



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

---

---

**“POTENCIAL INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA  
GLUTAMATÉRGICO Y ENDOCANNABINÉRGICO EN LA  
REGULACIÓN DE LA INGESTA DE ALIMENTO”**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA  
PRESENTA:**

**ASAI SÁNCHEZ FUENTES**

**DIRECTOR:** DR. OSCAR PROSPÉRO GARCÍA

**REVISORA:** DRA. GABRIELA OROZCO CALDERÓN

**SINODALES:** DRA. ALEJANDRA E. RUIZ CONTRERAS

DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO

DR. RODRIGO PEDROZA LLINÁS



TESIS APOYADA POR DGAPA-PAPIIT IN-224314

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2015



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

A DGAPA-PAPIIT por el donativo IN224314 otorgados al Dr. Oscar Próspero García para la realización de este proyecto.

Se agradece de igual manera, la beca de DGAPA-PAPIIT otorgada al estudiante Asai Sánchez Fuentes para la realización de este proyecto.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
Glosario de Abreviaturas .....	2
Introducción .....	4
 <b>Capítulo 1. Fisiología de la ingesta de alimento: generalidades</b> .....	6
1.1 Sistema homeostático .....	6
1.2 Hipotálamo como integrador de señales periféricas de hambre y saciedad ...	9
1.2.1 Neuronas Orexinérgicas.....	15
1.2.2 Neuronas MCHérgicas .....	17
 <b>Capítulo 2. Mecanismos fisiológicos del sistema glutamatérgico en la regulación de la ingesta de alimento</b> .....	20
2.1 Tipos de receptores Glutamatérgicos .....	20
2.2 Sistema glutamatérgico en la regulación de la ingesta de alimento .....	20
2.3 Receptores metabotrópicos mGlu5 en la regulación de la ingesta de alimento .....	23
 <b>Capítulo 3. Mecanismos fisiológicos del sistema endocannabinérgico en la regulación de la ingesta de alimento</b> .....	26
3.1 Endocannabinoides.....	26
3.2 Regulación endocannabinérgica de la ingesta de alimento .....	29
3.3 Liberación de endocannabinoides por estimulación de los mGlu5R .....	30
<b>Planteamiento del problema</b> .....	32
<b>Hipótesis general</b> .....	33
Hipótesis particulares.....	33
<b>Objetivo general</b> .....	33
Objetivos particulares .....	33
 <b>Capítulo 4. Método</b> .....	34
4.1 Sujetos experimentales .....	34
4.2 Aparatos y materiales .....	35

4.3 Fármacos .....	35
4.4 Procedimiento .....	36
4.5 Análisis Histológicos .....	38
4.6 Análisis de datos.....	39
 <b>Capítulo 5. Resultados</b> .....	 40
 <b>Capítulo 6. Discusión y Conclusión</b> .....	 46
<b>Referencias</b> .....	55

## Resumen

El sistema glutamatérgico y endocannabinérgico han sido asociados con la ingesta de alimento, la cual es regulada por medio de la integración de señales periféricas y centrales en el hipotálamo. Particularmente en el hipotálamo lateral (HL), el incremento de glutamato es un factor importante para inducir la ingesta de alimento. Los resultados de experimentos *in vitro* indican que los receptores metabotrópicos de glutamato 5 (mGlu5R), son capaces de producir el endocannabinóide 2-araquidonilglicerol (2-AG) por medio de la enzima diacilglicerolipasa (DGL). Recientemente se ha observado que la estimulación de los mGlu5R incrementa la ingesta de alimento. Sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre este efecto no ha sido completamente entendido. De acuerdo a lo anterior, nuestro objetivo fue examinar farmacológicamente el efecto de la estimulación de mGlu5R en el HL, en presencia o ausencia de un antagonista a receptores CB1 (AM251) o un inhibidor de la DGL (Tetrahidrolipstatina) en la ingesta de alimento. Para ello, ratas macho de la cepa Wistar recibieron microinyecciones en el HL de (RS)-2-Cloro-5-hidroxifenilglicina (CHPG, 5.6 µg; agonista selectivo a mGlu5R), tetrahidrolipstatina (THL, 1.2 µg; un inhibidor de la DGL) y la combinación de estos. Se cuantificó la cantidad consumida de alimento en gramos (g) por 1, 2, 3, 4 y 24 h. Encontramos que la activación de los mGlu5R incrementó de manera significativa ( $P < 0.05$ ) la ingesta de alimento después de cuatro horas, pero marcadamente durante la primera hora. Este efecto fue bloqueado por el antagonista a receptores CB1 o inhibición de la DGL. En conjunto, estos resultados sugieren una potencial interacción de los sistemas endocannabinérgico y glutamatérgico en la regulación de la ingesta de alimento. Parece ser que el 2-AG es el endocannabinóide resultante de la activación de los mGlu5R en el HL. En conclusión el glutamato por medio de los mGlu5R promueve la síntesis y liberación de 2-AG en el HL, induciendo así la ingesta de alimento.

## **Glosario de Abreviaturas**

**2-AG.** 2-Araquidonilglicerol.

**$\alpha$ -MSH.** Hormona Estimuladora de los  $\alpha$ -Melanocitos.

**$\Delta^9$ -THC.**  $\Delta^9$  Tetrahidrocannabinol.

**AEA.** N- Araquidoniletanolamida.

**AgRP.** Péptido relacionado con Agouti.

**AMPc.** Monofosfato de Adenosín Cíclico.

**APF.** Área Perifornical.

**ARC.** Núcleo Arcuato del Hipotálamo.

**ATV.** Área Tegmental Ventral.

**BHE.** Barrera Hematoencefálica.

**BMA.** Núcleo Basomedial de la Amígdala.

**CART.** Transcrito Regulado por la Cocaína y la Anfetamina.

**CCK.** Colecistocinina.

**CHPG.** (RS)-2-Cloro-5-hidroxifenilglicina.

**CoA.** Núcleo Cortical Anterior de la Amígdala.

**DAG.** Diacilglicerol.

**DGL.** Diacilglicerol Lipasa.

**FAAH.** Amida Hidrolasa de los Ácidos grasos.

**GABA.** Ácido- $\gamma$ -aminobutírico.

**IP<sub>3</sub>.** Inositol 1, 4, 5-trifosfato.

**HL.** Hipotálamo Lateral.

**HDM.** Hipotálamo Dorsomedial.

**HVM.** Hipotálamo Ventromedial.

**MCH.** Hormona Concentradora de Melanina.

**MGL.** Monoacilglicerol Lipasa.

**MCPO.** Núcleo Preóptico Magnocelular.

**NAc.** Núcleo Accumbens.

**NMDA.** N-metil-D-aspartato.

**NTS.** Núcleo del Tracto Solitario.

**NPV.** Núcleo Paraventricular.

**NPY.** Neuropéptido Y.

**PIP<sub>2</sub>.** Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato.

**PLC.** Fosfolipasa C.

**POMC.** Pro-Opio-Melano-Cortina.

**PKA.** Proteína Cinasa dependiente de AMPc.

**PKC.** Proteína Cinasa dependiente de la PLC.

**SGPA.** Sustancia Gris Periacueductal.

**SNC.** Sistema Nervioso Central.

**TGI.** Tracto Gastrointestinal.

**THL.** Tetrahidrolipstatina.



## Introducción

La conducta de ingesta de alimentos asegura que el organismo obtenga los nutrientes necesarios para seguir produciendo proteínas, mantener la temperatura y abastecer los almacenes de energía a corto y largo plazo. El hambre puede considerarse como una perturbación fisiológica en donde el organismo detecta la pérdida de las reservas energéticas (Hull, 1943). Esto promueve una cascada de procesos metabólicos que llevan a la búsqueda de alimento que, como veremos a lo largo de esta tesis, está mediada por el hipotálamo. La cascada de procesos metabólicos incluye la producción de péptidos secretados en el tracto gastrointestinal (TGI) que se comunican con receptores específicos del hipotálamo por medio de aferencias vagales y por la circulación sanguínea, para indicar cuándo es necesario iniciar la conducta de ingesta de alimentos y cuándo terminarla (Lutz, 2012; Travagli, Hermann, Browning, & Rogers, 2006). Por lo mismo, el ingerir alimentos es una manera de obtener la energía de un organismo por otro organismo, el comensal.

Históricamente se había pensado que el placer producido por ingerir alimentos dependía de qué tanta energía se había perdido y que el estado hedónico era una función del estado nutricional (Cabanac, 1988). Sin embargo, este modelo no es suficiente para explicar la alimentación no homeostática de alimento apetitoso como las sustancias dulces y las grasas, las cuales ejercen sus efectos reforzantes independientemente de la regulación homeostática. Por ejemplo, las sustancias dulces y las grasas producen más placer al consumirlas que el alimento normal, y se tiende a consumirlas a pesar de que el individuo esté saciado; de hecho, las sustancias dulces así como las grasas promueven la activación del sistema de motivación y recompensa, involucrado en inducir la sensación subjetiva de placer (Hajnal, Smith, & Norgren, 2004; Liang, Hajnal, & Norgren, 2006). Debido a que el consumo de alimento apetitoso sucede a pesar de que un individuo está saciado, se ha sugerido distinguir entre un sistema homeostático y un sistema hedónico como entidades separadas (Yeomans, Blundell, & Leshem, 2007) (para una revisión ver Próspero García, 2013).

Es posible que en épocas de escasez de nutrientes y disminución de la temperatura, nuestros ancestros que pudieron obtener una gran cantidad de carbohidratos y lípidos para almacenarlos en los depósitos a largo plazo, tuvieron mayor probabilidad de sobrevivir (Illius, Tolkamp & Yearsley, 2002).

En la modernidad, el estilo de vida ha cambiado y las conductas para la búsqueda e ingesta de alimento no se limitan a las necesidades energéticas básicas (Berthoud, 2012). La comida alta en grasas y carbohidratos es abundante y de fácil acceso (Berthoud, 2012). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), un factor fundamental del sobrepeso y la obesidad en el mundo es el acceso a mayor cantidad de alimentos hipercalóricos que son ricos en grasa, sal y azúcares (revisado en González, 2004).

Esto ha generado, especialmente en los países desarrollados y en transición de desarrollo, problemas de sobrepeso y obesidad. Según la OMS (2014) 39% de la población mundial adulta (18 > años) tenía sobrepeso y 13% tenían obesidad. En México, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2012), 35% de los adolescentes tiene sobrepeso u obesidad, 7 de cada 10 adultos (20 > años) presentan sobrepeso y aproximadamente 3 de cada 10 adultos tienen obesidad, lo cual representa un serio problema de salud nacional y mundial.

Debido a que el sobrepeso y la obesidad es un problema de salud pública grave, es importante conocer los mecanismos neurobiológicos de los sistemas homeostático y hedónico que regulan la ingesta de alimento, ya que en la medida que se entiendan los mecanismos fisiológicos por medio de los cuales el organismo regula la homeostasis y estimula el sistema de recompensa, mejora nuestro entendimiento sobre las alteraciones en la conducta de ingesta de alimento que pueden llevar al sobrepeso u obesidad.

# Capítulo 1. Fisiología de la ingesta de alimento: generalidades

## 1.1 Sistema homeostático

En 1926 Walter B. Cannon planteó que el organismo tiene la capacidad de mantener el equilibrio fisiológico del medio interno mediante mecanismos fisiológicos coordinados que compensan los cambios de su entorno (revisado en Rhoades & Bell, 2012). Desde entonces se define el término de *homeostasis* como un proceso dinámico que mantiene las condiciones fisiológicas óptimas para el buen funcionamiento de los seres vivos bajo diversos cambios en el ambiente. El individuo debe percibir la variabilidad del medio interno y ser capaz de activar mecanismos que restablezcan las condiciones fisiológicas normales. Esto se lleva a cabo ya sea mediante un proceso de retroalimentación negativa o retroalimentación positiva, la cual se compone de cuatro elementos importantes: (i) la variable regulada; (ii) un sensor (o detector) de los cambios; (iii) un controlador (o rectificador) que compara un estado basal óptimo con las desviaciones producidas por las demandas del medio externo; y (iv) un efector que ejecuta acciones para llevar la variable regulada al estado basal óptimo (Rhoades & Bell, 2012). Mediante este sistema de retroalimentación negativa, la variable regulada se percibe, se envía información al controlador y el efector actúa para oponerse al cambio.

Para explicar cómo funciona el sistema de retroalimentación positiva en la ingesta de alimentos un ejemplo sería el siguiente: cuando los niveles de glucosa en sangre disminuyen (variable regulada), la caída de glucosa es detectada por las células  $\beta$  del páncreas y por algunas neuronas en el encéfalo (sensor). El páncreas responde promoviendo la secreción de glucagón. En el hígado (efector), el glucagón promueve la producción de glucosa a partir de glucógeno (un polisacárido de reserva energética formada por cadenas ramificadas de glucosa) y consecuentemente la glucosa es enviada a la circulación sanguínea, reestableciendo así los niveles de glucosa en sangre (Barret, Barman, Boitano & Brooks, 2010). También en estado de hipoglucemia la concentración en sangre de

ghrelina incrementa (Cummings *et al.*, 2001), la cual estimula neuronas promotoras de hambre e inician la conducta de ingesta de alimentos y por tanto, reestablecen los niveles de glucosa (Rui, 2013) (véase la figura 1). Una vez que el individuo comienza la ingesta de alimentos, los niveles de ghrelina comienzan a bajar hasta un estado basal (Wisse & Weigle, 2001).

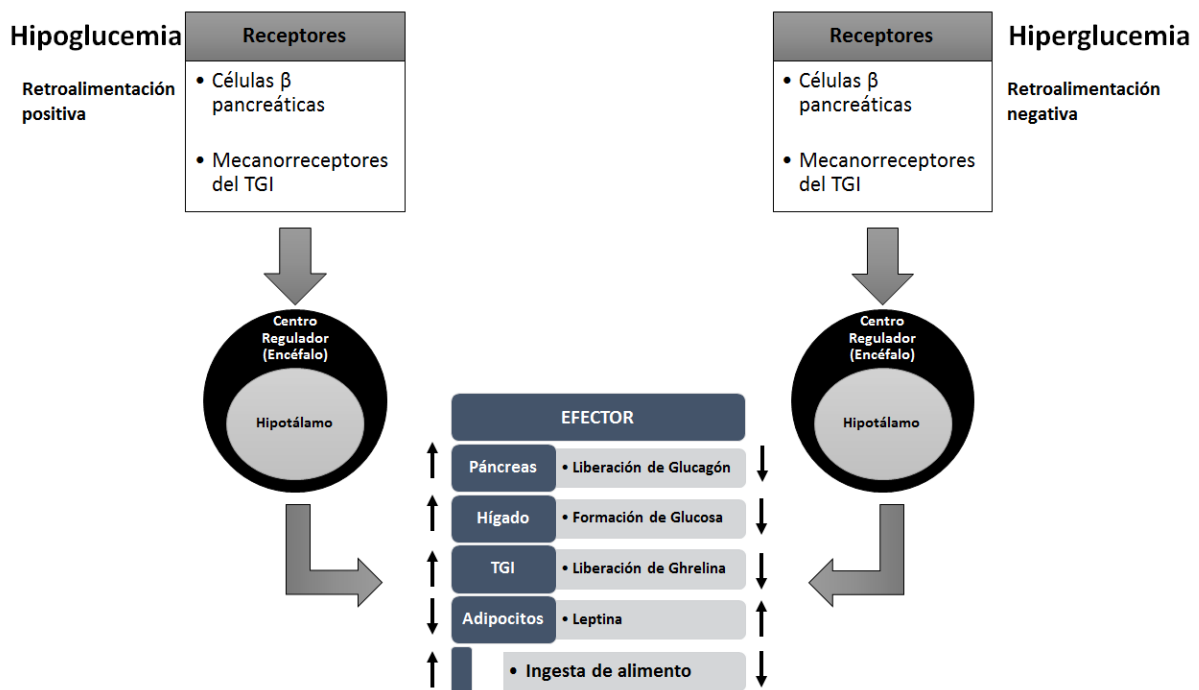
Se ha propuesto que el hígado, una vez que detecta el estado hipoglucemiante, envía esta información al encéfalo por medio del nervio vago (Novin, VanderWeele & Rezek, 1973; Ritter & Taylor, 1990).

Por otra parte, cuando los niveles de glucosa en sangre aumentan (hiperglucemia), se llevaría a cabo un proceso de retroalimentación negativa, en el cual las células  $\beta$  del páncreas comienzan a secretar insulina e inhibir la liberación de glucagón. La insulina estimula el almacenamiento de glucosa en las células y de grasa en el tejido adiposo, además de favorecer la síntesis de glucógeno en el hígado, lo que da como consecuencia una disminución de glucosa en sangre. En una situación en la cual aumentan los niveles de glucosa, disminuyen los niveles de ghrelina, que junto con lo anterior llevan a un estado de saciedad (ver figura 1).

Cabe mencionar que las células del tejido adiposo (adipocitos) secretan leptina, la cual también es señalada al encéfalo, disminuyendo así también la ingesta de alimento.

Por otra parte, en el TGI se secretan otros péptidos como la colecistocinina (CCK) y el péptido similar al glucagón (GLP-1) que también tienen un efecto de saciedad, pero a diferencia de la leptina e insulina no llegan al encéfalo de manera directa, sino que mandan la información por medio de aferencias vagales a un núcleo de relevo situado en el tallo cerebral denominado núcleo del tracto solitario (NTS), donde se detecta la señal y es enviada al núcleo hipotalámico dorsal medial (Rinaman, 2007), que será descrito a mayor detalle en el siguiente apartado.

El hipotálamo es una estructura cerebral que la constituyen varios núcleos, pero sólo algunos están involucrados en la regulación de la alimentación. En el siguiente apartado se mencionaran los núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación de la ingesta de alimento, así como el tipo de neuronas que expresa cada núcleo y sus conexiones.

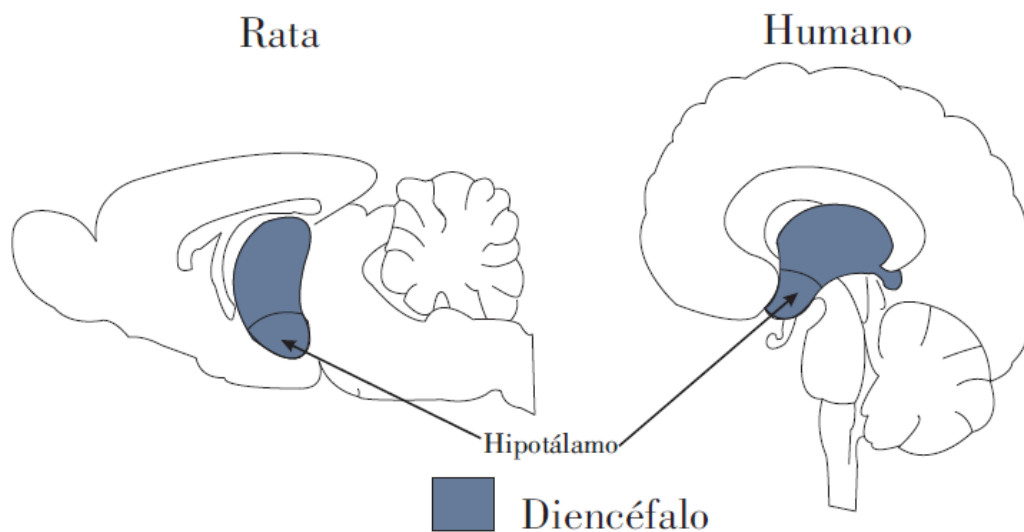


**Figura 1.** Ejemplo de un sistema de retroalimentación positiva y negativa en la regulación de la ingesta de alimento. Los receptores representan el Sensor, componente de un sistema homeostático que detecta los cambios de la variable a regular. Las flechas negras hacia arriba, representa un aumento en los niveles del péptido o molécula y las flechas negras hacia abajo representan una disminución del péptido o molécula.

