



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“ESTIMULACIÓN DE LA INGESTA DE ALIMENTO POR
RECEPTORES A CANABONIODES CB1 EN EL NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO: MECANISMO
NEUROQUÍMICO HIPOTALÁMICO PARA LA REGULACIÓN DE
LA SACIEDAD”**

Tesis que presenta:

M. en C. Ana María Cruz Martínez

Para obtener el Grado

Doctora en Ciencias

En la Especialidad de

Farmacología

Director de la Tesis/Codirector de la Tesis: Dr. Benjamín Florán Garduño/
Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez

México, D.F.

Febrero, 2014

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en el Departamento de Farmacología y en Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias bajo la tutoría del Dr. Benjamin Florán Garduño y cotutoría del Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez, con apoyo del CONACYT a través de la beca con número de registro 176517 y de la UNAM PAPIIT DGAPA IN 224811.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Dr. **Benjamin Florán Garduño** y Dr. **Rodrigo Erick Escartín Pérez**, por darme la oportunidad de continuar en este proyecto, confiar en mí, brindarme las herramientas necesarias para llevar a cabo los objetivos propuestos. En particular por enseñarme esa parte que implica la investigación científica, trabajar en equipo y además jamás olvidar la calidez humana, la sencillez y la humildad del ser humano ante todo, muchas gracias por la amistad que me han brindado.

A mi comité tutorial integrado por los Doctores **José Luis Reyes Sánchez**, **Ranier Gutiérrez Mendoza**, **José Antonio Terrón Sierra** y **Juan Manuel Mancilla Díaz**, por el apoyo académico brindado, los consejos, la observaciones realizadas para enriquecer día a día el proyecto.

A mis amigos **Refugio**, **Fanny**, **Arturo**, **Rene**, **Rodolfo**, **Juan Gabriel** por compartir momentos de alegría, tristezas y sobre todo por estar ahí incondicionalmente.

A mis **compañeros del Laboratorio 4** de Biofísica, Fisiología y Neurociencias por haberme cobijado en esta mi segunda casa y por hacer amena mi estancia en dicho laboratorio.

A **Paco**, **José Luis Raya** y **Chelita** por la gran ayuda proporcionada para poder realizar los experimentos y cumplir con los objetivos planteados.

A mi familia:

Este trabajo está dedicado en especial a dos personitas que sin ellos no estaría en este mundo, a mi ángel de la guarda, mi mamá **Albertina**, ya que siempre has estado conmigo espiritualmente y me has enseñado a ser una guerrera, a sonreír y a disfrutar de la vida cada momento y a mi padre **Cipriano** por ser padre y madre, por sus sabios consejos, animarme, creer en mí y estar ahí cuando más lo he necesitado, los amo.

A mis hermanos **Miguel, Carla y Cipriano** por siempre estar conmigo, por los buenos consejos y el apoyo infinito para seguir adelante.

A **Lorenzo** por todos los sabios consejos, por el apoyo brindado, por estar en las buenas y en las malas a mi lado, por caminar conmigo en el inicio y cierre de éste proyecto de mi vida, gracias infinitamente.

A toda mi familia en general (**tíos, primos, sobrinos**) por siempre enviarme la mejor vibra a pesar de estar en la distancia.

“Gracias Dios mío por permitirme concluir un proyecto más en el ciclo de mi vida, gracias a mi familia por estar a mi lado, a mis amigos, compañeros y conocidos que han estado, están y seguirán estando en mi historia, escribiendo más capítulos en el libro de mi vida..... Mil gracias”.

INDICE

Resumen.....	III
Abstract.....	IV
Lista de Abreviaturas.....	V
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	5
2.1 Sistema de endocannabinoides.....	5
2.1.1 Definición.....	5
2.1.2 Receptores a cannabinoides.....	5
2.1.2.1 Expresión y distribución.....	7
2.1.3 Ligandos endógenos (endocannabinoides).....	9
2.1.4 Síntesis y metabolismo.....	10
2.1.5 Transducción de señales.....	12
2.1.6 Clasificación de los cannabinoides.....	14
2.1.6.1 Agonistas.....	14
2.1.6.2 Antagonistas.....	16
2.2 Regulación de la alimentación.....	18
2.2.1 Mecanismos periféricos.....	21
2.2.2 Mecanismos centrales.....	22
2.2.2.1 Hipotálamo y control alimentario.....	23
2.2.2.2.1 Neuropeptidos hipotalámicos.....	27

2.2.2.2.2 Neurotransmisores hipotalámicos.....	28
2.2.2.2 Papel del NPH en la ingesta de alimento.....	29
2.3 Relación sistema endocanabinoide-alimentación.....	31
2.3.1 Relación Serotonina-cannabinoides-alimentación.....	34
2.3.2 Relación GABA-cannabinoides-alimentación.....	37
2.4 Secuencia de Sacidad Conductual (SSC).....	38
3. Planteamiento del problema.....	40
4. Hipótesis.....	42
5. Objetivos.....	43
6. Método.....	44
7. Resultados.....	55
7.1 Liberación de neurotransmisores.....	55
7.2 Conducta alimentaria.....	61
7.2.1 Ingesta de alimento y SSC.....	61
8. Discusión.....	74
8.1 El sistema endocanabinoide y la alimentación.....	74
8.2 Los receptores CB1 del NPH.....	76
8.3 Los receptores a serotonina y el efecto de lo cannabinoides.....	78
9. Conclusión.....	81
10. Perspectivas.....	83
11. Bibliografía.....	85
12. Anexos.....	110

