Accumbens.

NAcC: Núcleo Accumbens Core.

NAcS: Núcleo Accumbens Shell.

NE: Norepinefrina.

NPY: Neuropeptido Y.

OLE: Oleamida.

Op: Opioides

ORX: Orexina.

OXY: Oxitocina.

PfCtx: Corteza Prefrontal.

PKA: Proteína cinasa activada por AMP cíclico.

POMC: Pro-opiomelanocortina.

SP: Sustancia P.

VR1: Receptor vaniloide 1.

VTA: Área Tegmental Ventral.

REFERENCIAS

- (1) Albertin S. B., Mulder A. B., Tabuchi E., Zugaro M. B., Wiener S. I. (2000) Lesions of the medial shell of the nucleus accumbens impair rats in finding larger rewards, but spare reward-seeking behavior. Behavioural Brain Research 117:173-183.
- (2) Ameri A. (1998) The effects of cannabinoids on the brain. Progress in Neurobiology 58:315-348.
- (3) Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ. (2004) AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. Journal of Biochemistry 279:1-18.
- (4) Baldo B. A., Gual-Bonilla L., Sijapati K., Daniel R. A., Landry C. F., Kelley A. E. (2004) Activation of a subpopulation of orexin/hypocretin-containing hypothalamic neurons by GABAA receptor-mediated inhibition of the nucleus accumbens shell, but not by exposure to a novel environment. European Journal of Neuroscience 19:376-386.
- (5) Baldo B. A., Kelley A. E. (2001) Amylin infusion into rat nucleus accumbens potently depresses motor activity and ingestive behavior. American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology 281:R1232-R1242.

- (6) Baldo B. A., Sadeghian K., Basso A. M., Kelley A. E. (2002) Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. Behavioural Brain Research 137:165-177.
- (7) Bassareo V., Di Chiara G. (1999) Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. Neuroscience 89:637-641.
- (8) Bassareo V., Di Chiara G. (1999) Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. European Journal of Neuroscience 11:4389-4397.
- (9) Berridge K. C. (2003) Handbook of affective sciences: Comparing the emotional brain of humans and other animals. USA. Oxford University Press 25-51.
- (10) Berridge K. C., Robinson T. E. (2003) Parsing reward. Trends in Neurosciences 26:507-513.
- (11) Berridge K. C., Robinson T. E. (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? Brain Research Reviews 28:309-369.
- (12) Brailowsky S. (1995) Las sustancias de los sueños: Neuropsicofarmacología. Fondo de Cultura Económica: La Ciencia para Todos. 271-281.

- (13) Cabeza de Vaca S., Carr K. D. (1998) Food restriction enhances the central rewarding effect of abused drugs. The Journal of Neuroscience 18:7502-7510.
- (14) Cannon C. M., Palmiter R. D. (2003) Reward without dopamine. The Journal of Neuroscience 23:10827-10831.
- (15) Carelli R. M. (2002) Nucleus accumbens cell firing during goal-directed behaviors for cocaine vs. "natural" reinforcement. Physiology and Behavior 76 379-387.
- (16) Cheer J. F., Cadogan A.K., Marsden C. A., Fone K. C. F., Kendall D. A. (1999) Modification of 5-HT₂ receptor mediated behavior in the rat by oleamide and the role of cannabinoid receptors. Neuropharmacology 38:533-541.
- (17) Chen J., Marmur R., Pulles A., Paredes W., Gardner E. L. (1993) Ventral tegmental microinjection of delta 9-tetrahydrocannabinol enhances ventral tegmental somatodendritic dopamine levels but not forebrain dopamine levels: evidence for local neural action by marijuana's psychoactive ingredient. Brain Research 621:65-70.
- (18) Chiu R., Boyle W. J., Meek J., Smeal T., Hunter T., Karin M. (1988) The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. Cell 54:541-552.
- (19) Christopoulos A., y Wilson K. (2001) Interaction of anandamide with the M(1) and M(4) muscarinic acetylcholine receptors. Brain Research 915:70-78.