## 1.2 Hipotálamo como integrador de señales periféricas de hambre y saciedad

El hipotálamo regula las siguientes necesidades fisiológicas básicas: controla la presión arterial, regula la temperatura corporal, regula la reproducción sexual, controla la respuesta al estrés, la regulación del hambre y la sed, regula los ciclos circádicos, el ciclo sueño/vigilia y el control hormonal de diversas funciones del cuerpo (Martínez-González, Navarro & Prospéro-García, 2001; Shizgal & Hyman, 2013).

El hipotálamo se encuentra en el diencefalo, debajo del Tálamo (ver figura 2) y está constituido por muchos núcleos que regulan alguna de las funciones antes mencionadas. Particularmente en la regulación de la ingesta de alimentos, se involucran un conjunto de núcleos hipotalámicos:



**Figura 2. Localización del diencefalo en el encéfalo de rata y humano.** Representación gráfica de un corte sagital medial de un encéfalo de rata (a la izquierda) y uno de Humano (a la derecha). La zona coloreada en azul está representando al diencefalo.

El **núcleo arcuato** (ARC) es una estructura que rodea la parte ventral del tercer ventrículo y está muy cerca de la eminencia media (ver figura 3), la cual tiene una parte de la barrera hematoencefálica (BHE) fenestrada, es decir, que tiene poros que permiten la entrada de algunas sustancias de la circulación sanguínea como por ejemplo la leptina (Suzuki, Jayasena, & Bloom, 2012).

Las neuronas del ARC contienen al menos dos subtipos de poblaciones neuronales involucradas en la regulación de la ingesta de alimentos: las neuronas que expresan pro-opio-melano-cortina (POMC) y las neuronas que expresan neuropéptido Y (NPY) (Suzuki *et al.*, 2012). En las neuronas que contienen NPY además se sintetiza otro péptido denominado Péptido relacionado con Agouti (AgRP) (Hahn, Breininger, Baskin, & Schwartz, 1998). Las neuronas NPY/AgRP son promotores del hambre (orexigénicos) y proyectan a otros sitios del hipotálamo: al **núcleo paraventricular** (NPV), al **hipotálamo lateral** (HL) y al área perifornical (APF). El NPY incrementa la ingesta de alimento principalmente por estimulación de sus receptores en el APF (Gehlert, 1999). Por otra parte, la POMC es una proteína que es precursor de otras proteínas, una que cabe mencionar en esta tesis es una hormona, la hormona estimuladora de los  $\alpha$ -melanocitos ( $\alpha$ -MSH). La  $\alpha$ -MSH suprime la ingesta de alimento a través de la activación de los receptores de melanocortina 3 y 4 (MC3R y MC4R) (Fan, Boston, Kesterson, Hruby, & Cone, 1997). Adicionalmente, en las neuronas de POMC también sintetizan una proteína conocida como transcrito regulado por la cocaína y la anfetamina (CART) que tiene propiedades de promotor de la saciedad (anorexigénico) (Berthoud & Munzberg, 2011).

En el ARC, la leptina (del griego “*leptos*”, delgado) cruza la BHE e inhibe la acción de las neuronas NPY/AgRP (Morris & Rui, 2009), produciendo un efecto anorexigénico. Además, la leptina estimula a sus receptores LEPRb, ubicados principalmente en neuronas que contienen POMC/CART, incrementando su actividad y, por tanto suprimiendo la ingesta de alimento (Elias *et al.*, 1999).

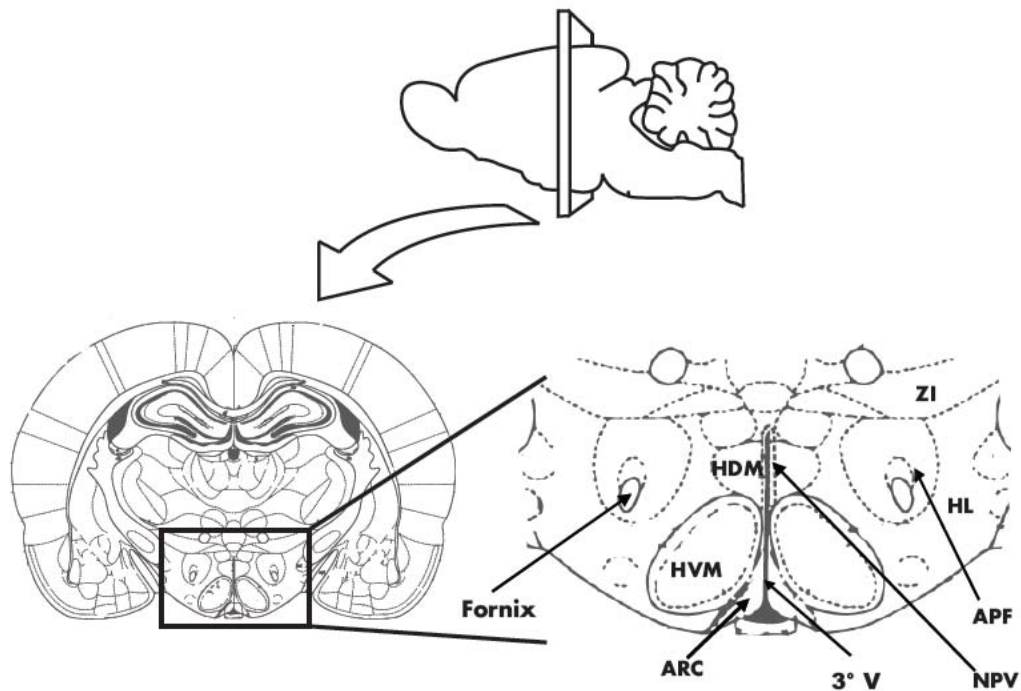
Recientemente se ha demostrado que los receptores de leptina también se expresan en otros núcleos no-hipotalámicos como el área tegmental ventral (ATV) donde disminuye la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Rui, 2013).

El **NPV** es una estructura que rodea el tercer ventrículo y libera hormonas hipofisiotrópicas como la hormona liberadora de corticotropina, la cual aumenta el metabolismo de las células de todo el cuerpo (Rui, 2013). Las neuronas del ARC proyectan a este núcleo para ejercer efectos en la ingesta de alimento y a su vez el NPV envía sus eferencias a núcleos del tallo cerebral que controlan el sistema nervioso autónomo (Suzuki *et al.*, 2012). El AgRP se libera en el NPV e inhibe la actividad neuronal por medio de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Se ha propuesto que estas proyecciones inhibitorias son necesarias para que el AgRP estimule la conducta de ingesta de alimento (Atasoy, Betley, Su, & Sternson, 2012). Aunque la manera más reconocida por la cual el AgRP promueve esta conducta, es disminuyendo la señal de saciedad por medio del bloqueo de receptores de melanocortina MC3 y MC4 (Ollman *et al.*, 1997).

El **núcleo ventromedial del hipotálamo** (HVM) está adyacente al ARC (ver figura 3). A mitad del siglo pasado se demostró que las lesiones electrolíticas en el HVM y otras zonas aledañas (fornix, ARC y núcleo premamilar ventral) en ratas, producía un incremento de peso corporal (Hetherington & Ranson, 1940). Hetherington y Ranson sugirieron entonces que el HVM era un “área reactiva” a señales de los adipocitos y por medio de esta promovían estimulación para inducir efectos de saciedad (Hetherington & Ranson, 1940). Posteriormente, se demostró que la estimulación eléctrica del HVM detiene la ingesta de alimento (Bielajew, Stenger, & Schindler, 1994).

El HVM contiene una predominante población de neuronas glutamatérgicas y estas proporcionan excitación a neuronas POMC/CART en el ARC (Tong *et al.*, 2007), lo que sugiere que el HVM es un núcleo clave en promover la respuesta para detener la ingesta de alimento.





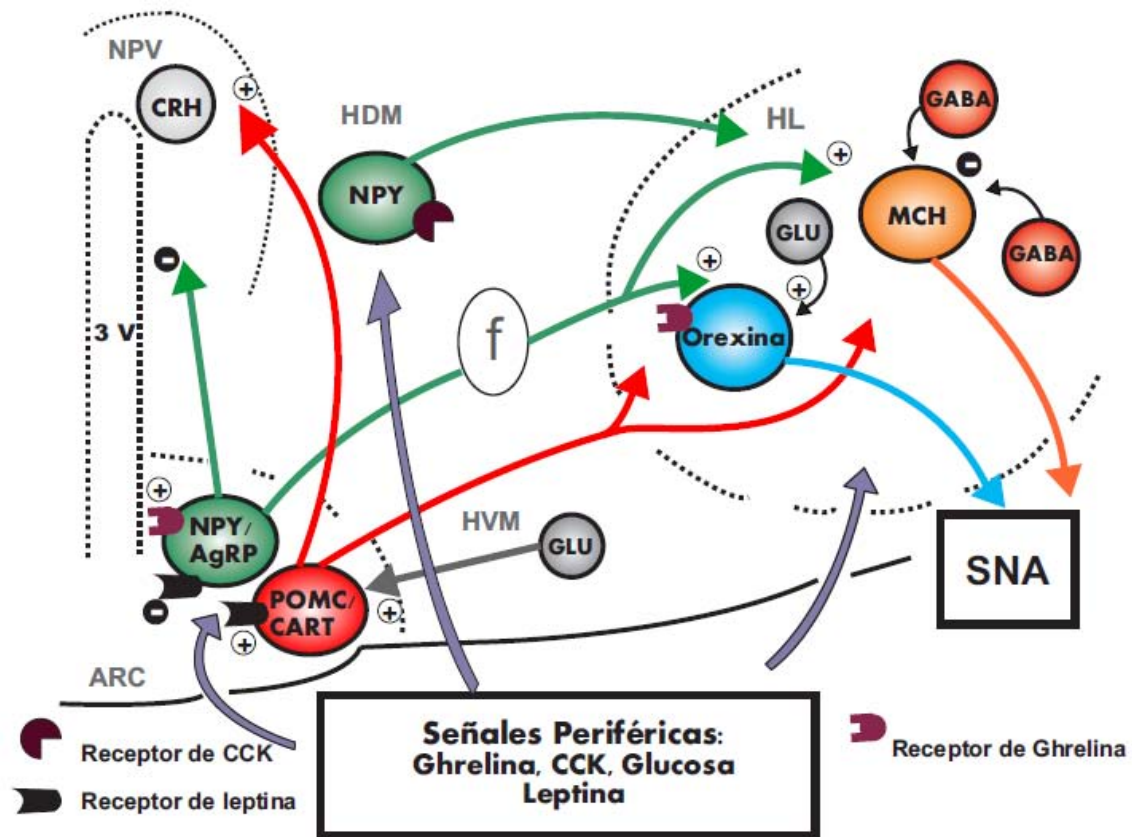
**Figura 3. Representación gráfica de los núcleos hipotalámicos involucrados en la ingesta de alimento.** En la parte inferior izquierda se observa un corte coronal de rata y en la imagen inferior derecha se muestra un acercamiento del corte coronal (ventral), para poder observar con mayor claridad los núcleos hipotalámicos. Abreviaciones: núcleo arcuato (ARC), núcleo paraventricular (NPV), núcleo ventromedial del hipotálamo (HVM), núcleo dorsomedial del hipotálamo (HDM), hipotálamo lateral (HL), zona incerta (ZI), área perifornical (APF) y tercer ventrículo (3° V).

El **hipotálamo dorsomedial** (HDM, figura 3) contiene en su mayoría neuronas que expresan NPY, las cuales proyectan al NPV y al HL (Rui, 2013). Además, se ha reportado que las neuronas de NPY en esta zona, contienen receptores de CCK (CCK1) que regulan su actividad (Bi, Scott, Kopin, & Moran, 2004). La CCK es una hormona peptídica promotora de saciedad, secretada por el duodeno, que facilita la digestión de lípidos en el intestino delgado por medio de la liberación de sales biliares desde la vesícula biliar (Carlson, 2013; Rhoades & Bell, 2012; Appleyard *et al.*, 2007).

Finalmente, el **área lateral del hipotálamo** se divide en 3 sub-áreas: el APF, la zona incerta (ZI) y el HL propiamente. La excitación del HL por medio de inyecciones directas de glutamato, promueve la ingestión de alimento (Stanley, 1996; se verá a mayor profundidad en el capítulo 2.1). Así como el centro de saciedad es controlado por el HVM, se considera al HL como controlador del “centro de hambre” (Hans-Rudolf Berthoud, 2012). Ambos núcleos son importantes para regular la ingesta de alimento.

Entre las aferencias hipotalámicas que llegan al HL, son de importancia las que surgen de neuronas que contienen NPY/AgRP desde el ARC, que proyectan y excitan a neuronas orexinérgicas y MCHérgicas (Broberger, De Lecea, Sutcliffe, & Hökfelt, 1999; Sakurai *et al.*, 2005). Además de estas aferencias, el HL recibe información de varias estructuras cortico-límbicas como la corteza prefrontal/orbitofrontal, corteza insular, bulbos olfatorios, amígdala, hipocampo y núcleos del tallo cerebral (Ter Horst, de Boer, Luiten, & van Willigen, 1989), que están involucradas en asociar características físicas del alimento y en la valencia positiva o negativa del alimento (estimación de qué tan agradable es el estímulo).

En resumen, cuando aumentan los niveles en sangre de ghrelina, en un estado de ayuno (Cummings *et al.*, 2001), ésta se une a sus receptores en neuronas de NPY/AgRP en el ARC y las estimula. El AgRP y el NPY se liberan en el NPV y en el HL. En el NPV, el AgRP promueve la ingesta de alimento mediante la activación de neuronas GABAérgicas (Atasoy, Betley, Su, & Sternson, 2012). El NPY produce sus efectos estimulando neuronas en el APF (Gehlert, 1999) y neuronas MCHérgicas y orexinérgicas en el HL, promoviendo así, la ingesta de alimento (Broberger, De Lecea, Sutcliffe, & Hökfelt, 1999; Sakurai *et al.*, 2005). Por otra parte, la leptina es capaz de estimular neuronas POMC/CART en el ARC (Elias *et al.*, 1999), las cuales proyectan hacia el HL y producen saciedad. Así mismo, la CCK actúa como sustancia promotora de saciedad al inhibir a neuronas que contienen NPY en el HDM por medio de la activación de sus receptores CCK1 (Bi, Scott, Kopin, & Moran, 2004) (ver figura 4).



**Figura 4. Ilustración de la integración de señales de los núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación de la ingesta de alimento.** Las flechas indican la dirección de las proyecciones y los signos indican activación (+) o inhibición (-). Notar las proyecciones de las neuronas NPY/AgRP hacia el hipotálamo lateral (HL), donde activan neuronas MCHérgicas y Orexinérgicas. Abreviaturas: tercer ventrículo (3 V), fornix (f), glutamato (GLU), hormona liberadora de corticotropina (CRH) y sistema nervioso autónomo (SNA). *Modificado de Berthoud & Munzberg, 2011, página 31.*

### 1.2.1 Neuronas Orexinérgicas

Las orexinas (del griego “*orexis*”, apetito), también llamadas hipocretinas, se expresan específicamente en neuronas del HL, el HDM y APF (véase figuras 3 y 4). Comprenden dos tipos diferentes de péptidos, orexina A y B. Las cuales son derivadas de un precursor peptídico común, *prepro-orexina* (Sakurai *et al.*, 1998). Tienen dos tipos de receptores acoplados a proteínas G, el receptor a orexina 1 (OX1) se une a una proteína  $G_{i/o}$  y a una  $G_{q/11}$ , mientras que el receptor a orexina 2 (OX2) se une a una proteína  $G_{q/11}$  (para mayor detalle sobre receptores unidos a proteínas G, ver Apéndice A) (Pan *et al.*, 2008).

Desde su descubrimiento (DeLecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998) se sabe que las neuronas orexinérgicas tienen un papel importante en promover el apetito y mantenimiento de la vigilia. Dicho efecto está mediado por la gran cantidad de proyecciones orexinérgicas del hipotálamo hacia núcleos del tallo cerebral como el locus coeruleus, los núcleos del rafe y la zona reticular pontina (Peyron *et al.*, 1999).

La pérdida de neuronas orexinérgicas puede producir Narcolepsia, un trastorno de la vigilia, caracterizado por cambiar repentinamente de un estado de vigilia a una fase del sueño donde se pierde el tono muscular, llamada sueño de movimientos oculares rápidos (MOR). Se ha observado que ratones que no expresan orexinas pueden presentar hipofagia, además de presentar narcolepsia (Chemelli *et al.*, 1999; Smart, Haynes, Williams, & Arch, 2002).

Se ha reportado que la administración de un agonista a receptores OX1 en el tallo cerebral e intracerebroventricular (i.c.v.) es capaz de inducir ingesta de alimento (Parise *et al.*, 2011; Székely, Pétervári, Balaskó, & Hernádi, 2002).

La ingestión de alimento, como hemos visto, es promovida por la liberación de péptidos en el TGI o tejido adiposo, que logran comunicarse con neuronas del ARC como las que contienen NPY o POMC (ver Tabla 1). En este caso, las neuronas orexinérgicas también son sensibles a los cambios extracelulares de ghrelina (Tsuneki, Wada, & Sasaoka, 2010; Yamanaka *et al.*, 2003). Por ejemplo, la ghrelina secretada en el TGI es capaz de incrementar la frecuencia de potenciales de acción

en neuronas orexinérgicas (revisado en Girault *et al.*, 2012). Lo cual indica que las neuronas orexinérgicas son capaces de responder ante señales periféricas promotoras de hambre.

Se ha propuesto que las neuronas orexinérgicas, principalmente las que estimulan receptores OX1, además de inducir ingesta de alimento, también refuerzan conductas de búsqueda de drogas de abuso (Aston-Jones, Smith, Moorman, & Richardson, 2009; Georgescu *et al.*, 2005). El efecto reforzante que producen estas neuronas lo hacen a través de sus proyecciones hacia neuronas dopaminérgicas del ATV, área implicada en el sistema de motivación y recompensa (Bielajew & Shizgal, 1986; Balcita-Pedecino & Sesack, 2007). Narita *et al.* (2006) demostraron que microinyecciones de orexina A y B en el ATV incrementa los niveles de dopamina en el núcleo accumbens (NAc) y disminuyen con un antagonista selectivo a receptores de orexina A. Lo cual indica que la activación de las neuronas orexinérgicas desencadena la liberación de dopamina en el NAc a través de la activación de neuronas dopaminérgicas en el ATV. El NAc es una estructura prosencefálica que se compone de dos sub-regiones, la región *Shell* y la región *core*. El NAc es extensamente innervado por eferencias dopaminérgicas del ATV y el incremento de dopamina en el NAc está relacionado con la sensación subjetiva de placer y responsable de conductas adictivas (Koob & Moal, 2008; Robinson & Berridge, 2000), ya que se ha observado una relación entre el incremento de dopamina en el NAc y el trabajo (respuestas a una palanca) de los roedores para recibir infusiones intravenosas de cocaína, amfetamina, cannabinoides y nicotina (Koob & Moal, 2008; Koob & Volkow, 2010 ).

Sin embargo, cabe mencionar que también el incremento en los niveles de dopamina está relacionada con señales que anticipan la llegada del reforzador (Ljungberg *et al.*, 1992, Schultz 1997).

Lo antes mencionado sugiere que las conexiones entre las neuronas orexinérgicas, el ATV y el NAc forman un circuito importante en la regulación de la ingesta de alimento.

Existen otro tipo de neuronas del HL que proyectan directamente al NAc, denominadas neuronas que expresan la hormona concentradora de melanina (MCH). Estas neuronas, como veremos en el siguiente apartado, también regulan la ingesta de alimentos entre otras funciones como el sueño y la vigilia, pero en esta tesis nos centraremos en describir los conocimientos generales sobre el papel de estas neuronas en la regulación de la ingesta de alimento.