RESUMEN

El sistema de los endocannabinoides es un factor importante en la regulación de la alimentación. Los receptores CB1 (CB1R) se expresan en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPH) y su activación induce hiperfagia, probablemente a través de la modulación de señales orexigénicas (neuropéptido Y o NPY, ácido γ -aminobutírico o GABA) y/o anorexigénicas (serotonina, 5-HT). A este respecto, se ha descrito la presencia del ARNm del CB1R en neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafé que inervan al NPH. También se sabe que la activación de los receptores serotoninérgicos en el NPH produce un efecto hipofágico y, de acuerdo con algunos estudios electrofisiológicos, algunas terminales GABAérgicas son moduladas vía receptores 5-HT₁. Por otra parte, se ha observado que la activación de los CB1R en otros sitios tales como la corteza prefrontal inhibe la liberación de 5-HT y en estudios de microdiálisis el bloqueo de los CB1R incrementa las concentraciones extracelulares de 5-HT. Con respecto a los receptores GABAérgicos, se ha reportado que la activación de dichos receptores en el NPH produce hiperfagia. Dado lo anterior es posible que el efecto hiperfágico de la activación de los CB1R pueda ser mediado por cambios en la liberación de 5-HT y/o GABA en el NPH. Con el objetivo de probar esta hipótesis, se estudiaron *in vitro* los efectos de la activación y bloqueo de los receptores CB1 y 5-HT en el NPH sobre la liberación de 5-HT y GABA mediante la técnica de liberación de neurotransmisores marcados radioactivamente y, posteriormente, se realizaron experimentos *in vivo* (ingesta de alimento y la secuencia de saciedad conductual, o SSC) para evaluar si los cambios en la liberación de [³H]-5-HT y [³H]-GABA podían explicar los efectos hiperfágicos de la activación de los CB1R en el NPH. Los resultados obtenidos muestran que la activación de los CB1R con ACEA 1 μ M inhibe la liberación de [³H]-5HT, efecto que es prevenido por el AM 251 (1 μ M, antagonista CB1), lo que sugiere que este efecto es mediado por los CB1R. Por otra parte, el ACEA estimuló indirectamente la liberación de [³H]-GABA, ya que la 5-HT (1 μ M) previno el efecto estimulador del ACEA. La activación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} también bloquearon el incremento de la liberación de [³H]-GABA inducida por ACEA, efecto prevenido por los antagonistas 5-HT_{1A} (SB 224289, 100 nM) y 5-HT_{1B} (WAY 100635, 100 nM). En los experimentos *in vivo*, la activación de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT₂ bloqueó el efecto hiperfágico inducido por la activación de los CB1R con ACEA previniendo la inhibición de la expresión de la saciedad. Además el bloqueo con el antagonista de los receptores GABA_A, bicuculina (0.20 μ g) también previno la inhibición de la saciedad inducida por ACEA. Estos resultados sugieren que los efectos hiperfágicos de la activación de los CB1R en el NPH se relacionan con la estimulación indirecta de la liberación de GABA, probablemente vía la inhibición de la liberación de 5-HT y como consecuencia la desinhibición de la liberación de GABA, además de que los receptores serotoninérgicos involucrados en dicho efecto incluyen a los 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}.

ABSTRACT

It is widely accepted that the endocannabinoid system is an important factor in the regulation of feeding. CB1 receptors (CB1R) are expressed in the paraventricular nucleus hypothalamic (PVN) and their activation induces hyperphagia, probably through the modulation of orexigenic signals (neuropeptide Y or NPY, γ -aminobutyric acid or GABA) and/or anorexigenic (serotonin, 5-HT). It has been described the presence of CB1R mRNA in serotonergic neurons of the raphe nucleus that innervate the PVN. It is also known that activation of serotonergic receptors in the PVN produces an effect hypophagic, according to electrophysiological studies, some GABAergic terminals are modulated via 5-HT₁ receptors. On the other hand, has been observed that activation of CB1R in other sites such as the prefrontal cortex inhibits the release of 5-HT and microdialysis studies of CB1R blockade increases extracellular levels of 5-HT. With regard to GABA has been reported that activation of these receptors in the PVN produces hyperphagia. Given this it is possible that the hyperphagic effect of CB1R activation can be mediated by changes in the release of 5-HT and / or GABA in the PVN. In order to test this hypothesis, we studied the *in vitro* effects of activation and blockade of CB1 receptors and 5-HT in the PVN on the release of 5-HT and GABA using radiolabelled neurotransmitter release technique and subsequently performed *in vivo* experiments (food intake and behavioral sequence of satiety, or BSS) to assess whether changes in the release of [³H]-5-HT and [³H]-GABA could explain the hyperphagic effects of the activation of CB1R in the PVN. The results show that activation of CB1R with 1 μ M ACEA inhibits the release of [³H]-5HT, an effect that is prevented by AM 251 (1 μ M, CB1R antagonist), suggesting that this effect is mediated by CB1R. Moreover, the ACEA indirectly stimulated the release of [³H]-GABA, and that 5-HT (1 μ M) prevented the stimulatory effect of ACEA. Activation of 5-HT_{1A} (100 nM), 5-HT_{1B} (100 nM) receptors also blocked the increased release of [³H]-GABA induced by ACEA, an effect prevented by 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} antagonists. In experiments *in vivo*, activation of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT₂ receptors blocked the hyperphagic effects induced by ACEA preventing the inhibition of the expression of satiety. Furthermore, blocking the GABA_A receptor antagonist, bicuculline (0.20 μ g) also prevented the inhibition of satiety induced by ACEA. These results suggest that the hyperphagic effects of CB1R activation in the PVN are related to indirect stimulation of GABA release, probably via inhibition of 5-HT release and consequently the loss of inhibition of GABA release, in addition to serotonergic receptors involved in this effect include the 5-HT_{1B}.

ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
AC	Adenilil ciclase
ACEA	Araquidonoil, 2-cloroetilamina
ABC	Área Bajo la Curva
AEA	Anandamida
2-AG	2-araquidonoilglicerol
AgRP	Péptido relacionado a agouti
AMPc	Adenosina-3',5'- monofosfato
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
AM 251	1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H- pirazol-3-carboxamida
ARC	Núcleo arqueado
AP	Antero-posterior
APF	Área perifornical
AVT	Área ventral tegmental
CART	Transcrito regulado por cocaína y anfetamina
Cb	Cerebelo
CB1	Receptor a canabinoide subtipo 1
CB1A	Variante del <i>splicing</i> del receptor CB1
CB2	Receptor a canabinoide subtipo 2
CCK	Colecistoquinina
CGPR	Receptor acoplado a proteína G
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DA	Dopamina
DAGL	Lipasa de diacilglicerol
DM	Núcleo dorsomedial
DMSO	Dimetilsulfoxido
DV	Dorso-medial
EEM	Error estándar de la Media