- (20) Clifton P. G. (2000) Meal patterning in rodents: Psychopharmacological and neuroanatomical studies. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 24:213-222.
- (21) Correa M., Carlson B. B., Wisniecki A., Salamone J. D. (2002) Nucleus accumbens dopamine and work requirements on interval schedules. Behavioural Brain Research 137:179-187.
- (22) Cota D., Marsicano G., Matthias T., Auer D., Cervino C., Nisoli E., Lutz B., Stalla G. K., Pagotto U. (2002) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. The Journal of Clinical Investigation 112:423-431.
- (23) Cravatt B. F., Prospéro-García O, Siuzdak G, Gllula N. B., Henriksen S. J., Boger D. L., Lerner R. A.. (1995). Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. Science 268:1506-1509.
- (24) Curran T., Franza R. (1988) Fos and Jun: The AP-1 connection. Cell 55:395-397.
- (25) Curran T., Morgan J. L. (1994) Fos: An immediate-early transcription factor in neurons. Journal of Neurobiology 26:403-412.
- (26) Delgado J. M., Anand B. K. (1953) Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. American Journal of Physiology 172:162-168.
- (27) Devane W.A., Dysarz F. A., Johnson M. R., Melvin S. L., Howlett A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Molecular Pharmacology 34:605-613.

- (28) Devane W. A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., y Mechoulam R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science 258:1946-1949.
- (29) Di S., Malcher-Lopez R., Halmos K. C., Tasker J. G. (2003) Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus. The Journal of Neuroscience 23:4850-4857.
- (30) Di Marzo V., Bisogno T., De Petrocellis L. (2001a) Anandamide: Some like it hot. Trends in Pharmacological Sciences 22:346-349.
- (31) Di Marzo V., Wang L., Liu J., Fezza F., Palminter R. D., Kunos G. (2001b) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. Nature 410:822-825.
- (32) Domjan M. Principios de aprendizaje y conducta. USA. Thomson Editores, 1999.
- (33) Fedorova I., Boger D., Basile A. (2001) Behavioral evidence for the interaction of oleamide with multiple neurotransmitter systems. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 299:332-342.
- (34) Fernández-Espejo E. (2000) How does the nucleus accumbens tick? Revista de Neurología 30(9):845-849.
- (35) Figlewicz D. P. (2003) Adiposity signals and food reward: Expanding the CNS roles of insulin and leptin. American Journal of Physiology and Regulatory Integrative Comparative Physiology 284(4):R882-892.
- (36) Figlewicz D. P., Woods S. C. (2000) Adiposity signals and brain reward mechanisms. Trends in Pharmacological Sciences 21:235-236.

- (37) Fowler C. J. (2004) Oleamide: A member of the endocannabinoid family? British Journal of Pharmacology 141:195-196.
- (38) French E. D. (1997) Δ^9 -Tetrahydrocannabinol excites rat vta dopamine neurons through activation of cannabinoid cb1 but not opioid receptors. Neuroscience Letters 226:195-162.
- (39) French E. D., Dillon K., Wu X. (1997) Cannabinoids excite dopamine neurons in the ventral tegmentum and substantia nigra. Neuroreport 8:649-652.
- (40) Fulton S., Woodside B., Shizgal P. (2000) Modulation of brain reward circuitry by leptin. Science 287:125-128.
- (41) Gallate J. E., Saharov T., Mallet P. E., McGregor I. S. (1999) Increased motivation for beer in rats following administration of a cannabinoid CB1 receptor agonist. European Journal of Pharmacology 370:233-240.
- (42) Gardner E. L., Lowinson J. H. (1991) Marijuana's interaction with brain reward systems. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 40:571-580.
- (43) Gessa G.L., Melis M., Diana M. (1998) Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB1 receptors. European Journal of Pharmacology 341:39-44.
- (44) Glass M., Dragunow M., Faull R. L. M. (1997) Cannabinoids receptor in the human brain: A detailed anatomical and quantitative autoradiographic