### 1.2.2 Neuronas MCHérgicas

Las neuronas MCHérgicas se expresan en la ZI, APF y el HL (Risold *et al.*, 2009). Estas neuronas proyectan al núcleo pedúnculo pontino tegmental (PPT, por sus siglas en inglés), hacia la corteza motora, el bulbo olfatorio, la corteza prefrontal y al NAc (Elias *et al.*, 2008; Risold *et al.*, 2009). Hay evidencia que demuestra que las neuronas MCHérgicas co-expresan GABA, ya que se ha encontrado RNA mensajero de la enzima (descarboxilasa de ácido glutámico) que sintetiza GABA (Elias *et al.*, 2008).

Se han descrito dos tipos de receptores de MCH que están acoplados a proteínas G: MCHR1 ( $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$ ), el cual se ha encontrado en todos los vertebrados; y MCHR2 ( $G_{q/11}$ ), que no es funcional en roedores (ver Apéndice A) (MacNeil, 2013).

Qu *et al.* (1996) fue el primero en mostrar que la administración i.c.v. de MCH incrementaba la ingesta de alimento. Brevemente, la administración de 5 o 30  $\mu\text{g}$  de MCH i.c.v en ratas, incrementa la ingesta de alimento de 150% a 200% en 2, 4 y 6 horas (Qu *et al.*, 1996). En otro estudio, concentraciones bajas de MCH i.c.v (0.1 y 0.5  $\mu\text{g}$ ) no producen ningún efecto, pero concentraciones altas (1.5 y 10  $\mu\text{g}$ ) sí incrementan la ingestión de alimento hasta un 100% en 2 y 4 horas (Della-Zuana *et al.*, 2002).

Estudios de manipulación genética en roedores, han demostrado que la MCH y sus receptores están involucrados en la regulación del balance energético, ya que se

has visto que una mutación en el gen que expresa MCH produce hipofagia e incrementa el metabolismo en roedores y se sabe que la expresión de MCH se eleva en ratones deficientes de leptina, también conocidos como ratones *ob/ob*, los cuales presentan hiperfagia (Shimada, Tritos, Lowell, Flier, & Maratos-Flier, 1998). Sugiriendo que la liberación de MCH induce la conducta de ingesta de alimento y que la leptina es una señal clave para detener la ingesta de alimento por medio de la inhibición de neuronas MCHérgicas (McNeil, 2013).

Además de administraciones i.c.v., la administración directa en la región *Shell* del NAc en ratas, la cual es rica en receptores MCH1R (Chung *et al.*, 2009), incrementa la ingesta de alimento hasta por 4 horas (Guesdon *et al.*, 2008). Es muy probable que los receptores MCH1R ejerzan una fuerte inhibición en las neuronas del NAc, debido a la activación de la proteína  $G_{i/o}$ . En apoyo a esta idea, Sears *et al.* (2010) demostraron que la estimulación de receptores MCHR1 en el *Shell* del NAc suprime los potenciales de acción de neuronas del NAc.

Desde hace tiempo (Stratford & Kelley, 1999) se ha propuesto que la pausa general de la actividad en el NAc es necesaria para iniciar y mantener la conducta de alimentación y algunos otros autores además de Sears *et al.* (2010) han obtenido más evidencia que sugieren que la inhibición de neuronas del NAc produce un fuerte impulso para ingerir alimentos (Krause, 2010).

<b>Péptidos Anorexigénicos</b>			
	<b>Receptor</b>	<b>Origen del péptido</b>	<b>Principales Proyecciones en el SNC</b>
Hormona estimuladora de los alfa melanocitos ( $\alpha$ -MSH)	MC3 y MC4	Núcleo Arcuato	Núcleo Paraventricular y Amígdala
Transcripción regulada por anfetamina y cocaína (CART)	No identificado	Núcleo Arcuato	Hipotálamo Lateral
Colecistocinina (CCK)	CCK1R y CCK2R	Duodeno, Núcleo Arcuato, Área Preóptica Medial y Área tegmental Ventral	CCK1: Núcleo Paraventricular, Hipotálamo Dorsomedial CCK2: Amplia distribución
Péptido similar al glucagón 1 (GLP-1)	GLP-1R	Tracto Gastrointestinal y Núcleo del Tracto Solitario.	Núcleo Paraventricular, Núcleo Arcuato e Hipotálamo ventromedial
Leptina	LEPR-b	Tejido Adiposo	Núcleo Arcuato, Hipotálamo Ventromedial e Hipotálamo Lateral
<b>Péptidos Orexigénicos</b>			
Neuropéptido Y (NPY)	Y1R e Y5R	Núcleo Arcuato e Hipotálamo Dorsomedial.	Hipotálamo Lateral
Péptido asociado con Agouti (AgRP)	MC3 y MC4 (antagonista)	Núcleo Arcuato	Núcleo Paraventricular, Amígdala e Hipotálamo Lateral
Hormona concentradora de Melanina (MCH)	MCH1R y MCH2R	Hipotálamo Lateral, Área perifornical y Zona Incerta	Corteza Cerebral, Caudado Putamen, Amígdala y Formación Hipocampal
Ghrelin	GSH-R1a y GSH-R1b	Estomago	Núcleo Arcuato y Área Tegmental Ventral
Orexina	OX1R y OX2R	Hipotálamo Lateral, Área Perifornical e Hipotálamo Dorsomedial	Hipotálamo Ventromedial, Núcleo Paraventricular, Locus Coeruleus y Núcleo del Rafé

**TABLA 1.** Principales Péptidos que regulan la ingesta de alimento: péptido, clasificación, receptores, ubicación y principales proyecciones en el SNC.



## **Capítulo 2. Mecanismos fisiológicos del sistema glutamatérgico en la regulación de la ingesta de alimento**

### **2.1 Tipos de receptores Glutamatérgicos**

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC y se sabe que tiene 3 tipos de receptores ionotrópicos y 8 subtipos de receptores metabotrópicos (Conn & Pin, 1997; Hölscher, Gigg & O'Mara, 1999).

Los receptores ionotrópicos de glutamato son los siguientes: N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5metil-4-isoxazol-propionato (AMPA) y de kainato. Por otra parte, los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) se dividen en 3 grupos: el grupo I se compone por mGlu1R y mGlu5R, los cuales se acoplan a una proteína  $G_{q/11}$ ; mientras que los del grupo II (mGlu2R, mGlu3R) y grupo III (mGluR 4, 6, 7 y 8) se acoplan a una proteína  $G_{i/o}$  (Conn & Pin, 1997; Pisani *et al.*, 2001).

### **2.2 Sistema glutamatérgico en la regulación de la ingesta de alimento**

Desde que Stanley *et al.* (1996) demostró que la administración de glutamato en el HL y sus agonistas (principalmente a receptores de Kainato y NMDA) inducen ingesta de alimentos en ratas saciadas, se sabe que el sistema glutamatérgico juega un papel importante en esta conducta. Posteriormente Rada, Tucci, Murzi y Hernández (1997) describieron la liberación de glutamato en dos áreas involucradas en la alimentación: el HL y el NAc. Mostraron que en los primeros 60 segundos de haber iniciado la ingesta de alimento, incrementaban los niveles extracelulares de glutamato hasta un 300% y éste disminuía conforme los roedores quedaban saciados.

La liberación de glutamato tiene un papel diferente en otras estructuras cerebrales no hipotalámicas. Por ejemplo, Rada *et al.* (1997) observaron que en la región *Shell*

del NAc, los niveles extracelulares de glutamato disminuyeron hasta 50%, lo cual concuerda con la hipótesis sobre la inhibición global de las neuronas del NAc para inducir la conducta de ingesta de alimento.

Las proyecciones provenientes del núcleo basal medial de la amígdala (BMA), del núcleo cortical anterior de la amígdala (CoA) y del núcleo preóptico magnocelular (MCPO) son importantes inervaciones glutamatérgicas que pueden activar a neuronas del HL (Henny & Jones, 2006; Niu, Yokota, Tsumori, Oka, & Yasui, 2012).

Los núcleos BMA y CoA reciben aferencias del bulbo olfatorio así como de la corteza insular y del núcleo parabraquial, los cuales a su vez reciben información gustativa y olfativa (Yasui *et al.*, 1991; Bernanrd *et al.*, 1993). Se ha demostrado, utilizando un marcador de neuronas glutamatérgicas (transportador vesicular de glutamato 2, VGLUT2), que estos núcleos contienen en su mayoría neuronas glutamatérgicas y en menor cantidad, neuronas GABAérgicas (Niu *et al.*, 2012). A su vez, ambos núcleos (BMA y CoA) envían sus fibras hasta el HL y que esta vía está implicada en la ingesta de alimentos (Petrovich *et al.*, 1996). Niu *et al.* (2012) decidieron investigar, por medio de un marcador anterógrado si los núcleos amigdalinos BMA y CoA proyectan a neuronas MCHérgicas y encontraron que los axones del BMA y del CoA hacen sinapsis en esas neuronas (Niu, Yokota, Tsumori, Oka, & Yasui, 2012). Esto comprueba la conexión de las aferencias glutamatérgicas provenientes de la amígdala al hipotálamo lateral.

Así mismo Henny y Jones (2006) se dieron a la tarea de determinar si las proyecciones del prosencéfalo basal (PB) son de tipo glutamatérgicas o GABAérgicas y si así regulan de manera distinta la actividad de las neuronas orexinérgicas. Por medio de marcación anterógrada con biotina dextrano amina (BDA) en el núcleo preóptico magnocelular (MCPO) de ratas, encontraron que las fibras marcadas con BDA proyectaban hacia el HL (41%), APF (11%) y HDM (9%). Además, observaron que cerca de 31% son glutamatérgicas y 67% GABAérgicas (el resto eran colinérgicas) (Henny & Jones, 2006), lo que sugiere que las neuronas

del PB, específicamente las que surgen del MCPO, pueden excitar a las neuronas orexinérgicas, promoviendo la ingestión de alimento. Sin embargo, hay una gran cantidad de neuronas GABAérgicas que proyectan a las neuronas orexinérgicas, lo que sugiere que también hay una vía inhibitoria que podría estar regulando la actividad de las neuronas orexinérgicas.

Se ha visto que neuronas orexinérgicas y MCHérgicas están rodeadas por terminales glutamatérgicas (Li, Gao, Sakurai & van den Pol, 2002) y se ha demostrado que las neuronas orexinérgicas expresan receptores NMDA y AMPA (Li *et al.*, 2002). Adicionalmente, se ha reportado que el efecto del NPY en el HL y APF disminuye la ingesta de alimento de manera dependiente de la dosis con la administración de un antagonista a receptores NMDA (D-AP5), sugiriendo que el sistema glutamatérgico contribuye en la excitabilidad de neuronas hipotalámicas.

El sistema glutamatérgico contiene receptores que modulan su actividad, los cuales son receptores metabotrópicos. Hay evidencia que demuestra que los mGluR del grupo I están involucrados en conductas de búsqueda de reforzadores naturales como el alimento y de sustancias de abuso (Besheer, Fisher, Jaramillo, Frisbee & Cannady, 2014; Kenny *et al.*, 2003; Mao & Wang, 2001; Olive, 2010). Especialmente, los mGlu5R son los que se han estudiado más en la regulación de la ingesta de alimento y el balance energético (Bradbury *et al.*, 2005).

## 2.3 Receptores metabotrópicos mGlu5 en la regulación de la ingesta de alimento

Como se mencionó los mGluR5 pertenecen al grupo I (mGlu I) y se acoplan a una proteína  $G_{q/11}$  que inicia un proceso de transmisión de segunda mensajería y se encuentran en la postsinapsis de la membrana (Pisani *et al.*, 2001).

La activación de la proteína  $G_{q/11}$ , tiene como consecuencia la activación de la fosfolipasa C (PLC), que a su vez, toma al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) de sustrato para transformarlo en dos moléculas que sirven como segundos mensajeros: el inositol 1, 4, 5-trifosfato ( $IP_3$ ) y el diacilglicerol (DAG). El  $IP_3$  se une a sus receptores en la membrana del retículo endoplasmático, liberando el  $Ca^{2+}$  almacenado en este compartimento (Bear, 2007).

Los mGlu5R se expresan en áreas implicadas con el sistema de recompensa como el NAc y el HL (van den Pol *et al.*, 1994, 1995). Farmacológicamente, los mGlu5R regulan la ingesta de sustancias de abuso (Bird *et al.*, 2014). Por ejemplo, la administración sistémica de 2-metil-6-(feniletinil) piridina (MPEP), un antagonista no-selectivo a mGlu5R, reduce la autoadministración de cocaína en ratones, reduce el consumo de etanol en ratas y disminuye la autoadministración de nicotina en ambas especies (Bird *et al.*, 2014; Gass & Olive, 2009; Kenny *et al.*, 2003). La administración de MPEP bloquea el aumento de dopamina en el NAc inducido por la administración de metanfetamina (Golembiowska *et al.*, 2003), lo cual demuestra que las vías dopaminérgicas que están asociadas al sistema de motivación y recompensa interactúan con los mGlu5R.

Bradbury *et al.* (2005) estudió el efecto de los mGlu5R en la ingesta de alimento y el balance energético. Utilizó ratones que debido a una mutación genética, no expresaban este receptor (mGlu5R  $-/-$ ). Midiendo el consumo de alimento y el peso corporal en ratones con acceso *ad libitum* de alimento, observó que a pesar de que los ratones mGlu5R  $-/-$  ingieren el mismo número de calorías, tienden a ganar

menos peso. En este mismo estudio se estableció una dieta alta en grasas en ratones mGlu5R  $-/-$  y mGlu5R  $+/+$ , siendo los ratones mGlu5R  $-/-$  más resistentes a la obesidad inducida por esta dieta que los ratones normales. Además de que los ratones mGlu5R  $-/-$  ganaban menos peso, tenían concentraciones de leptina más bajas en plasma, lo cual indica que hay una disminución en la cantidad de adipocitos. Además, midiendo el consumo de alimento después de una privación de alimento de 14 h, la administración de un antagonista selectivo mGlu5R 3-((2-metil-1,3-tiazol-4-il) etinil) piridina (MTEP) disminuyó de manera dosis-dependiente la ingesta inducida por privación de alimento. Pero sólo en ratones mGlu5R  $+/+$  y no en los carentes de este receptor, sugiriendo que la reducción en la ingesta de alimento inducida por MTEP es dependiente de los mGlu5R.

Estos hallazgos demuestran que los mGlu5R están involucrados en el metabolismo, ya que ratones que no expresan este receptor tienen menores concentraciones de leptina e insulina en sangre, además de que estos ratones no ganan peso corporal y son resistentes a dietas altas en grasas.

Como se ha mencionado, las señales del estado metabólico son integradas en el hipotálamo, particularmente en el ARC, en donde actúa la leptina. Después del estudio de Bradbury *et al.* (2005) ha habido pocos estudios que muestren en qué zonas específicas del cerebro los mGlu5R producen sus efectos sobre la regulación del balance energético y la ingesta de alimento.

Se ha reportado que la administración del agonista selectivo a los mGlu5R (*RS*)-2-Chloro-5-hydroxyphenylglycine (CHPG), administrado de manera i.c.v. (1.0  $\mu$ mol o 1.5  $\mu$ mol en 5  $\mu$ l de vehículo) en ratas saciadas, incrementa la ingesta de alimento (Ploj *et al.*, 2010). Este incremento se nota a las 2, 4, 6 y 8 horas después de haber administrado el fármaco (Ploj *et al.*, 2010).

En otro estudio, en donde también administran CHPG, en el HL de manera unilateral, incrementa la ingesta de alimento después de 1 hora de haber sido

administrado a una concentración de 50 nmol (en 0.3 µl de vehículo) y después de 2 horas a una concentración de 25 nmol (Charles *et al.*, 2014). Antes de los estudios mencionados, no se había demostrado que la estimulación de los mGlu5R directamente en el SNC producía efectos en la ingesta de alimento. Sin embargo estudios *in vitro* ya habían encontrado indicios de que estos receptores regulan la actividad de neuronas MCHérgicas (Huang & van den Pol, 2007). Utilizando la técnica de fijación de voltaje (*patch-clamp*) combinado con la utilización de ratones transgénicos que expresan una proteína verde fluorescente (GFP) en las neuronas MCHérgicas, Huang y van den Pol (2007) encontraron que la estimulación de los mGluR I causaba despolarización en neuronas MCHérgicas. Además, observaron que los potenciales evocados por corrientes excitadoras postsinápticas de neuronas MCHérgicas, eran dependientes de los mGlu5R y demostraron que la excitación de estas neuronas promovida por los mGlu5R se debe a la inhibición de corrientes de  $K^+$  y la activación del acarreador de iones  $Na^+/Ca^{2+}$ . Por otra parte hay evidencia que sugiere que los endocannabinoides, moléculas de naturaleza lipídica que se unen a receptores de cannabinoides 1 en el SNC, también facilitan la excitación de neuronas MCHérgicas (pero no de las neuronas orexinérgicas), por medio de un mecanismo de transmisión retrogrado.

## Capítulo 3. Mecanismos fisiológicos del sistema endocannabinérgico en la regulación de la ingesta de alimento

### 3.1 Endocannabinoides

Los endocannabinoides son sustancias derivadas de los lípidos de la membrana plasmática que regulan la neurotransmisión del SNC por medio de la activación de sus receptores CB1 y CB2.

Su descubrimiento, surgió a raíz del hecho de que los principios activos de la planta *cannabis sativa*, el  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol y cannabidiol se unían a receptores específicos en el SNC (Mechoulam *et al.*, 2013). Una vez que se descubrieron los receptores a cannabinoides CB1 y posteriormente CB2 (Devane *et al.*, 1988; Howlett *et al.*, 1986; Matsuda *et al.*, 1990; Munro *et al.*, 1993), se pensaba en la existencia de ligandos endógenos que activaran esos receptores. En efecto, en 1992 se extrajo Araquidoniletanolamida del cerebro porcino, un ácido araquidónico que fue nombrado anandamida (de la palabra sánscrita “*ananda*”, felicidad suprema) y cuando fue administrado en roedores mostraba en estos los efectos típicos de los cannabinoides: antinocicepción, inmovilidad, reducción de actividad espontánea y baja temperatura (Devane *et al.*, 1992). En 1995 Mechoulam *et al.* aislaron del intestino canino otro endocannabinóide denominado 2-Araquidonilglicerol (2-AG), el cual mostró los típicos efectos de la Anandamida y cannabinoides.

Posteriormente del líquido cefalorraquídeo de gatos privados de sueño MOR se aisló y caracterizó una molécula que tenía una estructura y efecto similar a la de los primeros endocannabinoides (disminución de la temperatura, hipolocomoción y reducción en la percepción del dolor), a la cual se le llamó *cis*-9, 10-octadecenoamida (oleamida) (Cravatt *et al.*, 1995).

El receptor CB1 se encontró principalmente en el SNC (Mechoulam & Parker, 2013). Sin embargo, se ha destacado el papel de los receptores CB1 en la periferia como el estómago, el tejido adiposo y en la lengua (DiPatrizio & Piomelli, 2012). Por otra parte el receptor CB2, originalmente se asumía que se encontraba en células del sistema inmune, pero recientemente hay evidencia de su expresión dentro del sistema nervioso central, principalmente en células microgliales (Xi *et al.*, 2011). Ambos receptores CB1 y CB2 se encuentran en la presinapsis (Ohno-Shosaku, Tanimura, Hashimoto, & Kano, 2012; Vaughan & Christie, 2005) y se ha observado que los receptores CB1 se encuentran particularmente en neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas (Wilson & Nicoll, 2001).