Ep	Núcleo ectopeduncular
FAAH	Amida hidrolasa de ácidos grasos
FFA	Ácidos grasos libres
GABA	Ácido γ -aminobútrico
GI	Tracto gastrointestinal
Glu	Glutamato
GLP-1	Péptido similar al glucagón
Gp	Globo pálido
GRP	Péptido liberador de gástrina
Hi	Hipocampo
HDL	Colesterol de alta densidad
HL	Hipotálamo lateral
5-HT	Serotonina
IMAO	Inhibidor de la monoaminoxidasa
Ki	Constante de inhibición
LM	Latero-medial
MAGL	Lipasa de monoacilglicerol
MCH	Hormona concentradora de melanina
α-MSH	Hormona estimulante de los melanocitos α
NA	Noradrenalina
NArPE	N-araquidonoilfostatidiletanolamina
NAT	N-aciltransferasa
NPH	Núcleo paraventricular hipotálamico
NPY	Neuropéptido Y
NT	Neurotransmisor
NTS	Núcleo del tracto solitario
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PKA	Proteína cinasa A
POC	Proopiomelanocortina
Δ^9-THC	Delta-9-tetrahidrocanabinol

TRH	Hormona liberadora de tirotrópina
TPH2	Triptófano hidroxilasa 2
SNC	Sistema nervioso central
SNR	Substancia nigra pars reticulata
SSC	Secuencia de saciedad conductual
VMH	Núcleo ventromedia del hipotálamo
VH	Vehículo

1. Introducción

La obesidad es una enfermedad crónica, caracterizada por un exceso de tejido adiposo que se produce por la acumulación progresiva de grasa en sus reservorios, debido a un desequilibrio de la homeostasis calórica donde la ingesta de alimento excede al gasto energético (Moreno, et al., 1991; Morlans, 2001). Actualmente México ocupa el primer lugar a nivel mundial en obesidad infantil y segundo lugar en obesidad en adultos según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y 7 de cada 10 mexicanos padece sobrepeso y obesidad de acuerdo a la ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2012).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la obesidad es uno de los mayores retos de salud pública del siglo XXI. Su incremento se atribuye a diversos factores, estos incluyen: a) el cambio global en la dieta, mayor consumo de alimentos con alto contenido energético en grasas y carbohidratos, b) la disminución de la actividad física, debido a la naturaleza cada vez más sedentaria de los individuos, c) factores genéticos y sociales. En conjunto con el alarmante aumento de la obesidad y las complicaciones asociadas, como la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y la inflamación, la obesidad constituye un factor de riesgo para la aparición de otras enfermedades, como la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión y algunos tipos de cáncer (Despres & Lemieux, 2006; Shoelson, Herrero & Naaz, 2007; Romeo, Lee & Schoelson, 2012).

La necesidad por prevenir o disminuir este padecimiento ha sido de gran interés, diferentes estrategias incluyendo dieta, ejercicio, farmacoterapia y cirugía bariátrica son consideradas para tratarla (Aronne, 2002). Los enfoques actuales de las posibles estrategias farmacológicas se basan en la investigación de blancos terapéuticos con el fin de regular los mecanismos neuroquímicos que ocurren a nivel del sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP), y que desempeñan un papel en la regulación de la ingesta de alimento, la absorción de nutrientes y el metabolismo energético (Aronne & Thornton-Jones, 2007). A nivel del SNC los centros homeostáticos ejercen un

papel importante en la percepción y regulación de la ingesta de alimento, el balance energético y el peso corporal.

Dentro de estas estrategias farmacológicas, una de las terapias para el tratamiento de la obesidad ha sido el uso del SR 141716 (Rimonabant, Acomplia), el antagonista de los receptores a cannabinoides (CB1). Los resultados en estudios clínicos realizados en pacientes obesos muestran una disminución significativa del peso corporal y de la circunferencia de la cintura (Van Gall, Rissanen, Scheen, Ziegler & Rössner, 2005); incluso se sugirió su uso en pacientes con síndrome metabólico, ya que la administración crónica de dicho antagonista mejoró el perfil lipídico (disminución de los niveles de triglicéridos y aumento los niveles de colesterol de alta densidad), además de la disminución de los factores de riesgo cardiovasculares y metabólicos (Van Gall, Rissanen, Scheen, Ziegler & Rössner, 2005; Després et al., 2005; Pi-Sunyer et al., 2006). Aunque el Rimonabant fue retirado del mercado Europeo y rechazado por la FDA (Food and Drug Administration) por sus efectos secundarios psiquiátricos (Traynor 2007), los efectos benéficos de este fármaco han demostrado la importancia que representa el sistema de endocannabinoides (EC) en la modulación de la conducta alimentaria, el balance energético y el control del peso corporal.

El sistema de los EC está formado por receptores a cannabinoides principalmente (CB1 y CB2), los ligandos endógenos (endocannabinoides: Anandamida y 2-araquidonoilglicerol) y las enzimas que sintetizan y degradan a los endocannabinoides. Los receptores CB1 (CB1R) pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, la activación de éstos genera una cascada de señalización que inhibe la actividad de la adenilil ciclasa a través de una proteína G inhibidora (Gi) y como repuesta la disminución de la liberación de neurotransmisores (Alger, 2002; Wilson & Nicoll, 2002).

Los CB1R se expresan abundantemente a nivel cerebral, particularmente en el hipotálamo, región considerada el sitio primario de integración de diversos