- study in the fetal, neonatal and adult human brain. Neuroscience 77: 299-318.
- (45) Hanlon E.C., Baldo B. A., Sadeghian K., Kelley A. E. (2003) Increases in food intake or food-seeking behavior induced by GABAergic, opioid, or dopaminergic stimulation of the nucleus accumbens: is it hunger? Psychopharmacology 172(3):241-247.
- (46) Hermann H., Marsicano G., Lutz B. (2002) Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. Neuroscience 109:451-460.
- (47) Hernandez P. J., Sadeghian K., Kelley A. E. (2002) Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens. Nature Neuroscience 5(12):1327-31
- (48) Higgs S., Williams C. M., Kirkham T. C. (2002) Cannabinoid influences on palatability: microstructural analysis of sucrose drinking after Δ^9 -tetrahydrocannabinol, anandamide, 2-arachidonoylglycerol and SR141716A. Psychopharmacology 165(4):370-7
- (49) Hoffman A. F., Lupica C. R. (2000) Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: A comparison with opioids. Journal of Physiology 85(1):72-83.
- (50) Ikemoto S., Panksepp J. (1999) The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: A unifying interpretation with special reference to reward seeking. Brain Research Reviews 31:6-41.
- (51) Iversen L. (2003) Cannabis and the brain. Brain 126: 1252-1270.

- (52) Jamshidi N., Taylor D. A. (2001) Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. British Journal of Pharmacology 134:1151-1154.
- (53) Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M. Principles of neural science. USA. McGraw-Hill, 2000.
- (54) Kelley A. E. (2004) Ventral striatal control of appetitive motivation: Role in ingestive behavior and reward-related learning. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 27:765-776.
- (55) Kelley A. E., Bakshi V. P., Haber S. N., Steininger T. L., Will M. J., Zhang M. (2002) Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. Physiology and Behavior 76:365-377.
- (56) Kelley A. E., y Berridge K. C. (2002) The neuroscience of natural rewards: Relevance to addictive drugs. The Journal of Neuroscience 22(9):3306-3311.
- (57) Kelley A. E., Will M. J., Zhang M., Haber S. N. (2003) Restricted daily of a highly palatable food (chocolate Ensure®) alters striatal enkephalin gene expression. European Journal of Neuroscience 18:2592- 2598.
- (58) Kirkham T. C. (2003) Endogenous cannabinoids: a new target in the treatment of obesity. American Journal of Physiology and Regulatory Integrative Comparative Physiology 284:R343-344.
- (59) Kirkham T. C., Williams C. M. (2001) Synergistic effects of opioid and cannabinoid antagonists on food intake. Psychopharmacology 153:267-270.
- (60) Kirkham T. C., Williams C. M., Fezza F., Di Marzo V. (2002) Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation

- to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. . British Journal of Pharmacology 136:550-557.
- (61) Kunos G., y Batkai S. (2001) Novel physiologic functions of endocannabinoids as revealed through the use of mutant mice. Neurochemical Research 26:1015-1021.
- (62) Leggett J. D., Aspley S., Beckett S. R. G., Antona A. M. D., Kendall D. A. (2004) Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human cb1 cannabinoid receptors. British Journal of Pharmacology 141:253-262.
- (63) Levine A. S., Billington C. J. (1997) Why do we eat? A neural systems approach. Annual Reviews in Nutrology 17:597-619.
- (64) Lupica C. R., Riegel A. C., Hoffman A. F. (2004) Mrijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. British Journal of Pharmacology 143:227-234
- (65) Lydic R., Baghdoyan H. A. (1999) Handbook of behavioral state control: Cellular and molecular mechanisms. CRC Press. 433-441.
- (66) Maldonado R., Rodriguez de Fonseca F. (2002) Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. The Journal of Neuroscience 22:3326-3331.
- (67) Maldonado-Irizarry C. S., Swanson C. J., Kelley A. E. (1995) Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control feeding behavior via the lateral hypothalamus. Journal of Neuroscience 15:6779-6788.

- (68) Manzoni O. J., Bockaert J. (2001) Cannabinoids inhibit GABAergic synaptic transmission in mice nucleus accumbens. European Journal of Pharmacology 412:R3-R5.
- (69) Marín O., Smeets W., and Gonzáles A. (1998) Evolution of the basal ganglia in tetrapods: A new perspective based on recent studies in amphibians. Trends in Neuroscience 21:487-494.
- (70) Martin B. R., Mechoulam R., Razdan R. K. (1999) Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. Life Sciences 65:573-595.
- (71) Martínez-Gonzales D., Bonilla-Jaime H., Morales-Otal A., Henriksen S. J., Velázquez-Moctezuma J., Prospéro-García O. (2004) Oleamide and anandamide effects on food intake and sexual behavior of rats. Neuroscience Letters 364:1-6.
- (72) Matsuda L., Lolait S., Brownstein M., Young A., y Bonner T. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 346:561-564.
- (73) McGregor I. S., Arnold J. C., Weber M. F., Topples A. N., Hunt G. E. (1998) A comparison of Δ^9 -thc and anandamide induced c-fos expression in the rat forebrain. Brain Research 802:19-26.
- (74) Mechoulam R. (1970) Marijuana chemistry. Science 168: 1159-1166.
- (75) Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N. E., Schatz A. R., Gopher A., Almong S., Martin B. R., Compton D. R., et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors