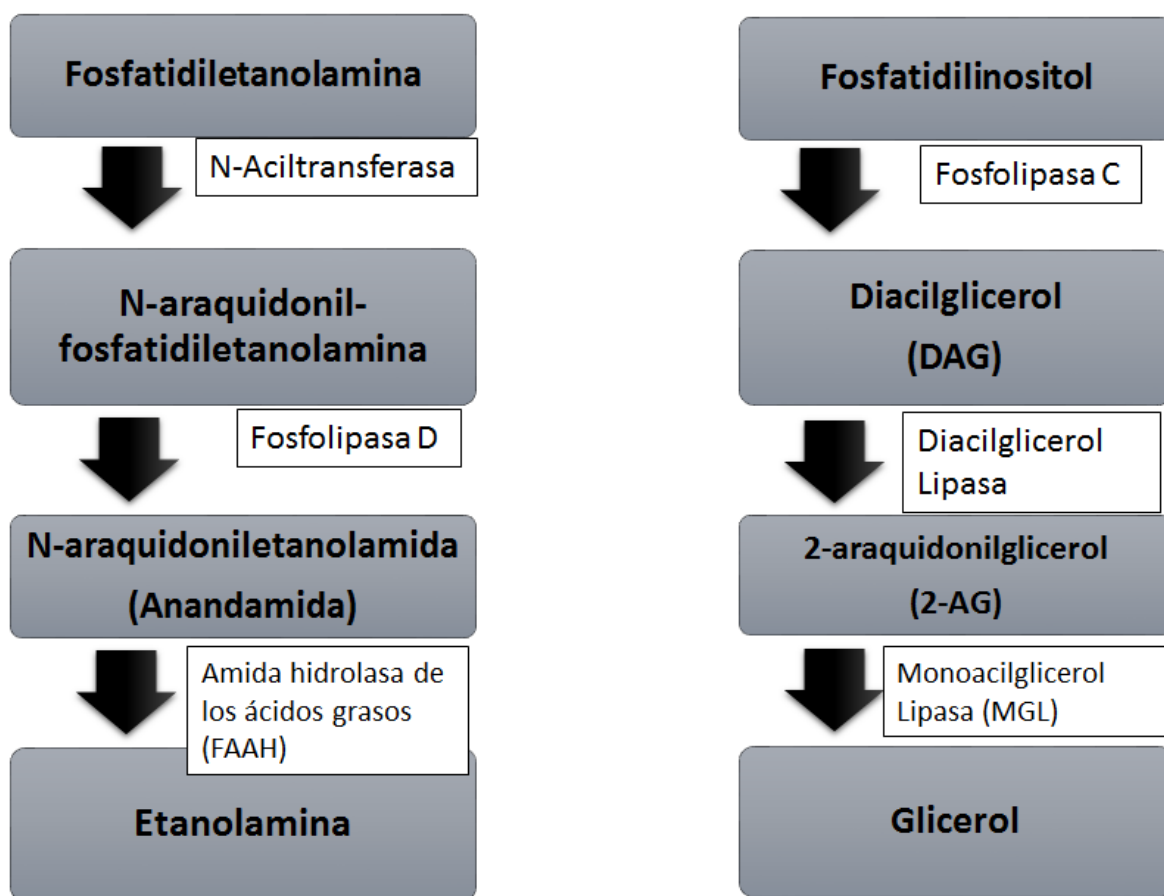
Los endocannabinoides son neuromoduladores que a diferencia de la mayoría de los principales neurotransmisores en el SNC (glutamato, GABA, serotonina, acetilcolina, dopamina y noradrenalina), no se almacenan en vesículas, sino que son sintetizados sólo cuando es necesario o en momentos específicos de excitación de las neuronas (Ohno-Shosaku *et al.*, 2005). Principalmente cuando se incrementan los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Mechoulam & Parker, 2013; Ohno-Shosaku *et al.*, 2012; Vaughan & Christie, 2005). También, a diferencia de la mayoría de los neurotransmisores, se ha reportado que los endocannabinoides se liberan de manera retrograda (Ohno-Shosaku, 2001).

La síntesis del 2-AG depende de grupos de enzimas que utilizan a los fosfolípidos de la membrana como sustrato, la PLC que genera DAG e  $\text{IP}_3$  a partir del  $\text{PIP}_2$  y la diacilglicerolipasa (DGL) que favorece la reacción (hidrólisis) para producir 2-AG a partir de DAG (ver figura 5) (Piomelli, 2003; Jung *et al.*, 2007).

Por otra parte, se sugiere (Okamoto, Wang, Morishita, & Ueda, 2007) que la formación de la anandamida (AEA) es sintetizada a partir de N-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NArPE). La NArPE es sintetizada con ayuda de una N-aciltransferasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y la enzima fosfolipasa D selectiva para N-acil-



fosfatidiletanolaminas (NAPE-PLD), cataliza la reacción (hidrólisis) para producir N-araquidoniletanolamida (ver figura 5).



**Figura 5.** Esquema donde se muestran los pasos de las vías metabólicas por las cuales se producen 2-araquidonilglicerol (2-AG) y N-araquidoniletanolamida (Anandamida), así como las enzimas que degradan estas moléculas.

Una vez dentro de la célula, la degradación de la AEA y del 2-AG son catalizadas por al menos dos enzimas distintas, la amida hidrolasa de los ácidos grasos (FAAH) que cataliza la reacción de hidrólisis de la AEA; y la monoacilglicerol lipasa (MGL) que hidroliza al 2-AG (Vaughan & Christie, 2005).

El sistema de endocannabinoides regula la neurotransmisión de células GABAérgicas y glutamatérgicas (Maejima *et al.*, 2001; Oho & Shosahu 2001). En la presinapsis de las terminales GABAérgicas y glutamatérgicas, la estimulación del receptor CB1 y CB2 desencadena la activación de la proteína  $G_{i/o}$  (Ohno-Shosaku *et al.*, 2012).

### **3.2 Regulación endocannabinérgica de la ingesta de alimento**

El sistema endocannabinérgico está localizado en sitios del SNC y SNP involucrados en la ingesta de alimento, que influyen en los circuitos que controlan los mecanismos fisiológicos del sistema homeostático (DiPatrizio & Piomelli, 2012). Por ejemplo, la activación de receptores CB1 en el tejido adiposo promueve la lipogénesis y almacenamiento de energía (Cota *et al.*, 2003). En el estómago, una dieta alta en grasas promueve la movilización de endocannabinoides en el intestino delgado de ratas, a través de señalamiento eferente vagal; en contraste el bloqueo de receptores CB1 en esta zona frena la ingesta de grasas (DiPatrizio *et al.*, 2011), sugiriendo que los endocannabinoides en el SNP llevan a cabo funciones para dirigir la ingesta de grasas.

En el SNC, el sistema endocannabinérgico regula la ingesta de alimento por medio de la disminución de señales de saciedad que llegan al hipotálamo y mejorando las señales que promueven el hambre. En el hipotálamo se ha encontrado expresión de receptores CB<sub>1</sub> en neuronas CART, neuronas orexinérgicas y MCHérgicas (Cota *et al.*, 2003).

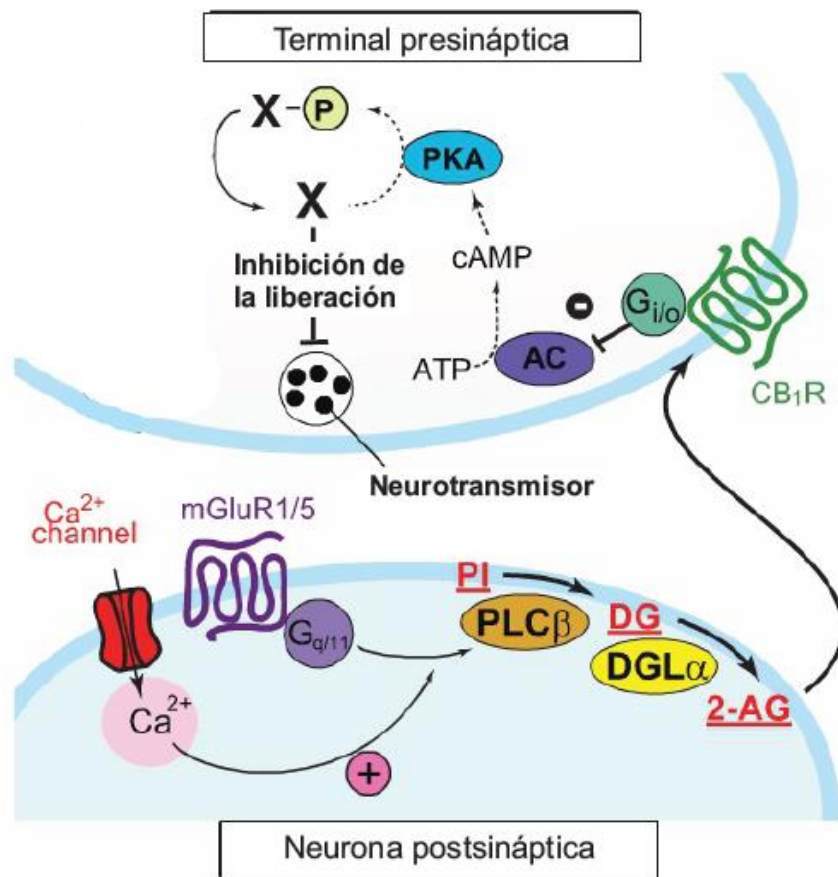
La administración periférica de oleamida y AEA, promueven el apetito desde la primera y tercera hora después de una inyección periférica, ejerciendo en el total de 3 horas un efecto de sobrealimentación (Martínez-González *et al.*, 2004). A nivel central, la administración de AEA en el HVM es capaz de promover la ingesta de alimento a través de la activación del receptor CB<sub>1</sub> y las microinfusiones de un antagonista a estos receptores, atenúa su efecto (Jamshidi & Taylor, 2001).

En otras estructuras como el *Shell* del NAc, la administración de 2-AG produce hiperfagia, además de que inhibidores de la recaptura y degradación de AEA promueven el mismo efecto (Kirkham *et al.*, 2002; Soria-Gómez *et al.*, 2007).

Juntos, estos resultados indican que los endocannabinoides centrales y los que son secretados en la periferia, influyen en la regulación del balance de energía y la ingesta de alimento.

### **3.3 Liberación de endocannabinoides por estimulación de los mGlu5R**

Algunos estudios han mostrado que el mecanismo retrogrado de los endocannabinoides puede inducirse por la activación postsináptica de mGluR, específicamente los que están acoplados a proteínas  $G_{q/11}$  como los mGluR I. Ya se mencionó que la activación de estos receptores produce DAG e incremento de  $Ca^{2+}$  y que una vez generada la DAG, la encima DGL la transforma en 2-AG. Hay evidencia que demuestra que la activación de los mGlu5R estimula la DGL, específicamente la isoforma alfa (DGL- $\alpha$ ), desencadenando la biosíntesis de 2-AG (Jung *et al.*, 2007). También, que la estimulación de los mGluR I puede inducir supresión de la inhibición inducida por despolarización (DSI) y supresión de la excitación inducida por despolarización (DSE), la cual es mediada por la liberación retrograda de endocannabinoides (Kreitzer & Malenka, 2005). Además, considerando que la liberación de 2-AG es dependiente de la DGL, en estudios *in vitro* se ha demostrado que la aplicación de tetrahidrolipstatina (THL), un inhibidor de la DGL  $\alpha$  y  $\beta$ , significativamente bloquea la DSI y DSE (Uchigashima, Narushima, & Fukaya, 2007), demostrando que la activación de los mGluR5 promueve la liberación de 2-AG de manera dependiente de la DGL. En consecuencia el 2-AG liberado desde la neurona postsináptica, suprime la liberación del neurotransmisor a través de la activación de receptores CB1 en la presinapsis (ver figura 6).



**Figura 6. Ilustración de la síntesis y liberación de 2-AG a partir de la activación de los mGluRs del grupo I.** La activación del receptor CB<sub>1</sub> produce la inhibición de la Adenilato ciclasa (AC) la cual queda incapacitada para producir monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) y activar la proteína cinasa A (PKA). En consecuencia no se promueve la liberación del neurotransmisor. Modificado de Ohno-Shosaku, Tanimura, Hashimotodani & Kano, 2012, página 126.

Sin embargo, poco se sabe sobre el efecto de la inhibición de la DGL a un nivel conductual. Gregg *et al.* (2012) investigaron los mecanismos moleculares que promueven la liberación de 2-AG en la sustancia gris periacueductal (SGPA) e identificar el resultado en la conducta de evitación ante estímulos dolorosos (antinocicepción). Demostró que el bloqueo de los mGluR I disminuye la antinocicepción inducida por estrés. Por el contrario, la activación de estos es capaz de prolongar significativamente el efecto antinociceptivo, además de aumentar los niveles de 2-AG pero no los de anandamida en la SGPA. También demostró que el

THL, disminuía los niveles de 2-AG en la SGPA, paralelo a la disminución del efecto antinociceptivo inducido por estrés.

Los hallazgos antes mencionados han proporcionado suficiente evidencia que indica que la activación de los mGlu5R es capaz de formar 2-AG a partir de la DGL, particularmente la DGL- $\alpha$ . Además, que en estudios *in vivo* se ha demostrado que la liberación de 2-AG vía mGlu5R-DGL es capaz de mediar un proceso fisiológico como la de reducir del dolor.

## **Planteamiento del problema**

El sistema glutamatérgico y endocannabinérgico están involucrados en la regulación de la ingesta de alimento y el balance energético (Bradbury *et al.*, 2005; Meshulam & Parker, 2013; Rada *et al.*, 1997). Se ha demostrado que la activación de los mGlu5R promueve la síntesis y liberación de 2-AG a nivel central (Gregg *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2007), sin embargo, no se ha demostrado que la interacción de ambos sistemas glutamatérgico y endocannabinérgico tenga un papel funcional en la regulación de la ingesta de alimento. Por lo cual, la problemática que deseamos resolver es determinar si el incremento en la ingesta de alimento producido por activación del sistema glutamatérgico mediada por mGlu5R en el hipotálamo lateral se debe a la consecuente liberación de endocannabinoides, comprobando así, la interacción de ambos sistemas para regular la ingesta de alimentos.

## **Pregunta de investigación**

¿Existe una interacción entre el sistema glutamatérgico y endocannabinérgico en el HL que esté involucrada en la regulación de la ingesta de alimento?

## **Hipótesis general**

La liberación de 2-AG por medio de la activación de mGlu5R es la vía por la cual ambos sistemas glutamatérgico y endocannabinérgico hipotalámicos, interactúan para regular la ingesta de alimento.

## **Hipótesis particulares**

1. El bloqueo de la síntesis del ligando endógeno y de receptores CB1 atenúa el efecto producido por la activación de los receptores mGlu5R.
2. La activación de los receptores CB1 con 2-AG potencia el efecto de la activación los mGlu5R en la ingesta de alimento.

## **Objetivo general**

Sustentar experimentalmente que la interacción de los sistemas glutamatérgico y endocannabinérgico hipotalámicos regulan la ingesta de alimento vía activación mGlu5R.

## **Objetivos particulares**

1. Demostrar que el efecto de la activación de los mGlu5R en la ingesta de alimento se bloquea, cuando se interrumpe la síntesis del ligando endógeno así como cuando se bloquean los receptores CB1.
2. Demostrar si existe un efecto de potenciación cuando se administra el ligando endógeno de los receptores CB1 cuando al mismo tiempo se activan los mGlu5R.

## Capítulo 4. Método

### 4.1 Sujetos experimentales

Ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 250-300g a su llegada al laboratorio, n=38. Las ratas fueron obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los sujetos fueron alojados en cajas individuales bajo un ciclo invertido luz- oscuridad 12 h, iniciando a las 20:00 h la fase de luz y a una temperatura constante ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ). Los sujetos fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio con acceso a alimento y agua *ad libitum*.

#### Cirugía estereotáxica

Siete días antes del experimento las ratas fueron implantadas bilateralmente con un par de cánulas guía de acero inoxidable (23-G x 1.3 cm) en el HL (P = 2.6, L = 1.8, V = 7.0; con referencia a Bregma) bajo anestesia (Ketamina 66 mg/kg + xilacina 0.26 mg/kg + acepromacina 1.3 mg/kg). Las coordenadas fueron seleccionadas con referencia en el atlas de Paxinos y Watson (2007). Las cánulas guía se fijaron en el cráneo con cemento dental y 2 tornillos de acero inoxidable. Para mantener la permeabilidad de las cánulas, estas se cerraron con estiletes (30-G x 1.4 cm) los cuales sobresalían 1mm de la punta de las cánulas guía.

Cuando los experimentos finalizaron, se extrajeron los cerebros de las ratas y se prepararon para el análisis histológico con la tinción de violeta de cresilo, para verificar la correcta posición de las cánulas (ver figura 7). En caso de que no estuvieran en la posición correcta, los sujetos quedaban descartados de cualquier análisis.

## 4.2 Aparatos y materiales

Se utilizó un instrumento estereotáxico estándar para rata (*Stoelting CO.*, E.U.) para la colocación de cánulas. Para la administración de los fármacos se utilizaron inyectores de 30-G x 1.4 cm, unidos a un conducto de plástico (*Tygon*) de 0.01 pulgadas de diámetro y ~50 cm de largo, además de dos bombas de infusión (*Kd Scientific*, E.U.) y un par de micro-jeringas de 10  $\mu$ l (*Hamilton*, E.U.).

Para seccionar los cerebros de las ratas se utilizó un criostato que se mantenía a -25 ° C (*Leica CM1510-3*, *Wetzlar*, Alemania).

## 4.3 Fármacos

El agonista selectivo a receptores mGlu5 (RS)-2-Cloro-5-hidroxifenilglicina sal sódica (CHPG) (*Tocris Bioscience*) fue disuelto en solución salina al 0.9% con pH= 7.4 y se administró a una concentración de 25 nmol (5.6  $\mu$ g). El Inhibidor no selectivo de la DGL- $\alpha$  y DGL- $\beta$  tetrahidrolipstatina (THL) (*Sigma-Aldrich*) se diluyó en DMSO al 100% y se administró a una concentración de 1.2  $\mu$ g. El 2-araquidonilglicerol (2-AG) (*Tocris Bioscience*), se disolvió en DMSO al 100% y se administró a una concentración de 0.1  $\mu$ g. El agonista inverso a receptores CB1 AM251 (*Sigma-Aldrich*) fue disuelto en DMSO al 100% y administrado a una concentración de 1.4  $\mu$ g. Además se hicieron las siguientes combinaciones de fármacos, manteniendo las concentraciones ya mencionadas de cada uno y disueltas en DMSO al 100%: THL+CHPG, AM251+CHPG y 2-AG+CHPG. Todos los fármacos incluyendo las combinaciones, fueron administrados en un volumen de 0.5  $\mu$ l a una velocidad de 0.1  $\mu$ l por minuto. La concentración de CHPG fue utilizada basándonos en los resultados de Charles et al. (2014), así mismo las concentraciones de THL y AM251 fueron utilizadas de acuerdo a los resultados de Pérez-Morales *et al.* (2012, 2013), los cuales muestran que tanto AM251 como THL no tienen algún efecto significativo *per se* en la conducta de ingesta de alimento. Por último la concentración de 2-AG fue utilizada basándonos en trabajos previos de nuestro laboratorio.



#### **4.4 Procedimiento**

Después de una semana de recuperación, un grupo de 10 ratas fueron administradas en el HL, de acuerdo a un cuadrado latino con los siguientes fármacos: vehículo (salina n= 5, o DMSO 100% n= 5), CHPG (25nmol/0.5 µl), THL (1.2 µg/0.5 µl) y THL+CHPG (1.2 µg + 25nmol/0.5 µl) (ver tabla 2). El intervalo entre cada administración fue mínimo de dos días, con el objetivo de evitar cualquier efecto remanente de los tratamientos. Los sujetos fueron pesados antes de la administración de los fármacos y la administración comenzaba en el inicio de la fase de oscuridad (8:00 h).