procesos homeostáticos como la regulación de la alimentación. Dentro de las estructuras anatómicas hipotalámicas clave para el control de la ingesta de alimento y el balance energético se encuentra el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPH), que es uno de los núcleos donde convergen distintas vías neuronales que influyen en la regulación de la homeostasis energética y la alimentación. La activación de los CB1R en NPH en modelos animales induce hiperfagia, probablemente a través de la modulación de señales orexigénicas (estimuladoras de la ingesta de alimento [neuropéptido Y o NPY, ácido γ -aminobutírico o GABA]) y/o anorexigénicas (inhibidoras de la ingesta de alimento (serotonina, [5-HT])). Una de estas proyecciones neuronales que inervan al NPH es la del sistema serotoninérgico, proveniente del núcleo del rafe, en donde se ha descrito la presencia del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de los CB1R. También se ha demostrado que la activación de ciertos subtipos de receptores serotoninérgicos en este núcleo produce un efecto hipofágico (disminución de la ingesta de alimento). Por otra parte, se ha observado que la activación de los CB1R en regiones cerebrales como la corteza prefrontal inhibe la liberación de 5-HT y en estudios de microdiálisis en el núcleo acumbens, el bloqueo de éstos incrementa las concentraciones extracelulares de 5-HT. Con respecto al sistema GABAérgico, en estudios conductuales se ha reportado que la activación de los receptores GABA_A en el NPH produce hiperfagia y, de acuerdo con estudios electrofisiológicos, algunas terminales GABAérgicas son moduladas vía receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}. De acuerdo con la evidencia descrita anteriormente, es posible sugerir que uno de los mecanismos mediante el cual los endocannabinoides estimulan la ingesta de alimento involucra la modulación de la liberación de 5-HT y/o GABA en el NPH. Específicamente, la hipótesis del presente trabajo es que la activación de los CB1R en el NPH estimula la liberación de GABA vía la inhibición de la liberación de 5-HT, y que este incremento de la concentración de GABA en el NPH puede ser en parte el responsable del incremento del consumo de alimento inducido por los agonistas de los CB1R. Por lo tanto el objetivo del presente estudio fue establecer si la transmisión serotoninérgica y GABAérgica

es modulada por los CB1R para producir los efectos hiperfágicos inducidos por los cannabinoides. En consistencia con lo anterior, en el presente trabajo se estudiaron *in vitro* los efectos de la activación y bloqueo de los CB1R y de los receptores a la 5-HT en el NPH sobre la liberación de 5-HT y GABA mediante la técnica de liberación de neurotransmisores marcados radioactivamente y, posteriormente, se realizaron experimentos *in vivo* (ingesta de alimento y la secuencia de saciedad conductual, o SSC) para evaluar si los cambios en la liberación de [³H]-5-HT y [³H]-GABA podrían explicar los efectos hiperfágicos de la activación de los CB1R en el NPH. Los resultados muestran que la activación de los CB1R con (ACEA; 1µM, agonista) inhibe la liberación de [³H]-5-HT, efecto que es prevenido por el (AM 251; 1µM, antagonista CB1), lo que sugiere que este efecto es mediado por los CB1R. Por otra parte, el ACEA estimuló la liberación de [³H]-GABA, ya que la 5-HT (1 µM) previno el efecto estimulador del ACEA. La activación de los receptores 5-HT_{1B} también bloqueó el incremento de la liberación de [³H]-GABA inducida por el ACEA, efecto prevenido por el antagonista 5-HT_{1B}. En los experimentos *in vivo* (ingesta de alimento y la SSC), la activación de los receptores 5-HT_{1B} bloqueó el efecto hiperfágico inducido por el ACEA previniendo la inhibición de la expresión de la saciedad. Estos resultados sugieren que el efecto hiperfágico inducido por la activación de los CB1R en el NPH se relaciona con la estimulación indirecta de la liberación de GABA, probablemente vía la inhibición de la liberación de 5-HT, la cual parece inhibir a su vez la liberación de GABA vía la activación de receptores 5-HT_{1B}.

2. Antecedentes

2.1 Sistema de endocannabinoides

2.1.1 Definición

El sistema de endocannabinoides representa un nuevo mecanismo de comunicación celular y está formado básicamente por tres elementos que incluyen los receptores de membrana (receptores a cannabinoides), los ligandos endógenos y los mecanismos para la síntesis y el metabolismo de los endocannabinoides (enzimas y transportador). Este sistema fue descubierto a principios de 1990 durante las investigaciones realizadas con el Δ^9 -THC, principal componente con propiedades psicoactivas de la planta *Cannabis sativa* (marihuana). La clonación de los receptores a cannabinoides mediante técnicas de Biología Molecular condujo a la identificación de moléculas endógenas capaces de unirse y activar a los receptores, llamadas “endocannabinoides”, porque a pesar de ser químicamente diferentes al Δ^9 -THC tienen la capacidad de reconocer específicamente los sitios de unión de éste (Devane, et al., 1988, 1992; Matsuda, et al., 1990, Munro, et al., 1993; Mechoulam, et al., 1995).

2.1.2 Receptores a cannabinoides

Los receptores a cannabinoides se denotan con la abreviatura CB seguida de una numeración en el orden de su descubrimiento. Hasta la fecha se han identificado dos tipos de receptores a cannabinoides denominados CB1 y CB2, los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (CGPR) y que se diferencian entre sí por su secuencia de aminoácidos, su mecanismo de señalización y su distribución anatómica. Ambos receptores exhiben una homología de alrededor del 48% (Howlett, et al., 2002). Existe evidencia que sugiere la existencia de una variante por empalmes (*splicing*) alternativos del receptor CB1 denominado CB1_A (Shire, et al., 1995).

El primer receptor a canabinoides caracterizado por medio de métodos radiométricos fue el receptor CB1 (Devane, *et al.*, 1988). Se clonó en 1990 a partir de una librería de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de corteza cerebral de rata (Matsuda, *et al.*, 1990).

El receptor CB1 contiene 472-473 aminoácidos y tiene siete dominios transmembranales (Matsuda, *et al.*, 1990); la tercer asa intracelular y el extremo carboxilo terminal (C-terminal) son los sitios involucrados en sus interacciones con proteínas G de la familia Gi/o (Howlett, *et al.*, 1998). El receptor CB1 humano presenta una homología del 93% y del 98% en la secuencia de nucleótidos y en la secuencia de aminoácidos, respectivamente, con respecto al de ratas (Shire *et al.* 1995).

El 1993 se caracterizó un nuevo receptor a canabinoides a partir de células mieloides de bazo de rata (Munro & Abu-Shaar, 1993), al que llamaron CB2. Este receptor presenta un 44% de homología en la secuencia de aminoácidos con respecto al CB1 y un 68 % de homología con las regiones transmembranales (Fig. 1).