- (76) Mechoulam R., Fride E. (2001) A hunger for cannabinoids. Nature 410:783-765.
- (77) Mechoulam R., Fride E., Di Marzo V. (1998) Endocannabinoids. European Journal of Pharmacology 359:1-18.
- (78) Moldrich G., Wenger T. (2000) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An Immunohistochemical Study. Peptides 21:1735-1742.
- (79) Murillo-Rodriguez E., Sanchez-Alavez M., Navarro L., Martinez-Gonzales D., Drucker-Colin R., y Prospero Garcia O. (1998) Anandamide modulates sleep and memory in rats. Brain Research 812:270-274.
- (80) Nicola S. M., Malenka R. C. (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. Annual Reviews of Neuroscience 23:185-215.
- (81) O'Donnell P. (2003) Dopamine gating of forebrain neural ensembles. European Journal of Neuroscience 17:429-435.
- (82) Olds J. (1956) Pleasure centers in the brain. Scientific American 195:105-116.
- (83) Olds J., Milner P. (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of the brain. Journal of Comparative and Physiological Psychology 47(6):419-427 .
- (84) Patel N. A., Moldow R. L., Patel J. A., Wu G., Chang S. L. (1998) Arachidonylethanolamide (AEA) activation of FOS proto-oncogene protein immunoreactivity in the rat brain. Brain Research 797:225-233.

- (85) Patel S., Rademacher D. J., Hillard C. J. (2003) Differential regulation of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonylglycerol within the limbic forebrain by dopamine receptor activity. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 306:880-888.
- (86) Peciña S., Berridge K. C. (1995) central enhancement of taste pleasure by intraventricular morphine. Neurobiology 3:269-280.
- (87) Peciña S., Berridge K. C. (2000) Opioid site in nucleus accumbens shell mediates eating and hedonic "liking" for food: Map based on microinjection Fos plumes. Brain Research 863:71-86.
- (88) Pettit D. A., Harrison M. P., Olson J. M., Spencer R. F., Cabral G. A. (1998) Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. Journal of Neuroscience 51:391-402.
- (89) Pistis M., Porcu G., Melis M., Diana M., Gessa G. L. (2001) Effects of cannabinoids on prefrontal neuronal responses to ventral tegmental area stimulation. European Journal of Neuroscience 14:96-102
- (90) Plata Salaman C. R. (2001) Cytokines and feeding. International Journal of Obesity and Related Metabolism Disorders Suppl 5:S48-52.
- (91) Pontieri F. E., Tanda G. L., Di Chiara G. (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. Proceedings in the National Academy of Science 92:12304-12308.
- (92) Reynolds S. M., Berridge K. C. (2002) Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: Bivalent rostrocaudal gradients for GABA-elicited eating, taste "liking"/"disliking" reactions, place

preference/avoidance, and fear. The Journal of Neuroscience 22:7308-7320

- (93) Salamone J. D. (1996) The behavioural neurochemistry of motivation: Methodological and conceptual issues in studies of the dynamic activity of nucleus accumbens dopamine. Journal of Neuroscience Methods 64:137-149.
- (94) Salamone J. D., Arizzi M. N., Sandoval M. D., Cervone K. M., Aberman J. E. (2002) Dopamine antagonists alter response allocation but do not suppress appetite for food in rats: contrast between the effects of SKF 83566, raclopride, and fenfluramine on a concurrent choice task. Psychopharmacology 160:371-380.
- (95) Salamone J. D., Correa M. (2002) Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. Behavioral Brain Research 137:3-25.
- (96) Salamone J. D., Correa M., Mingote S., Weber S. (2003) Nucleus accumbens dopamine and the regulation of effort in food seeking behavior: implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 305(1):1-8
- (97) Saper C. B., Chou T. C., Elmquist J. K. (2002) The need to feed: Homeostatic and hedonic control of eating. Neuron 36:199-211.
- (98) Shizgal P. (1999) On the neural computation of utility: implications from studies of brain stimulation reward. En Khanerman D. The Foundations of Hedonic Psychology. Russell Sage Foundations 500-524.