Pasado de un minuto después de haber administrado se colocaban los estiletes y la rata se regresaba a su caja con alimento previamente pesado. Se pesó el alimento sobrante de cada sujeto cada hora por 4 horas y después de 24 h horas de haber hecho la administración. El valor en gramos del peso del alimento sobrante se restaba al valor inicial en cada hora.

N° Rata	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
1	Vehículo 1	CHPG	THL+CHPG	THL
2	CHPG	THL	Vehículo 1	THL+CHPG
3	THL	THL+CHPG	CHPG	Vehículo 1
4	THL+CHPG	Vehículo 1	THL	CHPG
5	Vehículo 1	CHPG	THL+CHPG	THL
6	CHPG	THL	Vehículo 2	THL+CHPG
7	THL	THL+CHPG	CHPG	Vehículo 2
8	THL+CHPG	Vehículo 2	THL	CHPG
9	Vehículo 2	CHPG	THL+CHPG	THL
10	CHPG	THL	Vehículo 2	THL+CHPG

**Nota:** Vehículo 1: Salina 0.9 % pH 7.4. Vehículo 2: DMSO 100%.

(RS)-2-Cloro-5-hidroxifenilglicina (CHPG), agonista a mGlu5R (5.6 µg).

Tetrahidrolipstatina (THL), inhibidor inespecífico de la Diacilglicerol lipasa (1.2 µg).

**TABLA 2.** Esta tabla describe el tipo de fármaco que recibió cada sujeto de forma contrabalanceada por día. El tiempo entre administraciones en el mismo sujeto fue mínimo de 2 días. Todos los Fármacos se administraron en un volumen de 0.5 µl.

Posteriormente se administró a 4 grupos de ratas (n= 7 cada uno) con ya sea AM251 (1.4 µg/ 0.5µl), AM251+CHPG (1.4 µg + 25nmol/0.5 µl), 2-AG (0.1 µg/0.5 µl) o 2-AG+CHPG (0.1 µg + 25 nmol/0.5 µl). Estos grupos también se contrabalancearon con respecto al tipo de fármaco administrado, por ejemplo: el primer grupo de 7 sujetos a 4 se les administró AM251 y a 3 AM251+CHPG; luego en otro grupo de ratas diferentes y en un día diferente, 4 sujetos fueron administrados con AM251+CHPG y 3 sujetos con 2-AG; en otro grupo 4 sujetos fueron administrados con 2-AG y 3 sujetos con 2-AG+CHPG; en otro grupo 3 sujetos fueron administrados con AM251 y 4 con 2-AG+CHPG y así hasta tener 7 sujetos experimentales por cada fármaco (ver tabla 3).

De igual forma, los sujetos fueron pesados antes de la administración de los fármacos y la administración comenzaba en el inicio de la fase de oscuridad (8:00 h).

Pasado un minuto después de haber administrado se colocaban los estiletes y la rata se regresaba a su caja con alimento previamente pesado. De la misma forma 1, 2, 3, 4 y 24 horas después de la administración, se pesaba el alimento sobrante de cada sujeto.

<b>Fármaco</b>	<b>Acción</b>	<b>N</b>	<b>Concentración</b>
CHPG+AM251		N = 7	5.6 µg + 1.4 µg
CHPG+2-AG		N = 7	5.6 µg + 0.1 µg
AM251	Agonista inverso a CB1R	N = 7	1.4 µg
2-AG	Agonista a CB1R	N = 7	0.1 µg

**TABLA 3.** Lista con los diferentes fármacos que no fueron administrados como cuadrado latino con la respectiva concentración y número de sujetos utilizados. Todos los Fármacos se administraron de forma contrabalanceada en un volumen de 0.5 µl a una velocidad de 0.1 µl/minuto.

#### 4.5 Análisis Histológicos

Después de finalizados los experimentos las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital y perfundidas transcárdialmente utilizando 200 ml de buffer de fosfatos (0.2 M) seguido por 200 ml de una solución al 4% de paraformaldehído (PFH). Los cerebros fueron removidos y colocados individualmente en frascos con PFH, seguido por un proceso de crioprotección, en la cual se sumergían los cerebros en una solución al 18% de sacarosa por 24 h y subsecuentemente en una solución al 30 % de sacarosa por otras 24 h. Pasado este proceso, se dejaron congelar los cerebros en platinas dentro del criostato a - 25 °C por 3 h. Una vez congelados los cerebros, se hicieron cortes coronales de 50

µm de espesor y se obtuvieron en portaobjetos solo de las zonas donde se apreciaba la lesión de las cánulas guía.

Una vez obtenidos los cortes en portaobjetos, se dejaron secar por 24 h. Después de este periodo, los cortes se sumergían en alcohol al 96% por 2 h, enseguida se sumergían en la tinción de violeta de cresilo 1%, por 15 minutos. Posteriormente, los tejidos eran deshidratados por una serie de lavados en alcohol (50%-100%), luego sumergidas en xileno, para finalmente cubrirlos con cubreobjetos. Los cortes obtenidos fueron analizados con ayuda del atlas de Paxinos y Watson (2007).

#### **4.6 Análisis de datos**

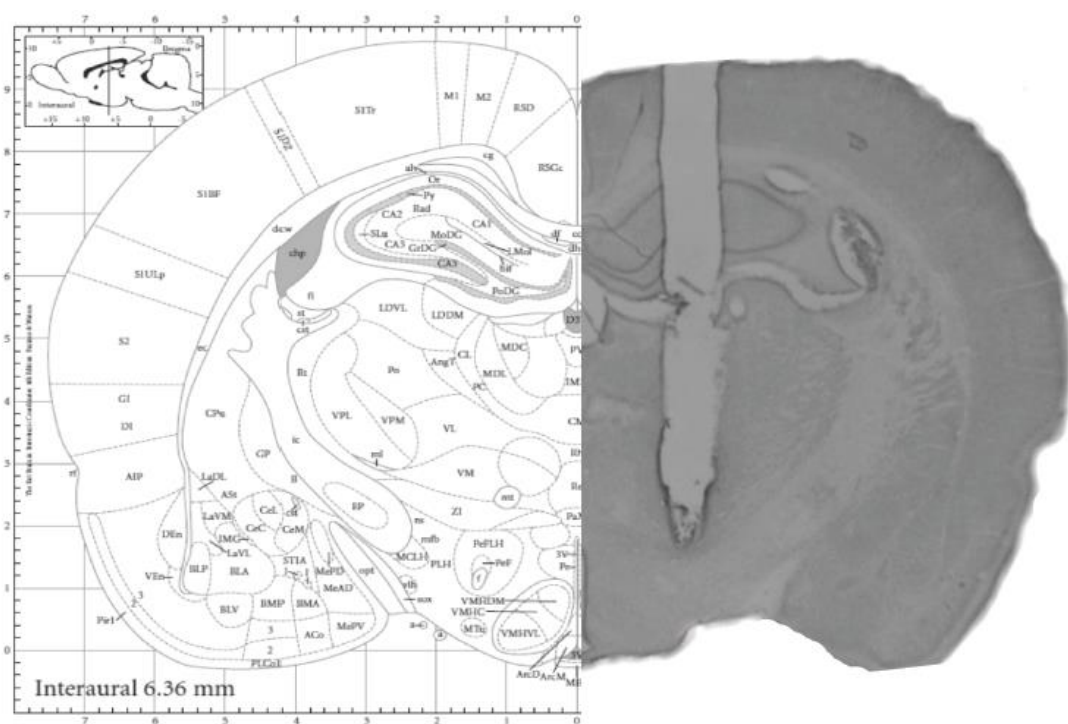
Por cada rata se obtuvo un índice de consumo de alimento que refleja una proporción de lo que come respecto a su peso corporal: gramos (g) de alimento consumido / peso corporal (g) \* 100, por cada hora. Los datos fueron expresados como media ± error estándar en cada hora y en el total de 4 y 24 h. Para el análisis de datos se utilizó un Análisis de varianza (ANOVA) de una vía para medidas repetidas. Teniendo como factor entre sujetos el tipo de fármaco e intra-sujeto el tiempo: 1, 2, 3 y 4 h.

Para el total de las 4 y 24 h de consumo de alimento se utilizó un ANOVA de una vía, teniendo como factor el tipo de fármaco.

Se utilizó un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Cuando se encontraban diferencias significativas se llevaba a cabo una prueba *post hoc* de Tukey corregida para muestras desiguales. Los datos fueron analizados con el programa de análisis estadístico STATISTICA.

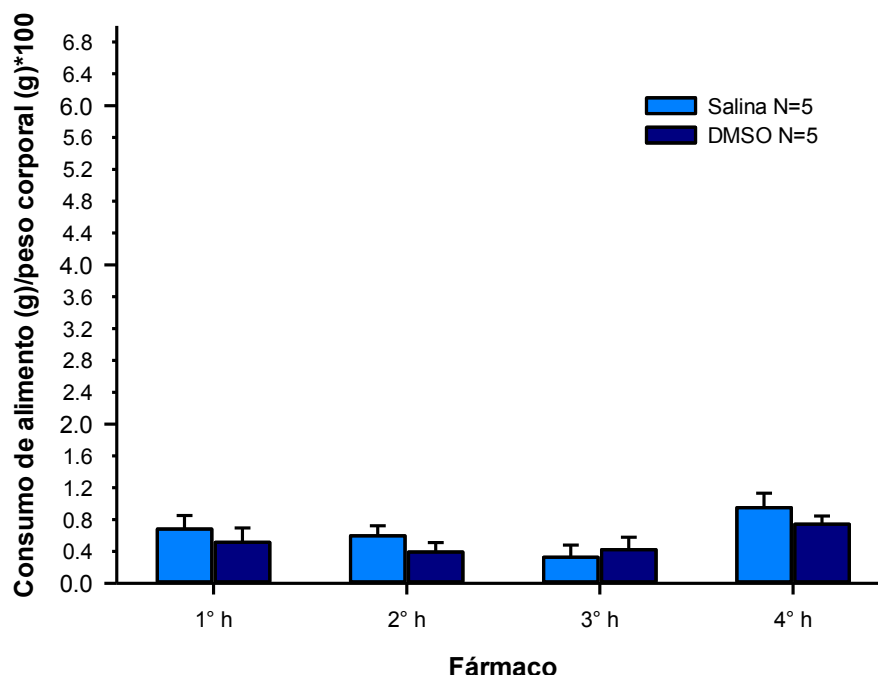
## Capítulo 5. Resultados

La figura 7 muestra un corte coronal representativo de las ratas que fueron implantadas correctamente. La mitad izquierda de la imagen es una parte de una imagen del mapa de Paxinos y Watson (2007) que corresponde a las coordenadas que utilizamos, interaural 6.36 mm equivale a 2.64 mm posterior a bregma. La mitad derecha muestra la parte real del corte de un cerebro de rata, en el cual se nota la lesión de la cánula guía y su punta localizada en el HL.



**Figura 7.** Corte coronal representativo de las ratas que fueron administradas bilateralmente.

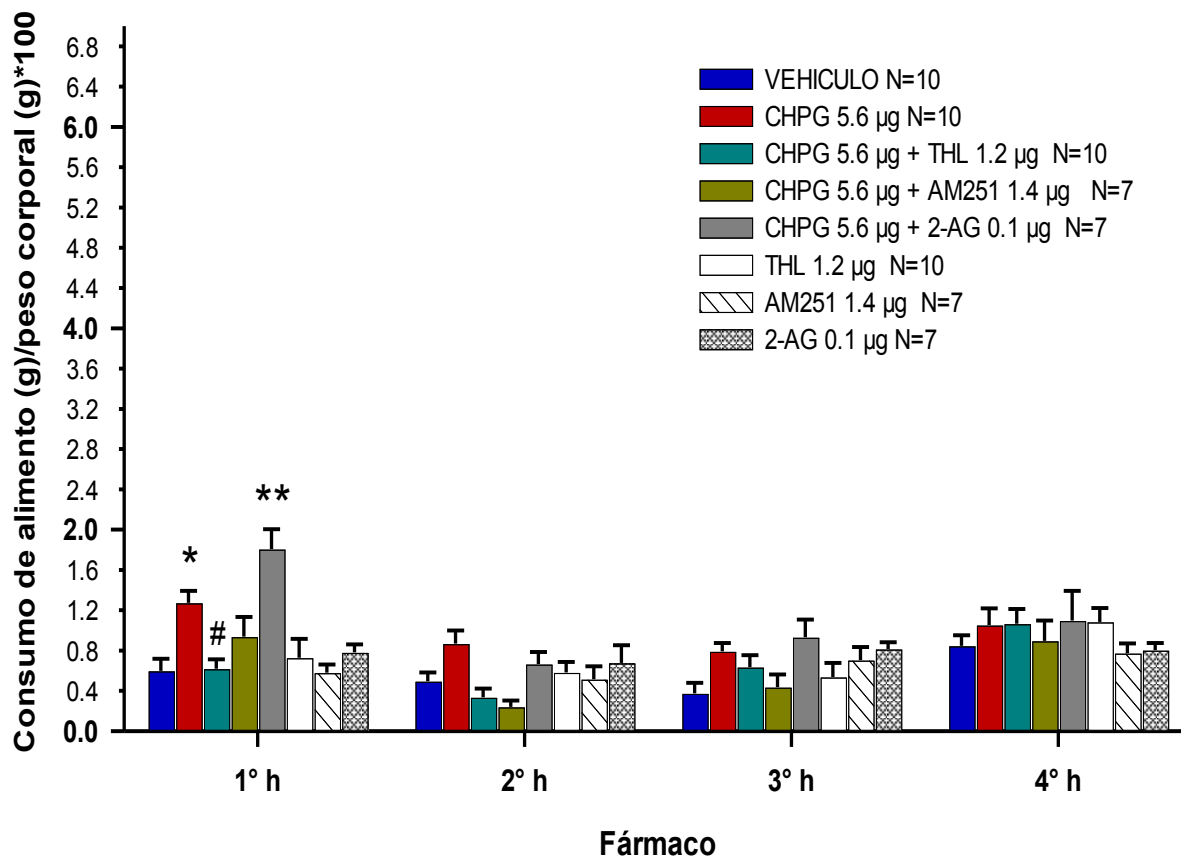
Para descartar que la administración de los distintos vehículos tiene efectos distintos en la ingesta de alimento, se compararon los grupos de ratas administradas con salina y DMSO con un ANOVA de una vía para medidas repetidas, la cual nos mostró que no hay ningún efecto significativo [ $F_{(3,24)} = 0.63$ ,  $p = 0.59$ ] entre estos vehículos a lo largo de las cuatro horas (ver figura 8).



**Figura 8. Consumo de alimento durante las primeras 4 horas después de la administración de salina y DMSO.** La administración de ya sea salina o DMSO no muestra diferencias significativas del consumo de alimento durante las 4 horas. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar.

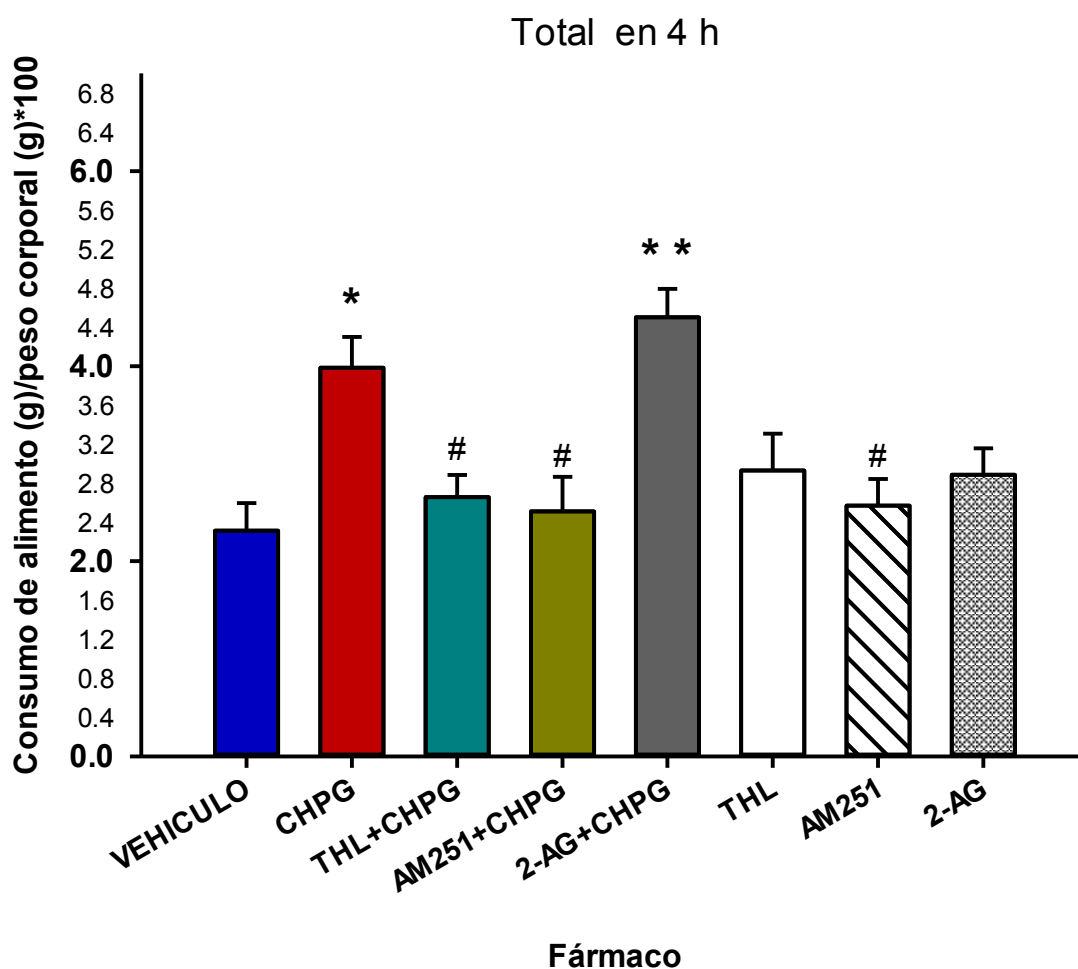
Debido a que no hubo cambios significativos entre los vehículos utilizados, los dos grupos de vehículo, DMSO y salina, se tomaron como un solo grupo (grupo Control). El índice de consumo de alimento difirió según el tipo de fármaco [ $F_{(7,60)} = 2.128$ ,  $p < 0.001$ ]. La prueba *post hoc* reveló que los sujetos administrados con CHPG y 2-AG+CHPG consumieron más alimento ( $p = 0.029$  y  $p < 0.001$  respectivamente) comparado al grupo control (ver figura 9). Sin embargo, el grupo administrado con 2-AG+CHPG no fue significativamente diferente del grupo CHPG. La administración de THL+CHPG y AM251+CHPG no fue diferente del grupo control. Aunque el grupo THL+CHPG disminuyó ( $p = 0.043$ ) su consumo de alimento en comparación al grupo CHPG.

El consumo de alimento después de la segunda, tercera y cuarta hora de administración no fue diferente entre los tipos de fármacos.



**Figura 9. Consumo de alimento durante las primeras 4 horas después de la administración.** La administración de CHPG aumenta el consumo de alimento en la primera hora después de haberlo administrado y un inhibidor de la DGL así como el bloqueo de receptores CB1 inhibe este efecto. Vehículo, CHPG, THL+CHPG y THL n=10; AM251+CHPG, 2-AG+CHPG, AM251 y 2-AG n=7. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  en comparación al grupo control, #  $p < 0.05$  en comparación al grupo CHPG.

El ANOVA de una vía del consumo total de alimento en 4 horas mostró diferencias significativas [ $F_{(7,60)} = 6.06$ ,  $p < 0.001$ ]. El consumo de alimento en la primera hora es mayor en el grupo CHPG ( $p = 0.003$ ), al igual que 2-AG+CHPG ( $p < 0.001$ ). En cambio, cuando el CHPG se co-administra con THL o AM251, estos no muestran diferencias significativas en comparación al grupo control. Por otra parte, el consumo de alimento del grupo CHPG no fue diferente al del grupo administrado con 2-AG+CHPG (ver figura 10).