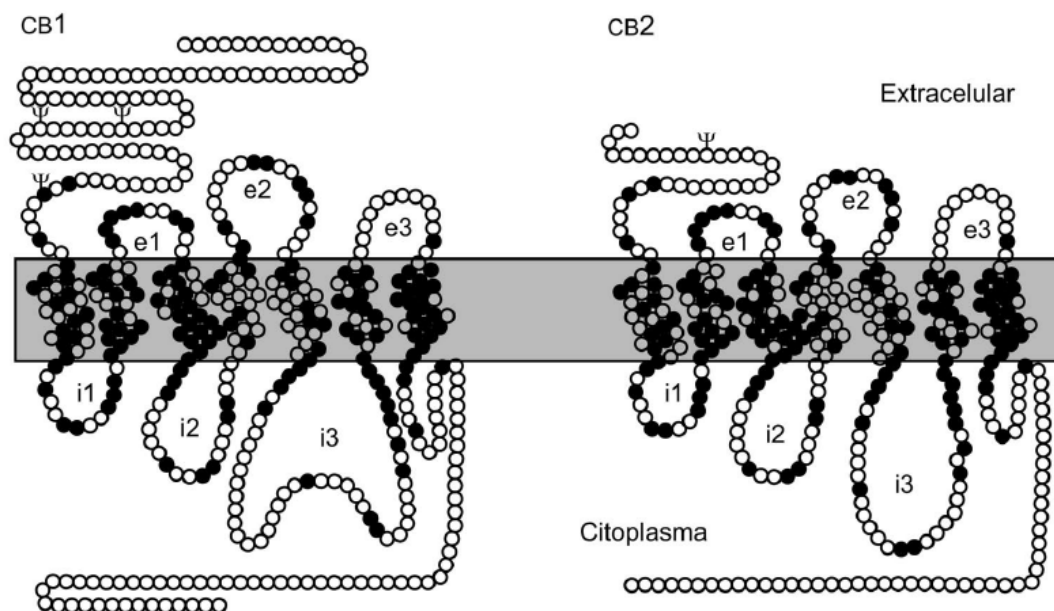


Figura 1. Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2. Los receptores tienen siete segmentos transmembranales; ● aminoácidos comunes para los dos receptores; ○ aminoácidos diferentes; Ψ sitios comunes consenso de glicosilación; e1, e2, e3 asas extracelulares; i1, i2, i3 son asas intracelulares (Rodríguez, Carrillo & Soto, 2005).

2.1.2.1 Expresión y distribución de los receptores a cannabinoides

La expresión y distribución de los CB1R ha sido estudiada por medio de métodos autorradiográficos de unión de ligando-receptor en rebanadas cerebrales de rata (Herkenham et al., 1990; 1991), hibridación *in situ* (Matsuda, Bonner & Lolait, 1993; Westlake, Howlett, Bonner, Matsuda & Herkenham, 1994; Marsicano & Lutz, 1999), autorradiografía en el cerebro humano (Glass, Dragunow & Faull, 1997), inmunohistoquímica (Tsou, Brown, Sanudo-Pena, Mackie & Walker, 1998) y por la unión de [³⁵S]GTPγS estimulado por agonista (Sim, Selley & Childers, 1995), mostrando evidencia que los CB1R son uno de los receptores acoplados a proteínas G más abundantes en el cerebro de los mamíferos. Se expresa densamente en el SNC y en la periferia (Herkenham, *et al.*, 1990; Gatley, *et al.*, 1998). En el SNC se expresa con alta densidad en los ganglios basales, la sustancia nigra pars reticulada, el núcleo entopenducular, el segmento externo del globo pálido, el caudado-putamen, el cerebelo y el hipocampo; y con niveles moderados en la corteza cerebral, el tálamo y el tallo cerebral; en baja densidad en el hipotálamo específicamente en el NPH y el hipotálamo lateral (HL) (Herkenham, *et al.*, 1990; Howlett, *et al.*, 2002) (Fig. 2,3). A pesar de que en ciertas regiones su densidad es baja (por ejemplo en el hipotálamo), esto no genera una estricta correlación entre los niveles de expresión y la funcionalidad de los CB1R. La actividad relativa de los cannabinoides no puede ser evaluada solamente por la densidad relativa del receptor, ya que existen otros factores como la eficiencia del acople al receptor (Breivogel & Childers, 1998).

En la periferia, los CB1R se encuentran en los ganglios adrenales, el intestino, la próstata, los testículos, el timo, la amígdala, los linfocitos, los fagocitos, la musculatura lisa, el endotelio vascular, las neuronas periféricas, los riñones y el útero.

2.1.3 Ligandos endógenos (endocannabinoides)

Tras el descubrimiento de los receptores a cannabinoides se impulsó la búsqueda de los ligandos endógenos y, en 1992 se encontró un derivado del ácido aráquidónico (AEA, araquidonoiletanolamida), al cual identificaron como el primer ligando endógeno para el receptor CB1, compuesto llamado anandamida (que proviene del sanscrito *ananda* que significa “felicidad interna” y del carácter amida de la molécula) (Devane, *et al.*, 1992). La anandamida fue aislada de cerebro de porcinos y bovinos (Devane, *et al.*, 1992) y presenta una mayor afinidad por los receptores CB1 ($K_i = 89 \pm 10\text{nM}$) que por los CB2 ($K_i = 371 \pm 102\text{nM}$) (Showalter, Compton, Martin & Abood, 1996), y al ser activados los CB1R, inhiben la actividad de la adenilato ciclasa y la de canales de calcio tipo N.

Otros agentes canabimiméticos también etanolamidas de ácidos grasos poliinsaturados son la homo- γ -linoleniletanolamida y la docosatetraeniletanolamida (Hanus, *et al.*, 1993).

Tres años después del descubrimiento de la anandamida, se aisló el 2-araquidonilglicerol (2-AG) de tejido intestinal de perro (Mechoulam, *et al.*, 1995), otro canabinoide endógeno presente también en el cerebro (Sugiera, *et al.*, 1995). El 2-AG es el canabinoide más abundante en el cerebro y su concentración es aproximadamente 200 veces superior a la de anandamida (Stella, *et al.*, 1997). Más recientemente se han descrito dos nuevos endocannabinoides, el 2-araquidonilglicerileter (noladin) (Hanus, *et al.*, 2001) y la O-araquidonoil-etanolamida (virodamina) (Fig. 4).