- (99) Schlicker E., Kathmann M. (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. Trends in Pharmacological Sciences 22:565-572.
- (100) Schwartz M. W., Woods S. C., Seeley R. J., Baskin D. G. (2000) Central nervous system control of food intake. Nature 404:661-671
- (101) Soderpalm A. H. V., Berridge K. C. (2000) Food intake after diazepam, morphine or muscimol: Microinjections in the nucleus accumbens shell. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 66:429-434.
- (102) Staddon J. The new behaviorism: Mind, mechanism, and society. Psychology Press, 2001.
- (103) Stratford T. R., Kelley A. E. (1997) GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. The Journal of Neuroscience 17:4434-4440.
- (104) Strubbe J. H., Van Dijk G. (2002) The temporal organization of ingestive behavior and its interaction with regulation of energy balance. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 26:485-498.
- (105) Szabo B., Muller T., Koch H. (1999) Effects of cannabinoids and dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. Journal of Neurochemistry 73:1084-1089.
- (106) Szabo B., Siemes S., Wallmichrath I. (2002) Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. European Journal of Neuroscience 15:2057-2061.

- (107) Tanda G., Pontieri F. E., Di Chiara G. (1997) Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common μ 1 opioid receptro mechanism. Science 276:2048-2050.
- (108) Tepperman J., Brobeck J. R., Long C. N. H (1943) The effects of hypothalamic hyperphagia and of alterations of feeding habits on the metabolism of the albino rat. Yale Journal of Biology and Medicine 15:855-874.
- (109) Thomas E. A., Cravatt B. F., Sutcliffe J. G. (1999) The endogenous lipid oleamide activates serotonin 5-HT7 neurons in mouse thalamus and hypothalamus. Journal of Neurochemistry 72:2370-2378.
- (110) Valenti M., Vigano D., Cascio M. G., Rubino T., Steardo L., Parolaro D., Di Marzo V. (2004) Differential diurnal variations of anandamida and 2-arachidonoyl -glycerol levels in rat brain. Cellular and Molecular Life Sciences 61:945-950.
- (111) Van der Stelt M., Di Marzo V. (2003) The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: Implications for neurological and psychiatric disorders. European Journal of Pharmacology 480:133-150
- (112) Wenger T., Jamali K. A., Juaneda C., Leonardelli J., Tramu G. (1997) Arachidonyl ethanolamide (anandamide) activates the parvocellular part of hypothalamic paraventricular nucleus. Biochemical and Biophysical Research Communications 237:724-728.

- (113) Wilson R., Nicoll RA. (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. Science 296:678-682.
- (114) Will M. J., Franzblau E. B., Kelley A. E. Nucleus accumbens μ -opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network. The Journal of Neuroscience 23:2882-2888.
- (115) Williams C. M., Kirkham T. C. (1999) Anandamide induces overeating: Mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. Psychopharmacology 143:315-317.
- (116) Williams C. M., Kirkham T. C. (2002) Observational analysis of feeding induced by Δ 9-thc and anandamide. Physiology and Behavior 76:241-250.
- (117) Wise R. A. (1996) Addictive drugs and brain stimulation reward. Annual Reviews of Neuroscience 19:319-340.
- (118) Zahm D. S. (2000) An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 24:85-105.
- (119) Zhang M., Balmadrid C., Kelley A. E. (2003) Nucleus accumbens opioid, GABAergic, and dopaminergic modulation of palatable food motivation: Contrasting effects revealed by a progressive ratio study in the rat. Behavioral Neuroscience 117:202-211.
- (120) Zheng H., Corkern M., Stoyanova I., Patterson L. M., Tian R., Berthoud H. R. (2003) Appetite-inducing accumbens manipulation activates hypothalamic orexin neurons and inhibits pomc neurons. American Journal

of Physiology. Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology
284:R1438-R1444.

(121) Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR. (1999)
Fundamental Neuroscience. USA. Academic Press, New York.

Este trabajo se realizó con el apoyo de CONACyT, Donativo 42060 otorgado a
OPG.