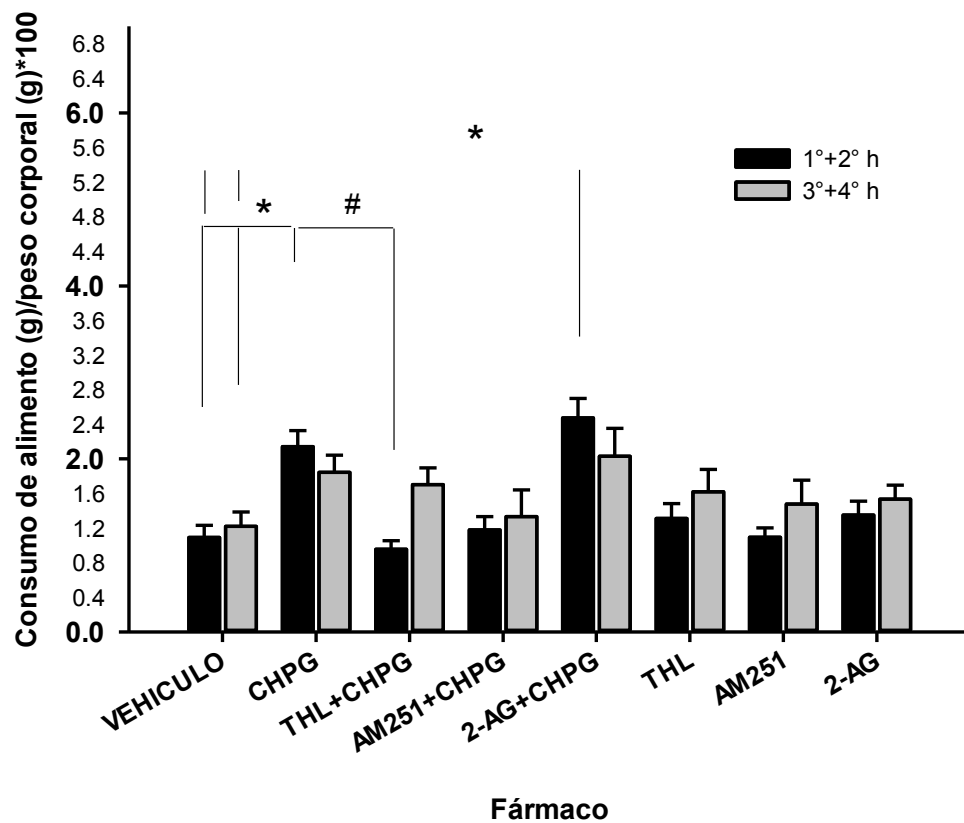
**Figura 10. Consumo de alimento del total de 4 horas después de la administración.** La administración de CHPG y 2-AG+CHPG aumentan el consumo de alimento en el total de 4 horas, el inhibidor de la DGL y bloqueo de receptores CB1 inhibe este efecto. Vehículo, CHPG, THL+CHPG y THL  $n=10$ ; AM251+CHPG, 2-AG+CHPG, AM251 y 2-AG  $n=7$ . Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  en comparación al grupo control, #  $p < 0.05$  en comparación al grupo CHPG.



El consumo de alimento después de 24 h de la administración, no fue diferente entre los grupos [ $F_{(7, 60)} = 1.81$ ,  $p = 0.101$ ].

Finalmente la figura 11 muestra el consumo de alimento de la suma de las dos primeras horas y la suma de las dos últimas en todos los grupos. Un ANOVA de una vía para medidas repetidas nos mostró que hay diferencias significativas entre el tiempo y tipo de fármaco [ $F_{(7, 60)} = 2.20$ ,  $p = 0.046$ ]. Comparar el consumo acumulativo de alimento entre bloques de dos horas nos permite ver de manera más amplia durante el tiempo en qué periodo es donde CHPG produce su efecto.

El consumo acumulativo de alimento en las dos primeras horas en el grupo CHPG es mayor comparado al grupo control ( $p = 0.010$ ), pero en las dos últimas horas ya no es diferente comparado al grupo control. De igual forma, el aumento en el consumo de alimento producido por CHPG es aminorado por THL solo en las dos primeras horas ( $p < 0.001$ ). Indicando que la estimulación de receptores mGlu5 tiene un importante efecto en las 2 primeras horas y después de este tiempo disminuye gradualmente.



**Figura 11. Comparación del consumo de alimento entre la suma de las dos primeras horas (barras negras) y las dos últimas (barras grises).** La administración de CHPG y 2-AG+CHPG durante las dos primeras horas es significativamente mayor que el grupo control. Así mismo la administración de THL+CHPG es menor que el grupo de CHPG en las dos primeras horas. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$  en comparación al grupo control; #  $p < 0.05$  en comparación al grupo CHPG.

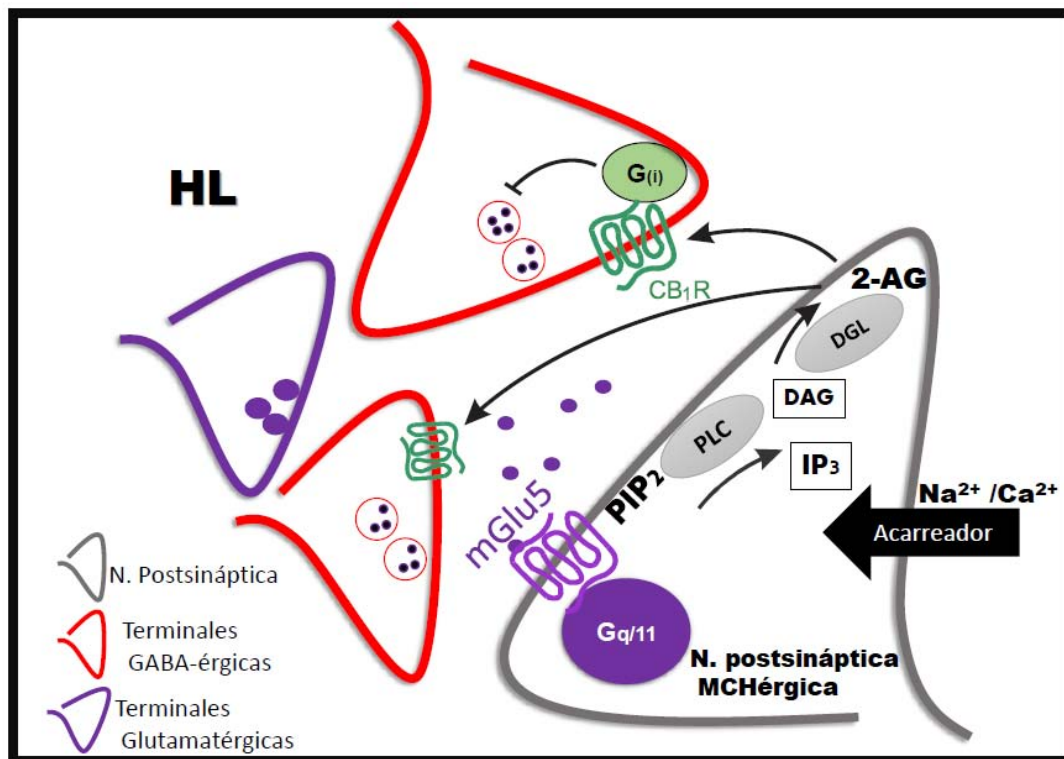
## Capítulo 6. Discusión y Conclusión

La pregunta de investigación de esta tesis fue ¿existe una interacción entre el sistema glutamatérgico y endocannabinérgico en el HL que esté involucrada en la regulación de la ingesta de alimento? La estimulación de los mGlu5R en el HL incrementa la ingesta de alimento en ratas saciadas y los resultados nos muestran que este efecto es bloqueado por la coadministración de un inhibidor inespecífico de la DGL (THL) o un antagonista de los receptores CB1 (AM251), lo cual muestra que sí hay una interacción entre el sistema glutamatérgico y endocannabinérgico que están regulando la ingesta de alimento. Además, comprobamos la hipótesis principal: la activación de los mGlu5R en el hipotálamo lateral incrementa la ingesta de alimento y la inhibición de la vía para producir endocannabinoides bloquea este efecto.

Así mismo, para tener mayor certeza de que el incremento en la ingesta de alimento era debido a la liberación de endocannabinoides producida por la estimulación de los mGlu5R, bloqueamos los receptores CB1. Trabajos previos (Soria-Gómez *et al.*, 2007) han demostrado que el bloqueo de receptores CB1 con AM251 pueden bloquear el efecto en el incremento del apetito producido por AEA en el Shell del NAc. En este sentido nuestros resultados mostraron que el efecto en la ingesta de alimento producido por CHPG también se aminora debido al bloqueo de receptores CB1 con AM251, lo cual apoya nuestra hipótesis de que la producción y consecuente liberación de 2-AG hacia las terminales presinápticas es el mecanismo por el cual los mGlu5R promueven sus efectos en la ingesta de alimento.

Es posible que la activación de los mGlu5R y la consecuente liberación de 2-AG en el HL hayan excitado neuronas MCHérgicas. Como se mencionó en el primer capítulo (ver apartado 1.2.2), la administración de MCH promueve la ingesta de alimento (Broberger *et al.*, 1998; Guesdon *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 1996). Los estudios de Huang y van den Pol (2007) demuestran que la actividad de las neuronas MCHérgicas es regulada por la activación de receptores mGlu del grupo I y también por la activación de receptores CB1 (Huang *et al.*, 2007). Estos hallazgos apuntan a que la estimulación de los mGlu5R promueve la liberación de 2-AG y esto suscita

la excitación de las neuronas MCHérgicas, ya que los receptores CB1 se encuentran en la membrana presináptica de interneuronas GABAérgicas, que rodean a las neuronas MCHérgicas (Huang et al., 2007). Por lo tanto, la inhibición de las interneuronas GABAérgicas por medio de la activación de receptores CB1 facilita la excitación de las neuronas MCHérgicas (ver figura 12).



**Figura 12. Representación gráfica de la simulación de la estimulación de mGlu5R en el HL.** La estimulación de los mGlu5R activa al efector enzimático PLC el cual transforma el PIP2 en DAG e IP3. La DGL toma de sustrato al DAG para transformarlo en 2-AG. El cual cruza la sinapsis y se une a sus receptores CB1 en la presinapsis. En consecuencia se inhibe la liberación del neurotransmisor de la terminal presináptica. Además la excitación de las neuronas MCHérgicas también es facilitada por la activación del acarreador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> dependiente de la estimulación de receptores mGlu5.

De igual manera, la activación de los mGlu5R excita a las neuronas orexinérgicas, ya que se ha demostrado en experimentos *in vitro* que la activación de estos receptores despolariza el potencial de membrana e incrementan la frecuencia de disparo en neuronas orexinérgicas (Huang & van den Pol, 2007). Sin embargo, hay evidencia que demuestra que los cannabinoides y endocannabinoides reducen la frecuencia de disparo en neuronas orexinérgicas, probablemente por inhibición presináptica glutamatérgica (Huang et al., 2007). Esto nos parece contradictorio, ya que la excitación de mGlu5R produce endocannabinoides que inhiben la liberación de las neuronas presinápticas. En el caso de las neuronas orexinérgicas, la liberación de endocannabinoides inhibiría la excitación glutamatérgica, disminuyendo la excitación de las neuronas orexinérgicas.

Lo anterior nos hace sugerir que el efecto de la activación de los mGlu5R excita neuronas MCHérgicas y orexinérgicas, pero la excitación de neuronas orexinérgicas no es por medio de la liberación de endocannabinoides.

Las neuronas MCHérgicas además de regular el balance energético promueven los efectos reforzantes del alimento e incluso de drogas de abuso (MacNeil, 2013). Como se mencionó en el apartado 1.2.2 del primer capítulo, las neuronas MCHérgicas proyectan al NAc, una región importante en promover la conducta motivada dirigida hacia un objetivo. Si la estimulación de los mGlu5R activa a las neuronas MCHérgicas del HL y estas proyectan al NAc, entonces el efecto de la estimulación de mGlu5R podría modificar la motivación (cantidad de trabajo que se dispone a realizar para obtener un reforzador) de los roedores para obtener un reforzador. Sin embargo, nosotros probamos en experimentos piloto, utilizando un programa de razón progresiva (entrenamiento conductual para evaluar la motivación en roedores que incrementa el número de respuestas necesarias para recibir un reforzador; ver Apéndice C), que la estimulación de los mGlu5R con una concentración de 25 nmol de CHPG no produce efecto alguno en la motivación de los roedores.

Estos resultados sugieren que la estimulación de mGlu5R promueve la ingesta de alimento más por un proceso homeostático que por un proceso hedónico, lo cual

apoya la idea de que los mGlu5R están involucrados con el balance energético (Bradbury *et al.*, 2005) y no la búsqueda del reforzador.

Por otra parte, la estimulación de receptores CB1 con la administración de 2-AG no potenció los efectos de la estimulación de los mGlu5R en el consumo de alimento, ya que el consumo de alimento del grupo administrado con 2-AG+CHPG no cambió de manera significativa en comparación al grupo administrado con CHPG. Una posible explicación, es que exista un mecanismo por el cual se promueva la degradación de 2-AG para compensar el efecto en el aumento de los niveles de este en la sinapsis. Kirkham *et al.* (2002) demostró que los niveles de 2-AG en el hipotálamo incrementa durante el ayuno pero disminuye cuando los roedores se alimentan. Aunque no es claro cómo es que disminuyen los niveles de 2-AG, es de esperar que los mecanismos de degradación se lleven a cabo para compensar la regulación a la alta de este endocannabinoide en el hipotálamo. En este sentido, también una señal de saciedad podría estar induciendo de alguna manera la disminución de 2-AG. De acuerdo con esta idea se ha observado que 2-AG es el endocannabinoide más sensible a cambios inducidos por leptina, ya que se han observado niveles altos de 2-AG hipotalámicos en ratones *ob/ob* (Di Marzo *et al.*, 2001), sugiriendo que la leptina puede ser un indicador para disminuir la producción de 2-AG.

Los sujetos utilizados en esta tesis no tenían ninguna manipulación genética y tenían acceso *ad libitum* al alimento, por lo que los niveles de leptina en sangre pudieron afectar los efectos de 2-AG.

Sin duda son necesarios experimentos adicionales para responder con mayor claridad a la pregunta de si el efecto de la estimulación de los mGlu5R se puede potenciar con la coadministración de 2-AG. Por el momento, los resultados nos muestran que la concentración de 0.1  $\mu\text{g}$  no es suficiente para potenciar el efecto de la estimulación de los mGlu5R.

Finalmente, es importante mencionar que el THL (también conocido como orlistat) a nivel periférico inhibe la lipasa pancreática, enzima responsable de la descomposición y por tanto, posterior absorción de los lípidos contenidos en la dieta

y que se usa para el tratamiento de la obesidad (Foxcroft & Milne, 2000; Foxcroft 2005; Hutton & Fergusson, 2004; Vetter, Faulconbridge, Webb & Wadden, 2010). A pesar de que hay un extenso campo de investigación sobre este fármaco en la regulación de la ingesta de alimento, no había una descripción sobre sus mecanismos de acción en el SNC involucrados en la regulación de la ingesta de alimento. Nuestros resultados muestran que el THL bloquea el efecto de la activación de los mGlu5, de incrementar la ingesta de alimento. Estos hallazgos explican uno de los mecanismos de acción que el fármaco tiene en áreas del SNC involucradas en la regulación de la ingesta de alimento, pero más importante, nos ayuda a comprender los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la ingestión de alimento.

## **Conclusión**

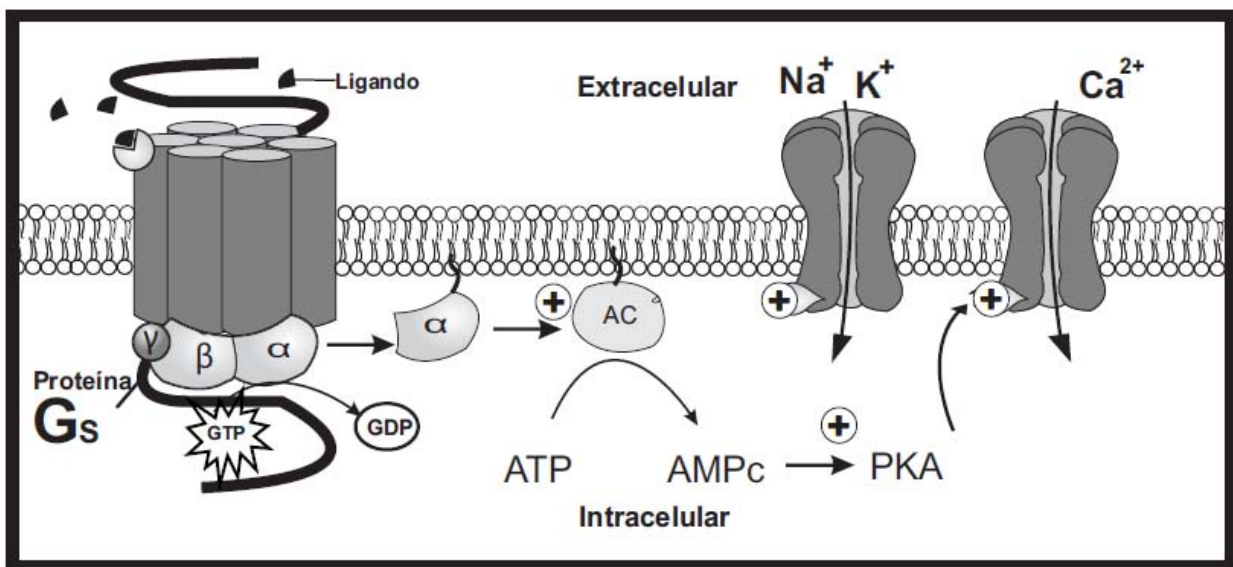
En conclusión, el presente estudio demuestra que la activación de receptores mGlu5R incrementa la ingesta de alimento y este efecto es bloqueado por la inhibición de la DGL y por el antagonismo de receptores CB1, lo cual indica que su efecto es mediado por endocannabinoides, particularmente 2-AG. De esta manera se demuestra que en el HL, el sistema endocannabinérgico y glutamatérgico interactúan para regular la ingesta de alimento.

## Apéndice A

Los receptores metabotrópicos son lugares de unión para neurotransmisores o neuromoduladores (ligandos) acoplados a proteínas transmembranales de 7 dominios, las cuales son llamadas proteínas G debido a que necesitan de guanósín trifosfato (GTP) (Bear, 2007). La proteína G está compuesta por 3 subunidades: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gama ( $\gamma$ ). La fijación de un ligando a la proteína G induce un cambio conformacional que induce que se disocie la subunidad  $\beta\gamma$  de la subunidad  $\alpha$ . La subunidad  $\alpha$ , a su vez se asocia con una adenilato ciclasa (AC) o una fosfolipasa C (PLC).

Hay al menos 3 tipos de proteínas G:  $G_s$ ,  $G_{i/o}$  o  $G_{q/11}$ . Cuando se estimula una proteína  $G_s$ , la AC toma como sustrato trifosfato de adenosina (ATP) y lo transforma en monofosfato de adenosín cíclico (AMPc), el cual se une a las subunidades reguladoras de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA). Cuando hay AMPc, este se une a las subunidades reguladoras de la PKA y quedan libres sus subunidades catalíticas, las cuales pueden fosforilar canales iónicos y producir su cierre o apertura. En términos generales hay una elevación en las corrientes de  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ , que en consecuencia inducen la despolarización de la neurona y liberación de neurotransmisor (ver figura A) (Goodman & Gilman, 2007).