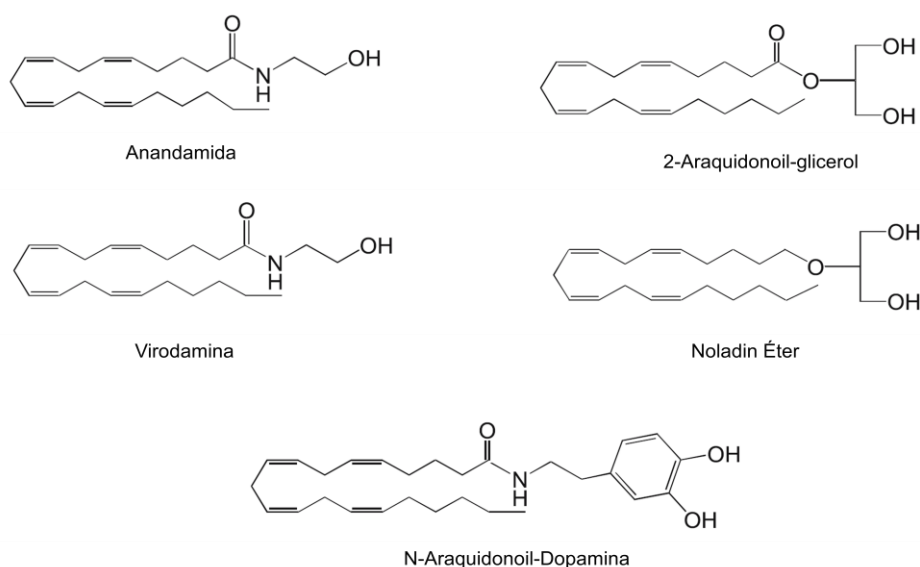


Fig. 4. Estructura química de ligandos endógenos que se unen a los receptores a cannabinoides (Modificado de Di Marzo, 2005).

2.1.4 Síntesis y metabolismo

Los endocannabinoides tienen una característica muy particular, son lipofílicos. A diferencia de los neurotransmisores clásicos, estos no se almacenan en vesículas sinápticas, se sintetizan y liberan localmente bajo demanda. Diferentes estímulos, incluyendo la despolarización de la membrana y un consecuente incremento de Ca^{2+} y/o la estimulación de receptores, pueden activar la maquinaria enzimática para inducir la división de los fosfolípidos de membrana y la consecuente síntesis de endocannabinoides. Son derivados del ácido araquidónico conjugado con etanolamina o glicerol (Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 2005), los más abundantes son el N-araquidoniletanolamina (anandamida) y 2-araquidonilglicerol (2-AG).

La anandamida se forma a partir de la N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (NArPE), misma que es sintetizada a partir del ácido araquidónico y el precursor fosfolípido fosfatidiletanolamina por acción de la enzima N-aciltransferasa (NAT), la cual cataliza la transferencia de ácido araquidónico de fosfatidilcolina al grupo principal de la fosfatidiletanolamina. La NAT requiere de la presencia de Ca^{2+}

intracelular y es regulada por el monofosfato cíclico de Adenosina (AMPc), el cual aumenta la actividad de la NAT por fosforilación mediada a través de la actividad de la proteína cinasa A (PKA) dependiente del AMPc (Cadas, *et al.*, 1994; Piomelli, 2003). La síntesis de anandamida a partir de la NArPE es catalizada por la fosfolipasa D (PLD) (Fig. 5).

La síntesis y liberación de 2-AG es diferente que la anandamida. El 2-AG es un monoglicérido y su formación está asociada al metabolismo de diacilglicerol, principalmente por la acción de la fosfolipasa C (PLC), la cual actúa sobre el diacilglicerol, liberando la molécula de ácido graso de la posición sn-1 del glicerol. La enzima se activa al despolarizarse la membrana vía canales de calcio dependientes de voltaje (Stella, Schweitzer, & Piomelli, 1997).

La señalización por endocannabinoides es finalizada por dos procesos que incluyen el transporte dentro de la célula y la hidrólisis por dos enzimas específicas. La captura de los endocannabinoides es mediada por un transportador específico (Beltramo, *et al.*, 1997), mismo que se expresa en el cerebro (Giuffrida, Beltramo & Piomelli, 2001) y que funciona de manera similar a otros acarreadores lipídicos, facilita la captura de ambos (anandamida y 2-AG) y es independiente de energía (Beltramo, *et al.*, 1997). Cabe mencionar que el transporte y la degradación son dos procesos independientes (Fegley, *et al.*, 2004); la degradación de los endocannabinoides se lleva a cabo por la acción de dos enzimas específicas. La anandamida es hidrolizada en sus dos componentes, etanolamina y ácido araquidónico por la acción de la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), misma que está ampliamente distribuida en el SCN, principalmente en las regiones en las que es abundante el receptor a cannabinoides CB1.

Una vez dentro de la célula, el 2-AG es degradado a ácido araquidónico y glicerol por la acción de la enzima lipasa monoacilglicerol (MAGL) que se localiza en tejidos cerebrales (Stella, *et al.*, 1997) (Fig. 5).

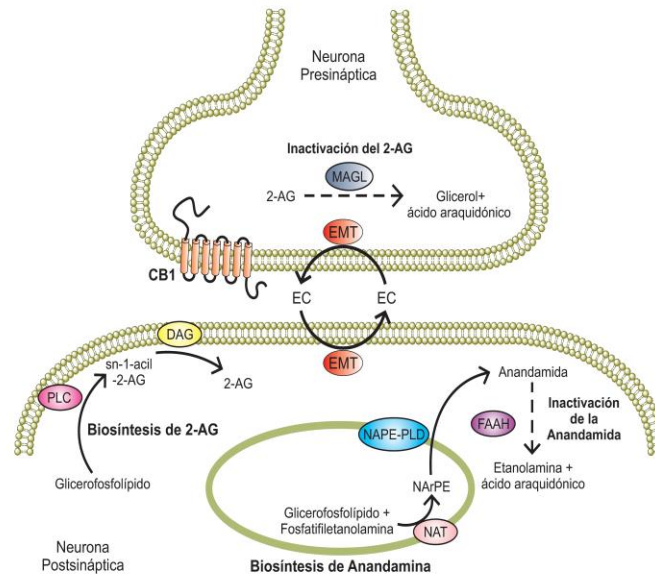


Figura 5. Síntesis y metabolismo de los cannabinoides endógenos (Modificado de Di Marzo, et al., 2004).

2.1.5 Transducción de señales

Los receptores a cannabinoides están acoplados a proteínas Gi/o; sin embargo, en ciertas circunstancias, el CB1R puede acoplarse a proteínas Gs (Childers, et tal., 1993) y provocar la acumulación de AMPc (González et al., 2009). Una posible explicación puede ser la existencia de múltiples conformaciones del CB1R, inducida por diferentes agonistas, con afinidades variables para diferentes proteínas G. Además la existencia de las isoformas de la adenilato ciclasa (AC) pueden ser una importante contribución al efecto dual en la acumulación de AMPc, se ha reportado que el acople del CB1R a las isoformas de la AC (I, III, V y VIII) resultan en la inhibición de la acumulación de AMPc a través de la liberación de subunidades $G_{i\alpha}$ mientras que el acople del CB1R a las isoformas (II, IV y VII) producen el aumento a través de la liberación de las subunidades $G_{\beta\gamma}$.

Al ser sintetizado los endocannabinoides son liberados desde la postsinapsis al espacio sináptico donde activan a los receptores a cannabinoides ubicados en

las neuronas presinápticas, induciendo inhibición de la presinápsis (señalización retrógrada), la cual se explica a través de tres posibles mecanismos:

- a) La subunidad α de la G_i/o inhibe a la adenilil ciclasa (AC) dando lugar a una reducción de la concentración de AMPc intracelular y una disminución en la fosforilación de canales de potasio (K^+) mediados por proteína cinasa A (PKA) (Howllet, 1995; Childers, *et al.*, 1996; Elphick & Egertová, 2001).
- b) La subunidad $\beta\gamma$ inhibe la entrada de calcio (Ca^{2+}) a través del bloqueo de los canales de Ca^{2+} N, P/Q (Macki & Hille, 1992; Felder, *et al.*, 1993; Macki, Devane & Hille, 1993; Macki, Lai, Westenbroek & Mitchell, 1995).
- c) Se produce hiperpolarización por la activación de canales rectificadores de K^+ , facilitando la salida de K^+ de la célula y dificultando la restauración del nivel basal del potencial de acción (Macki, Devane & Hille, 1993; Macki, Lai, Westenbroek & Mitchell, 1995; McAllister, Griffin, Satin & Abood, 1999) (Fig. 6).

Como consecuencia, el efecto global de la activación del receptor CB1 por los endocannabinoides es la disminución de la liberación de neurotransmisores en la neurona presináptica, tanto excitadores, como inhibidores (Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 2005).

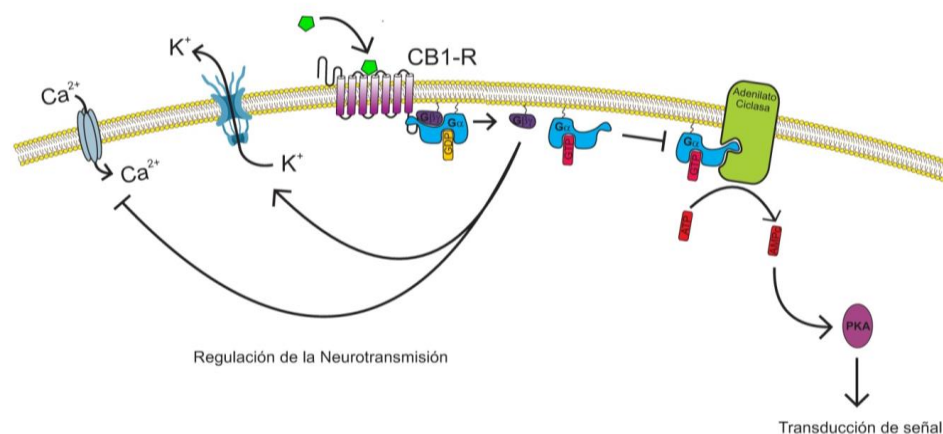


Figura 6. Transducción de señales de los receptores CB1.

2.1.6 Clasificación de cannabinoides endógenos y exógenos

Con el aislamiento y caracterización de los cannabinoides naturales se han realizado esfuerzos con el fin de desarrollar análogos sintéticos que carezcan de los efectos psicoactivos indeseables y que conserven las características farmacológicas de interés. Así, estudios de relación estructura-actividad han originado compuestos canabimiméticos con mayor afinidad y especificidad, mismos que han sido empleados como herramientas para elucidar los mecanismos bioquímicos y moleculares de los endocannabinoides.

2.1.6.1 Agonistas

Basados en su estructura química, los agonistas cannabinoides se pueden clasificar en: clásicos, no clásicos, amiloalquiloides y eicosanoides (Howllet, *et al.*, 2002).

Canabinoides clásicos

En este grupo se encuentran los cannabinoides exógenos derivados de la planta *Cannabis sativa* y sus análogos. El principal compuesto con propiedades psicoactivas de la *Cannabis* es el Δ^9 -THC que es un agonista parcial de los receptores CB1 y CB2 (Howllet, *et al.*, 2002).

Canabinoides no clásicos

Son derivados sintéticos del Δ^9 -THC y su principal característica es que carecen del anillo dihidropirano. Uno de los más representativos es el CP-55,940, un potente y completo agonista de los receptores CB1 y CB2 (Fig. 7).

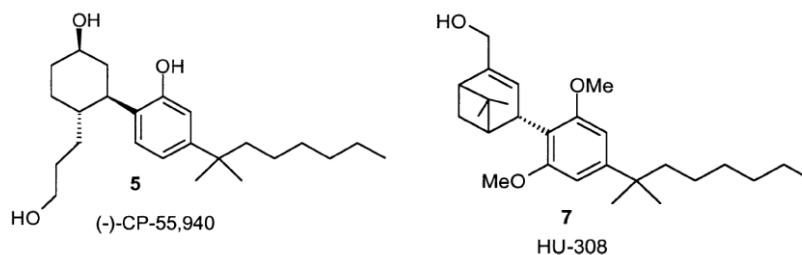


Figura 7. Estructura química de los cannabinoides no clásicos más representativos.