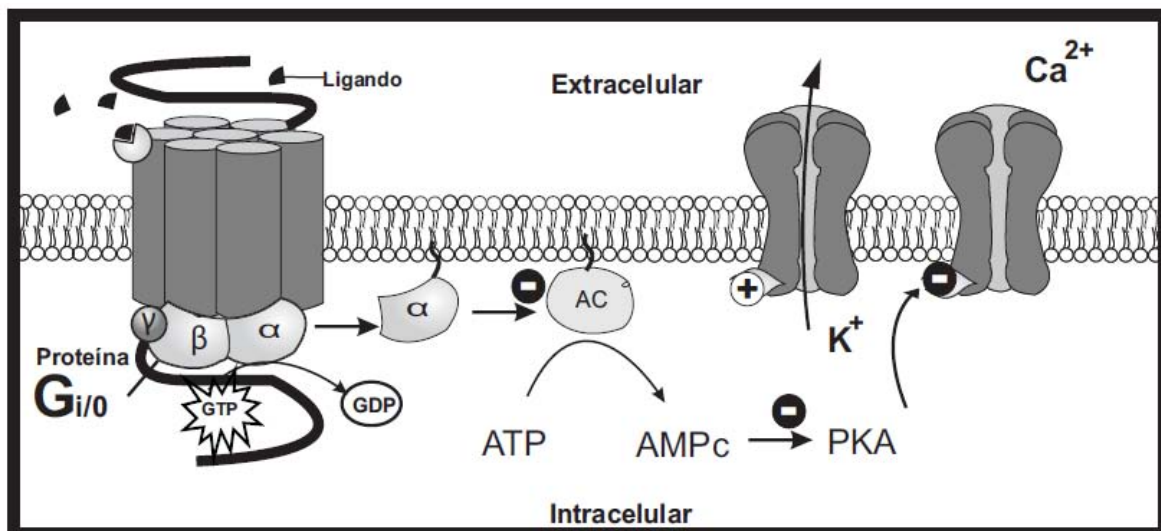
**Figura A. Activación de una proteína G(s).**





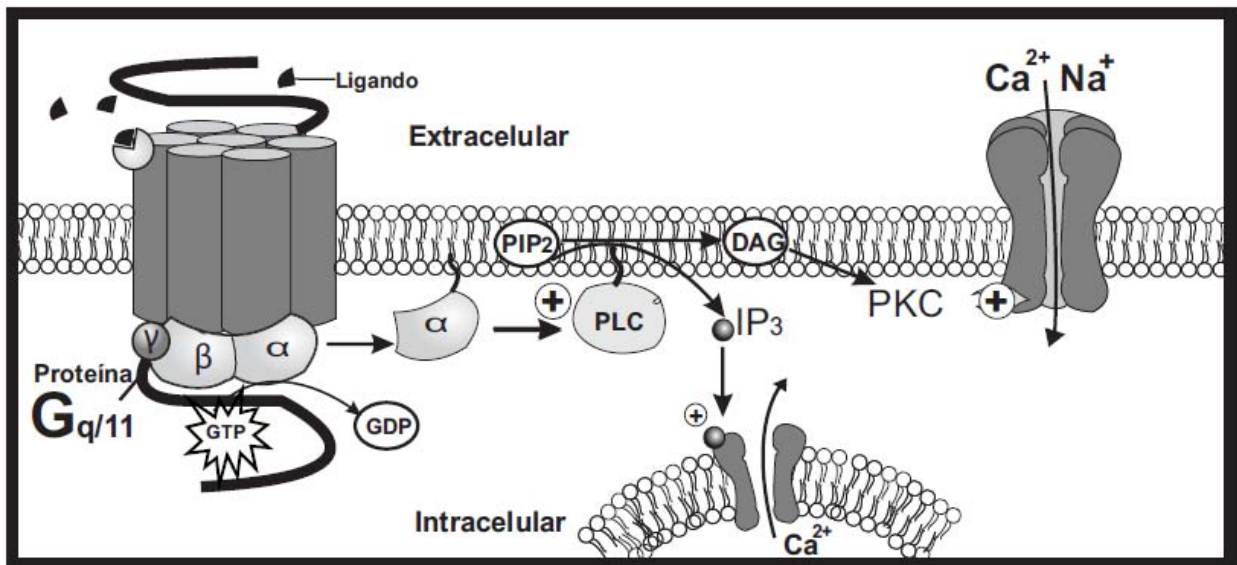
La proteína  $G_{i/o}$  a diferencia de la  $G_s$ , inhibe la actividad de la AC teniendo como consecuencia la disminución de AMPc y PKA. Esto puede inhibir las corrientes de  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ , mientras que aumentan las corrientes de  $K^+$ . Lo cual tiene como consecuencia, la hiperpolarización e inhibición de la liberación del neurotransmisor (ver figura B) (Goodman & Gilman, 2007).

**Figura B. Activación de una proteína G ( $i/o$ ).**



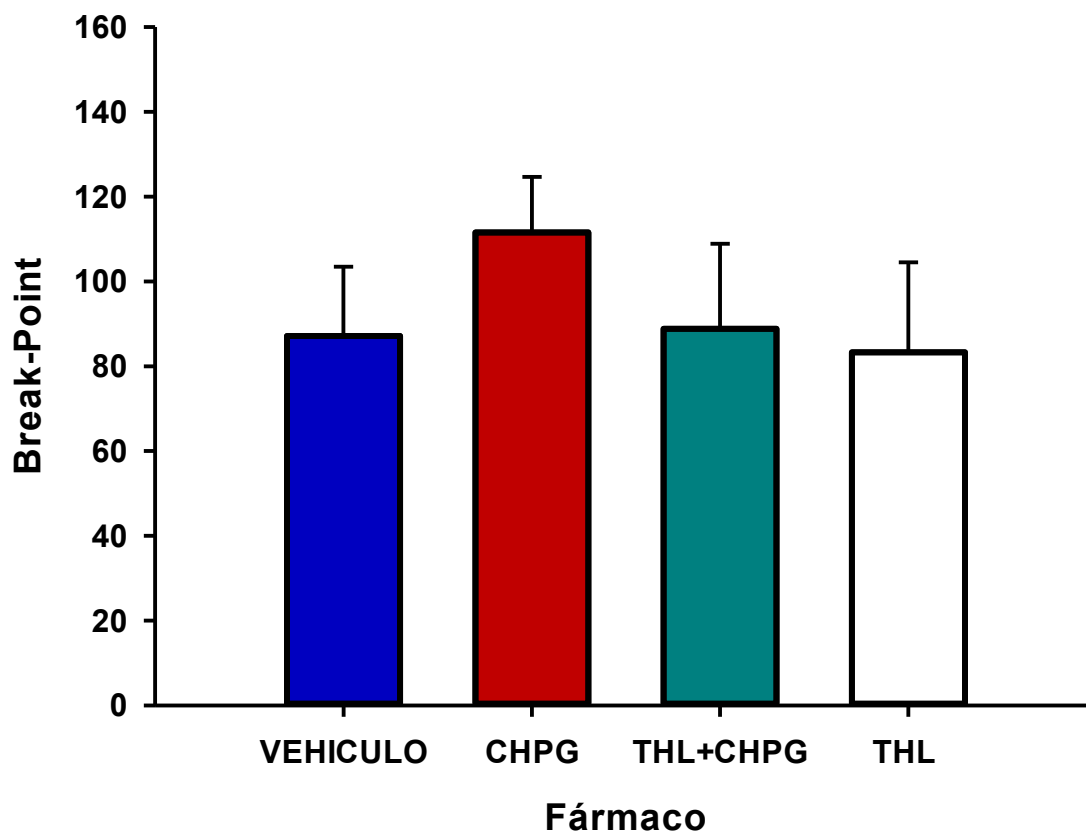
La proteína  $G_{q/11}$  activa al efector enzimático PLC, el cual toma como sustrato al fosfatidilinositol 4, 5- bifosfato ( $PIP_2$ ) y lo transforma en inositol trifosfato ( $IP_3$ ). El  $IP_3$  se une a sus receptores en el retículo endoplasmático, liberando el  $Ca^{2+}$  acumulado en este compartimento (Bear, 2007). La activación de una PKC dependiente de PLC activa, entre otras cosas, canales de  $Ca^{2+}$  (ver figura C) (Goodman & Gilman, 2007).

**Figura C. Activación de una proteína G (q/11).**



## Apéndice C

### Desempeño en un programa de razón progresiva



Un grupo de ratas (n=7) adicional, se utilizó para llevar a cabo un entrenamiento con un programa de razón progresiva durante 50 sesiones. Después de este periodo, se administraron los fármacos CHPG (25 nmol/0.5  $\mu$ l), THL (1.2  $\mu$ g/ 0.5  $\mu$ l) y THL+CHPG en el HL por medio de un cuadrado latino, tomando en cuenta un intervalo entre cada administración mínima de 3 días. Tanto la administración de CHPG como los demás fármacos, no producen ningún efecto significativo.

## Referencias

- Appleyard, S. M., Marks, D., Kobayashi, K., Okano, H., Low, M. J., & Andresen, M. C. (2007). Visceral afferents directly activate catecholamine neurons in the solitary tract nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(48), 13292–302. doi:10.1523/JNEUROSCI.3502-07.2007
- Aston-Jones, G., Smith, R., Moorman, D., & Richardson, K. (2009). Role of lateral hypothalamic orexin neurons in reward processing and addiction. *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1, 112–21. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.060
- Atasoy, D., Betley, J. N., Su, H. H., & Sternson, S. M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*, 488(7410), 172–7. doi:10.1038/nature11270
- Balcita-Pedicino, J. J. & Sesack, S. R. (2007). Orexin Axons in the Rat Ventral Tegmental Area Synapse Infrequently Onto Dopamine and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 503. 668-684
- 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 GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibition of the nucleus accumbens shell, but not by exposure to a novel environment. *The European journal of neuroscience*, 19(2), 376–86. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03093.x
- Barrett, k. E., Barman, S. M., Boitano, S. & Brooks, H. (2010. Fisiología médica (23° ed). México: McGrawHill.
- Bear, M. F., Connors, B. W. & Paradiso, M. A. (2007). Neuroscience: Exploring the Brain (3° ed). U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins.
- Bellocchio, L., Lafanetre, P., Cannich A., Cota, D., Puente, N., Grandes, P., Chaouloff, F., Piazza, P. V. & Mariscano, G. (2010). Bimodal control of

- stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nature Neuroscience*, 13, 281-283.
- Bernard, J. F., Alden, M. & Besson, J. M. (1993). The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in rat. *J. Comp. Neurol Biobehav. Rev.*, 20. 189-287.
- Berthoud, H.-R. (2012). The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 71(4), 478–87. doi:10.1017/s0029665112000602
- Berthoud, H.-R., & Münzberg, H. (2011). The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to optogenetics. *Physiology & behavior*, 104(1), 29–39. doi:10.1016/j.physbeh.2011.04.051
- Besheer, J., Fisher, K. R., Jaramillo, A. A., Frisbee, S. & Cannady, R. (2014). Stress Hormone Exposure Reduces mGluR5 Expression in the Nucleus Accumbens: Functional Implications for Interoceptive Sensitivity to Alcohol. *Neuropsychopharmacology*, 39. 2376-2386.
- Bi, S., Scott, K. A., Kopin, A. S., & Moran, T. H. (2004). Differential roles for cholecystokinin a receptors in energy balance in rats and mice. *Endocrinology*, 145(8), 3873–80. doi:10.1210/en.2004-0284
- Bielajew, C. & Shizgal, P. (1986). Evidence Implicating Descending Fibers in Self-Stimulation of the Medial Forebrain Bundle. *The Journal of Neuroscience*, 6(4). 919-929. 0270-6474/86/040919-11\$02.00/O
- Bielajew, C., Stenger, J., & Schindler, D. (1994). Factors that contribute to the reduced weight gain following chronic ventromedial hypothalamic stimulation. *Behavioural Brain Research*, 62(2), 143-148. doi:10.1016/0166-4328(94)90021-3
- Bird, M., Lohmann, P., West, B., Brown, R., Kirchhoff, J., Raymond, C., & Lawrence, A. (2014). The mGlu5 receptor regulates extinction of cocaine-driven behaviours. *Drug and Alcohol Dependence*, 137. doi:10.1016/j.drugalcdep.2014.01.017

- Bradbury, M., Campbell, U., Giracello, D., Chapman, D., King, C., Tehrani, L., Cosford, N., Anderson, J., Varney, & Strack, A. (2004). Metabotropic Glutamate Receptor mGlu5 Is a Mediator of Appetite and Energy Balance in Rats and Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313(1), 395–402. doi:10.1124/jpet.104.076406
- Broberger, C., De Lecea, L., Sutcliffe, J. G., & Hökfelt, T. (1999). Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *The Journal of comparative neurology*, 402(4), 460–74.
- Cabanac, M. (1988). Maximization of pleasure, the answer to a conflict of motivations. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 309(10), 397–402.
- Carlson N. R. (2013). *Physiology of Behavior* (11<sup>th</sup> ed). U.S.A.: Pearson Education, Inc.
- Charles, J. R., Duva, M. A., Ramirez, G. J., Lara, R. L., Yang, C. R., & Stanley, B. G. (2014). Activation of lateral hypothalamic mGlu1 and mGlu5 receptors elicits feeding in rats. *Neuropharmacology*, 79, 59–65. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.10.033
- Chemelli, R. M., Willie, J. T., Sinton, C. M., Elmquist, J. K., Scammell, T., Lee, C., Richardson, A., Williams, C., Xiong, Y., Kisanuki, Y., Fitch, E., Nakazato, M., Hammer, E., Saper, B & Yanagisawa, M. (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 98(4), 437–51. doi:10.1016/S0092-8674(00)81973-X
- Chung, S., Woodward, H., Nagasaki, H., Li, C., Belluzzi, J. D., Bonci, A. & Civelli, O. (2009). The melanin-concentrating hormone system modulates cocaine reward. *PNAS*, 106(16). 6772-6777.
- Conn, P. J. & Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37. 205-237.
- Cota, D., Mariscano, G., Tschoop, M., Grubelt, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thone-Reineke, C., Ortmann, S., Tomassoni, F.,

- Cervino, C., Nisoli, E., Linthorst, C. E., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G. K. & Pagotto, U. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(3), 423-431. doi:10.1172/JCI200317725.
- Cravatt, B. F., Prospero-Garcia, O., Siuzdak, G., Gilula, N. B., Henriksen, S. J., Boger, D. L., & Lerner, R. A. (1995). Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5216), 1506–9.
- DeLecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P. E., Danielson, P. E., Fukuhara, C., Battenberg, E. L., Gautvik, V. T., Bartlett II, F. S., Frankel, W. N., Van den Pol, A. N., Bloom, F. E., Gautvik, K. M. & Stclife, J. G. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Neurobiology*, 95, 322-327.
- Della-Zuana, O., Presse, F., Ortola, C., Duhault, J., Nahon, J. L. & Levens, N. (2002). Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Int. J. Obes.* 26, 1289-1295.
- DePetrocellis, L., Bisogno, T. & DiMarzo, V. (2004). Endocannabinoids. En DiMarzo, V. *Cannabinoids. Neuroscience Intelligence Unit*. New York, U.S.A: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, M. R., Melvin, L. S. & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.*, 34. 605-13.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Peterwee, R. G. & Stevenson, L. A. (1992). Isolation and structure of a brain constituent binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258. 1946-49.
- DiPatrizio, N., Astarita, G., Schwartz, G., Li, X. & Piomelli D. (2011). Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *PNAS*, 108(2), 12904-12908.
- DiPatrizio, N., & Piomelli, D. (2012). The thrifty lipids: endocannabinoids and the neural control of energy conservation. *Trends in neurosciences*, 35(7), 403–11. doi:10.1016/j.tins.2012.04.006

- D'Souza, M. & Markou, A. (2011). Metabotropic glutamate receptor 5 antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl) pyridine (MPEP) microinfusions into the nucleus accumbens shell or ventral tegmental area attenuate the reinforcing effects of nicotine in rats. *Neuropharmacology*, 61. 1399-1405.
- Elias, C. F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R. S., Couceyro, P. R., Kuhar, M. J., Saper, C. B. & Elmquist, J. K. (1999). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, 21(6), 1375–85. doi:10.1016/S0896-6273(00)80656-X
- Elias, C. F., Sita, L. V., Zambon, B. K., Oliveira, E. R., Vasconcelos, L. A., & Bittencourt, J. C. (2008). Melanin-concentrating hormone projections to areas involved in somatomotor responses. *Journal of chemical neuroanatomy*, 35(2), 188–201. doi:10.1016/j.jchemneu.2007.10.002
- Fan, W., Boston, B. A., Kesterson, R. A., Hruby, V. J., & Cone, R. D. (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, 385(6612), 165–8. doi:10.1038/385165a0
- Finlayson, G., King, N., & Blundell, J. (2007). Liking vs. wanting food: Importance for human appetite control and weight regulation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31(7). doi:10.1016/j.neubiorev.2007.03.004
- Flores, Á., Maldonado, R., & Berrendero, F. (2013). Cannabinoid-hypocretin cross-talk in the central nervous system: what we know so far. *Frontiers in Neuroscience*, 7. doi:10.3389/fnins.2013.00256
- Foxcroft, D. R. & Milne, R. (2000). Orlistat for the treatment of obesity: rapid review and cost-effectiveness model. *Obesity reviews*, 1(2), 121-126. DOI: 10.1046/j.1467-789x.2000.00011.x
- Foxcroft, D. R. (2005). Orlistat for the treatment of obesity: cost utility model. *Obesity reviews*, 6(4), 323-328. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2005.00211.x
- Gao, Y., Vasilyev, D. V., Goncalves, M. B., Howell, F. V., Hobbs, C., Reinsenberg, M., Shen, R., Zhang, M. Y., Strassle, B. W., Lu, P., Mark, L., Piesla, M. J., Deng, K., Kouranova, E. V., Ring, R. H., Whiteside, G. T., Bates, B., Walsh, F. S., Williams, G., Pangalos, M. N., Samad, T. A. & Doherty, P. (2010). *The Journal of Neuroscience*, 30(6), 2017-2024.



- Gass, J., & Olive, M. (2009). Role of protein kinase C epsilon (PKC $\epsilon$ ) in the reduction of ethanol reinforcement due to mGluR5 antagonism in the nucleus accumbens shell. *Psychopharmacology*, 204(4), 587–97. doi:10.1007/s00213-009-1490-y
- Gehlert, D. R. (1999). Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity. *Neuropeptides*, 33(5). 329-338.
- Girault, E. M., Fliers, Y. C. & Kalsbeek, A. (2012). Orexins, feeding, and energy balance. *Progress in Brain Research*, 198, 47-64.
- Georgescu, D., Sears, R., Hommel, J., Barrot, M., Bolaños, C., Marsh, D., Bednarek, A., Bibb, A., Maratos-Flier, E., Nestler, E. & DiLeone, R. (2005). The Hypothalamic Neuropeptide Melanin-Concentrating Hormone Acts in the Nucleus Accumbens to Modulate Feeding Behavior and Forced-Swim Performance. *The Journal of Neuroscience*, 25(11), 2933–2940. doi:10.1523/JNEUROSCI.1714-04.2005
- Golembiowska, K., Konieczny, J., Wolfarth, S. & Ossowska, K. (2003). Neuroprotective action of MPEP, a selective mGluR5 antagonist, in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity is associated with a decrease in dopamine outflow and inhibition of hyperthermia in rats. *Neuropharmacology*, 45. 484-492.
- Goodman & Gilman (2007). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* (11° ed). México: The McGraw Hill.
- González, J. (2004). *Obesidad* (1° ed). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Gregg, L., Jung, K.-M., Spradley, J., Nyilas, R., Suplita, R., Zimmer, A., Watanabe, M., Mackie, K., Katona, I., Piomelli, D. & Hohmann, A. (2012). Activation of Type 5 Metabotropic Glutamate Receptors and Diacylglycerol Lipase- $\alpha$  Initiates 2-Arachidonoylglycerol Formation and Endocannabinoid-Mediated Analgesia. *The Journal of Neuroscience*, 32(28), 9457–9468. doi:10.1523/JNEUROSCI.0013-12.2012
- Guesdon, B., Paradis, E., Samson, P. & Richard, D. (2008). Effects of intracerebroventricular and intra-accumbens melanin-concentrating hormone

- agonism of food intake and energy expenditure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 296. 469-475.
- Hahn, T. M., Breininger, J. F., Baskin, D. G., & Schwartz, M. W. (1998). Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature neuroscience*, 1(4), 271–2. doi:10.1038/1082
- Hajnal, A., Smith, G. P., & Norgren, R. (2004). Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 286(1), R31–7. doi:10.1152/ajpregu.00282.2003
- Halford, J. C. G., Wanninayake, S. C. D. & Blundell, J. E. (1998). Behavioral satiety sequence (BSS) for diagnosis of drug action on food intake. *Pharmacology Biochemistry behavior*, 61. 159-168.
- Henny, P., & Jones, B. E. (2006). Innervation of orexin/hypocretin neurons by GABAergic, glutamatergic or cholinergic basal forebrain terminals evidenced by immunostaining for presynaptic vesicular transporter and postsynaptic scaffolding proteins. *The Journal of comparative neurology*, 499(4), 645–61. doi:10.1002/cne.21131
- Hetherington, A., & Ranson, S. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record*, 78(2), 149–172. doi:10.1002/ar.1090780203
- Howlett, A. C., Qualy, J. M. & Khachatrian, L. L. (1986). Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drug. *Mol. Pharmacol*, 29. 307-13.
- Huang, H., Acuna-Goycolea, C., Li, Y., Cheng, H., Obrietan, K., & Pol, A. (2007). Cannabinoids Excite Hypothalamic Melanin-Concentrating Hormone But Inhibit Hypocretin/Orexin Neurons: Implications for Cannabinoid Actions on Food Intake and Cognitive Arousal. *The Journal of Neuroscience*, 27(18), 4870–4881. doi:10.1523/JNEUROSCI.0732-07.2007
- Huang, H., & van den Pol, A. N. (2007). Rapid direct excitation and long-lasting enhancement of NMDA response by group I metabotropic glutamate receptor activation of hypothalamic melanin-concentrating hormone neurons. *The*

- Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(43), 11560–72. doi:10.1523/JNEUROSCI.2147-07.2007
- Hull, C. L. (1943). *Principles of Behavior: An Introduction to Behavior Theory*. New York, U.S.A.: Appletion-Century-Crofts, Inc.
- Hutton, B. & Fergusson, D. (2004). Changes in body weight and serum lipid profile in obese patients treated with orlistat in addition to a hypocaloric diet: a systematic review of randomized clinical trials<sup>1,2</sup>. *American society for Clinical Nutrition*, 80, 1461-1468.
- Illius, A. w., Tolcamp, B. J. & Yearsley, J. (2002). The evolution of the control of food intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61, 465-472. DOI:10.1079/PNS2002179
- Jamshidi, N. & Taylor, D. A. (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *British Journal of Pharmacology*, 134(6), 1151-1154.
- Jung, K. M., Astarita, G., Zhu, C., Wallace, M., Mackie, K. & Piomelli, D. (2007). A key Role for Diacylglycerol Lipase- $\alpha$  in Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Endocannabinoid Mobilization. *Molecular Pharmacology*, 72(3), 612-621.
- Kelley, A., & Berridge, K. (2002). The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(9), 3306–3311. doi:20026361
- Kenny, P., Paterson, N., Boutrel, B., Semenova, S., Harrison, A., Gasparini, F., Koob, G., Skoubis, D. & Markou, A. (2003). Metabotropic Glutamate 5 Receptor Antagonist MPEP Decreased Nicotine and Cocaine Self-Administration but Not Nicotine and Cocaine-Induced Facilitation of Brain Reward Function in Rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1003(1), 415–418. doi:10.1196/annals.1300.040
- 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(4), 550–7. doi:10.1038/sj.bjp.0704767

- Koob, G., & Moal, M. (2008). Addiction and the Brain Antireward System. *Psychology*, 59(1), 29–53. doi:10.1146/annurev.psych.59.103006.093548
- Krause, M., German, P. W., Taha, S. A. & Howard, L. F. (2010). A pause in Nucleus Accumbens Neuron Firing Is Required to Initiate and Maintain Feeding. *The Journal of Neuroscience*. 30(13). 4746-4756.
- Kreitzer, AC, & Malenka, RC. (2005). Dopamine modulation of state-dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum. *The Journal of neuroscience*. doi:10.1523/JNEUROSCI.2959-05.2005
- Li, Y., Gao, X. B., Sakurai, T. & van den Pol, A. N. (2002). Hypocretin/orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron--a potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. *Neuron*, 36. 1169-1181.
- Liang, N.-C. C., Hajnal, A., & Norgren, R. (2006). Sham feeding corn oil increases accumbens dopamine in the rat. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 291(5), R1236–9. doi:10.1152/ajpregu.00226.2006
- Lin, L., Faraco, J., Li, R., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X., Qiu, X., de Jong, P. J., Nishino, S. Mignot, E. (1999). The Sleep Disorder Canine Narcolepsy Is Caused by a Mutation in the hypocretin (*Orexin*) Receptor 2 Gene. *Cell*, 98, 365-376.
- Ljunberg T., Apicella P. & Schultz W. (1992). Responses of Monkey Dopamine Neurons During Learning of Behavioral Reactions. *Journal of Neurophysiology*. 67(1): 145-162.
- Llano, I., Leresche, N. & Marty, A. (1991). Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron*, 6, 565-74.
- Lutz, T. (2012). Effects of amylin on eating and adiposity, 231–250. doi:10.1007/978-3-642-24716-3\_10
- MacNeil, D. (2013). The Role of Melanin-Concentrating Hormone and Its Receptors in Energy Homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, 4. doi:10.3389/fendo.2013.00049

- Maldonado-Irizarri, C. S. & Kelly, A. E. (1994). Differential behavioral effects following microinjection of an NMDA antagonist into nucleus accumbens subregions. *Psychopharmacology*, 116. 64-72.
- Mao, L. & Wang, J. Q. (2001). Selective activation of group I metabotropic glutamate receptors upregulates preprodynorphin, substance P, and preproenkephalin mRNA expression in rat dorsal striatum. *Synapse*, 39. 82-94.
- Martínez-González, D., Bonilla-Jaime, H., Morales-Otal, A., Henriksen, S. J., Velázquez-Moctezuma, J. & Prospéro-García, O. (2004). Oleamide and anandamide effects of food intake and sexual behavior of rats. *Neuroscience Letters*, 364, 1-6.
- Martínez-González, D., Navarro, L. & Prospéro-García O. (2001). El hipotálamo: ombligo del cuerpo. *Ciencia y desarrollo*, 27(161), 4-15.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. & Bonner (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346 561-64.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminiski, N. E. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol*, 50. 83-90.
- Mechoulam, R., & Parker, L. A. (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annual review of psychology*, 64, 21–47. doi:10.1146/annurev-psych-113011-143739
- Morris, D., & Rui, L. (2009). Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 297(6), E1247–E1259. doi:10.1152/ajpendo.00274.2009
- Méndez-Díaz, M., Rueda-Orozco, P. E., Ruiz-Contreras, A. E., & Prospéro-García, O. (2012). The endocannabinoid system modulates the valence of the emotion associated to food ingestion. *Addiction biology*, 17(4), 725–35. doi:10.1111/j.1369-1600.2010.00271.x
- Munro, S., Thomas, K. L. & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365. 61-65.

- Narita, M., Nagumo, Y., Hashimoto, S., Narita, M., Khotib, J., Miyatake, M., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Nakamachi, T., Shioda, S. & Suzuki, T. (2006). Direct involvement of Orexinergic Systems in the Activation of the Mesolimbic Dopamine Pathway and Related Behaviors Induced by Morphine. *The Journal of Neuroscience*, 26(2). 398-405.
- Niu, J.-G., Yokota, S., Tsumori, T., Oka, T., & Yasui, Y. (2012). Projections from the anterior basomedial and anterior cortical amygdaloid nuclei to melanin-concentrating hormone-containing neurons in the lateral hypothalamus of the rat. *Brain research*, 1479, 31–43. doi:10.1016/j.brainres.2012.08.011
- Novin, D., Vander Weele, D. A. & Rezek, M. (1973). Hepatic-portal 2-deoxy-D-glucose infusion causes eating: Evidence for peripheral glucoreceptors. *Science*, 181. 858-860.
- Ohno-Shosaku, T., Maejima, T. & Kano, M. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*, 29, 729-38.
- Ohno-Shosaku, T., Tanimura, A., Hashimoto, Y., & Kano, M. (2012). Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 18(2), 119–32. doi:10.1177/1073858410397377
- Okamoto, Y., Wang, J., Morishita, J., & Ueda, N. (2007). Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chemistry & biodiversity*, 4(8), 1842–57. doi:10.1002/cbdv.200790155
- Olive, M. F. (2010). Cognitive effects of Group I metabotropic glutamate receptor ligands in the context of drug addiction. *Eur. J. Pharmacol*, 639(1-3). 47-58.
- Ollman, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y. K., Kerns J. A., Chen, Y., Gantz, I. & Barsh, G. S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*, 278(5335). 135-8.
- Pan, H.-L., Wu, Z.-Z., Zhou, H.-Y., Chen, S.-R., Zhang, H.-M., & Li, D.-P. (2008). Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 117(1), 141-161. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.09.003

- Parise, E. M., Lilly, N., Kay, K., Dossat, A. M., Seth, R., Overton, J. M., & Williams, D. L. (2011). Evidence for the role of hindbrain orexin-1 receptors in the control of meal size. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 301(6), R1692–9. doi:10.1152/ajpregu.00044.2011
- Pérez-Morales M, Alvarado-Capuleño I, López-Colomé AM, Méndez-Díaz M, Ruiz-Contreras AE, Prospéro-García O (2012). Activation of PAR1 in the lateral hypothalamus of rats enhances food intake and REMS through CB1R. *Neuroreport* **23**: 814–8.
- Pérez-Morales M, La Herrán-Arita AK De, Méndez-Díaz M, Ruiz-Contreras AE, Drucker-Colín R, Prospéro-García O (2013). 2-AG into the lateral hypothalamus increases REM sleep and cFos expression in melanin concentrating hormone neurons in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **108**:1-7.
- Petrovich, G. D. (2011). Forebrain circuits and control of feeding by learned cues. *Neurobiol. Learn. Mem*, 95. 152-158.
- Petrovic, G. D., Risold, P. Y. & Swanson, L. W. (1996). Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: a PHL study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 374. 387-420.
- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., & Kilduff, T. S. (1999). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(23), 9996–10015.
- Prospéro-García O., Méndez-Díaz M., Capuleño A. L., Pérez-Morales M., López J. J. & Ruiz-Contreras A. E. (2013). Inteligencia para la alimentación, alimentación para la inteligencia. *Salud Mental*, 36(2), 101-107.
- Pisani, A., Gubellini, P. B., Conquet, F., Picconi, B., Centonze, G., Bernardi & Calabresi. (2001). Metabotropic Glutamate Receptor 5 mediates the Potentiation of N-methyl-D-aspartate Responses in Medium Spiny Striatal Neurons. *Neuroscience*, 106(3). 579-587.

- Pittler, T. A. & Alger B. E. (1992). Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA<sub>A</sub> responses in hippocampal pyramidal cells. *Journal of Neuroscience*, 12, 4122-32.
- Ploj, K., Albery-Larsdotter, S., Arlbrandt, S., Kjaer, M. B., Skantze, P. M., & Storlien, L. H. (2010). The metabotropic glutamate mGluR5 receptor agonist CHPG stimulates food intake. *Neuroreport*, 21(10), 704–8. doi:10.1097/wnr.0b013e32833b4fe7
- Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pellemounter, M. A., Cullen, M. J., Mathes, W. F., Przypek, R., Kanarek R. & Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380. 243-247.
- Rada, P., Tucci, S., Murzi, E. & Hernández, L. (1997). Extracellular glutamate increases in the lateral hypothalamus and decreases in the nucleus accumbens during feeding. *Brain Research*, 768. 338-340.
- Rhoades, R. A. & Bell, D. R. (2012). *Fisiología médica. Fundamentos de medicina clínica*. (4° ed). Barcelona (España): Wolters Kluwer/Lippincott Williams &Wilkins.
- Risold, P. Y., Croizier, S., Legagneux, K., Brischoux, F., Fellmann, D., & Griffond, B. (2009). The development of the MCH system. *Peptides*, 30(11), 1969–72. doi:10.1016/j.peptides.2009.07.016
- Ritter, S. & Taylor, J. S. (1990). Vagal sensory neurons are required for lipoprivic but not glucoprivic feeding in rats. *American Journal of Physiology*, 258. 1395-1401.
- Robinson, T., & Berridge, K. (2000). The psychology and neurobiology of addiction: an incentive–sensitization view . *Addiction*, 95(8s2), 91–117. doi:10.1046/j.1360-0443.95.8s2.19.x
- Rui, L. (2013). Brain regulation of energy balance and body weight. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 14(4), 387–407. doi:10.1007/s11154-013-9261-9
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski G. P., Wilson, S., Arch, J. R. S.,



- Buckingham, R.E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W., terrett, A., Elshourbagy, N. A., Bergsma, D. J. Yanagisawa, M. (1998). Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. *Cell*, 92, 573-585.
- Sakurai, T., Nagata, R., Yamanaka, A., Kawamura, H., Tsujino, N., Muraki, Y., Kageyama, H., Kunita, S., Takahashi, S., Goto, K., Koyama, Y., Shioda, S. & Yanagisawa, M. (2005). Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron*, 46(2), 297–308. doi:10.1016/j.neuron.2005.03.010
- Sears R. M., Liu R., Narayanan N. S., Sharf R., Yeckel M. F., Laubach M., Aghajanian G. K. & DiLeone R. J. (2010). Regulation of Nucleus Accumbens Activity by the Hypothalamic Neuropeptide Melanin-Concentrating Hormone. *The journal of Neuroscience*. 30(24): 8263-8273.
- Shizgal, P. B. & Hyman, S. E. (2013). Homeostasis, Motivation, And Addictive States. In Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A. & Hudspeth, A. J. (5<sup>th</sup> ed), *Principles of Neural Science: (1096-1113)*. U.S.A.: The McGraw-Hill.
- Shimada, M., Tritos, N. A., Lowell, B. B., Flier, J. S., & Maratos-Flier, E. (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*, 396(6712), 670–4. doi:10.1038/25341
- Shultz, W., Dayan, P & Montague P. R. (1997). A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science*: 275, 1593-1599.
- Smart, D, Haynes, AC, Williams, G, & Arch, J. (2002). Orexins and the treatment of obesity. *European journal of pharmacology*. doi:10.1016/S0014-2999(02)01429-2
- Soria-Gómez, E., Matias, I., Rueda-Orozco, P. E., Cisneros, M., Petrosino, S., Navarro, L., Di Marzo, V. & Prospéro-García, O. (2007). Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. *British journal of pharmacology*, 151(7), 1109–16. doi:10.1038/sj.bjp.0707313

- Stanley, B. G., Willet, V. L., Donias, H. W., Dee, M. G. & Duva, M. A. (1996). Lateral hypothalamic NMDA receptors and glutamate as physiological mediators of eating and weight control. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 270, 443-449.
- 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(11), 4434-4440.
- Stratford, T. R., & Kelley, A. E. (1999). Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *The Journal of Neuroscience*, 19(24), 11040-11048. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/19/24/11040.short>
- Suzuki, K., Jayasena, C. N., & Bloom, S. R. (2012). Obesity and appetite control. *Experimental diabetes research*, 2012, 824305. doi:10.1155/2012/824305
- Székely, M., Pétervári, E., Balaskó, M., & Hernádi, I. (2002). Effects of orexins on energy balance and thermoregulation. *Regulatory peptides*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167011501003482>
- Tanimura, A., Yamazaki, M., Hashimoto, Y., Uchigashima, M., Kawata, S., Abe, M., Kita, Y., Hashimoto, K., Shimizu, T., Watanabe, M., Sakimura, K. & Kano, M. (2010). The Endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol produced by Diacylglycerol Lipase  $\alpha$  Mediates Retrograde Suppression of Synaptic Transmission. *Neuron*, 65, 320-327.
- Teitelbaum, P. & Stellar, E. (1954). Recovery from the failure to eat produced by hypothalamic lesions. *Science*, 120(3126). 894-5.
- Tellez, L. A., Perez, I. O., Simon, S. A., & Gutierrez, R. (2012). Transitions between sleep and feeding states in rat ventral striatum neurons. *Journal of neurophysiology*, 108(6), 1739-51. doi:10.1152/jn.00394.2012
- Ter Horst, G. J., de Boer, P., Luiten, P. G., & van Willigen, J. D. (1989). Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience*, 31(3), 785-97.
- Tong, Q., Ye, C., McCrimmon, R. J., Dhillon, H., Choi, B., Kramer, M. D., Yu, J., Yang, Z., Christiansen, L. M., Lee, C.E., Choi, C. S., Zigman, J. M., Shulman,

- G. I., Sherwin R. S., Elmquist, J. K. & Lowell, B. B. (2007). Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell metabolism*, 5(5), 383–93. doi:10.1016/j.cmet.2007.04.001
- Travagli, R. A., Hermann, G. E., Browning, K. N., & Rogers, R. C. (2006). Brainstem circuits regulating gastric function. *Annual review of physiology*, 68, 279–305. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040504.094635
- Tsuneki, H., Wada, T., & Sasaoka, T. (2010). Role of orexin in the regulation of glucose homeostasis. *Acta Physiologica*. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.02008.x
- Uchigashima, M, Narushima, M, & Fukaya, M. (2007). Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *The Journal of Neuroscience*, 14, 3663-3676. doi:10.1523/JNEUROSCI.0448-07.2007
- Vaughan, C., & Christie, M. (2005). Retrograde signalling by endocannabinoids. *Handbook of experimental pharmacology*, (168), 367–83.
- Van Den Pol, A. N. (1994). Metabotropic glutamate receptor mGluR1 distribution and ultrastructural localization in hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 349(4). 615-632.
- Van Den Pol, A. N., Carmelo, R. & Ghosh P. (1995). Metabotropic glutamate receptor mGluR5 subcellular distribution and developmental expression in hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 362(1). 134-150.
- Vetter, M. L., Faulconbrige, L. F., Webb, V. L. & Wadden, T. A. (2010). Behavioral and pharmacologic therapies for obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 6, 578-588. doi:10.1038/nrendo.2010.121 doi:10.1038/nrendo.2010.121
- Wilson, R. I. & Nicoll, R. A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, 410, 588-92.
- Xi, Z.-X. X., Peng, X.-Q. Q., Li, X., Song, R., Zhang, H.-Y. Y., Liu, Q.-R. R., Yang, H., Bi, G., Li, J. & Gardner, E. L. (2011). Brain cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nature neuroscience*, 14(9), 1160–6. doi:10.1038/nn.2874

- Yamanaka, A., Beuckmann, C. T., Willie, J. T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., Tominaga, M., Yagami, K., Sugiyama, F., Goto, K., Yanagisawa, M. & Sakurai, T. (2003). Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, 38(5), 701–13.
- Yasui, Y., Breder, C.D., Saper, C. B. & Cechetto, D. F. (1991). Autonomic responses and efferent pathways from the insular cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 303. 355-374.
- Yeomans, M., Blundell, J., & Leshem, M. (2007). Palatability: response to nutritional need or need-free stimulation of appetite? *British Journal of Nutrition*. doi:10.1079/BJN20041134