2.1.6.2 Antagonistas

El desarrollo de antagonistas del receptor CB1 constituyó un paso fundamental en el estudio de la farmacología del sistema de los endocannabinoides. Diversas investigaciones permitieron el desarrollo del Rimonabant (SR141716), primer antagonista selectivo para el receptor CB1 reportado que presenta una afinidad dentro del orden nanomolar (11.5 nM) para el receptor CB1 y en el orden micromolar para el receptor CB2 (Rinaldi-Carmona, *et al.*, 1994). A partir del SR141716, se han desarrollado otros antagonistas del receptor CB1, como el AM 251 (Gatley, *et al.*, 1996), el AM 281 (Lan, *et al.*, 1999), el SR14778 (Rinaldi-Carmona, *et al.*, 2004) y el LY320135 (Felder, *et al.*, 1998) (Fig. 10).

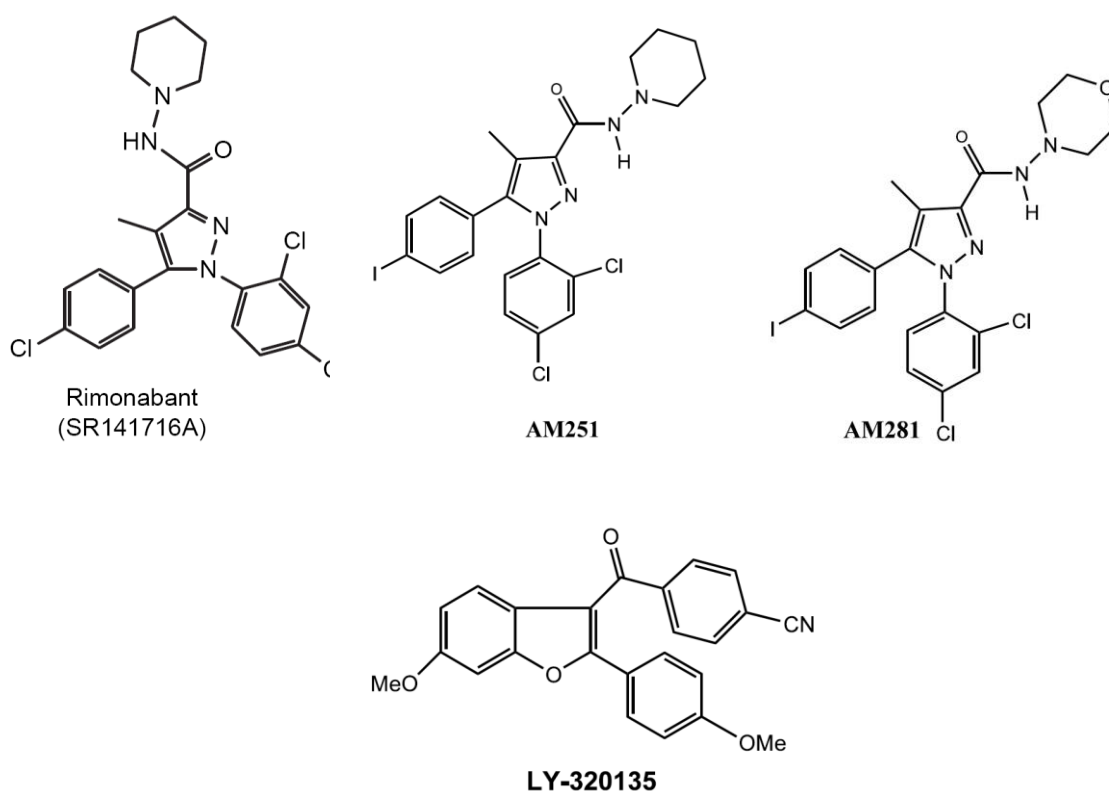


Figura 10. Estructura química de antagonistas cannabinoides.

El uso de agonistas, antagonistas y los bloqueadores de las enzimas (síntesis y degradación) de los cannabinoides tanto en modelos animales como en

humanos, ha permitido el estudio del sistema endocanabinoide en la modulación de diferentes procesos fisiológicos, a nivel periférico con la regulación de la respuesta inmune (Parolaro, 1999) y el sistema cardiovascular (Hillar, 2000); en el cerebro, en procesos tales como el control del movimiento (Fernandez-Ruíz et al., 2002), y la memoria y aprendizaje (Hampson & Deadwyler, 1999) y de manera importante con la regulación de alimentación.

2.2. Regulación de la alimentación

El conocimiento sobre la regulación de la alimentación es importante para el tratamiento de la obesidad y otros padecimientos relacionados, ya que esta función reguladora depende de señales energéticas, gastrointestinales, sensoriales, hedónicas y de condicionamiento, lo cual involucra tanto mecanismos periféricos como centrales que modulan la ingesta de alimento para el mantenimiento del metabolismo y la composición corporal de los mamíferos (Malacara, 2004; Cota, *et al.*, 2003).

El comportamiento alimentario es el resultado de la integración a nivel del SNC de las señales homeostáticas (periféricas) y no homeostáticas (hedónicas), que están implicadas en el mantenimiento del equilibrio energético del organismo. En efecto, varias señales son producidas por los alimentos durante el tránsito intestinal, así como las señales que indican el estado nutricional y energético del cuerpo, las cuales se transmiten al cerebro que, a su vez, ajusta la ingestión de alimentos y la actividad metabólica para preservar la energía y la homeostasis del organismo (Magalhaes *et al.*, 2010). Las experiencias psicológicas, las señales fisiológicas y los procesos neuronales del SNC intervienen en la expresión del apetito, ya que interactúan durante el curso de un episodio de comida para formar una red psico- biológica. Esta red se conceptualiza en términos de tres distintos y coordinados dominios (fig.11). El dominio de experiencias psicológicas (las sensaciones de hambre y saciedad, procesos hedónicos) y las operaciones conductuales que las acompañan (comidas, ingesta de macronutrientes); el dominio de la fisiología periférica y los eventos metabólicos, que surge como consecuencia de la absorción de nutrientes, la utilización y su almacenamiento; y por último, el dominio de los neurotransmisores y las interacciones de las señales metabólicas en el cerebro (Blundell, 1991). Así pues, la expresión del apetito refleja el funcionamiento de los eventos sincronizados de los tres dominios. Dentro de las experiencias psicológicas: el hambre y la saciedad determinan los procesos de iniciación o

finalización de la comida en la conducta alimentaria. El hambre es definida como la motivación para buscar y consumir alimentos e iniciar el episodio de la alimentación y por el contrario, el proceso que finaliza estos episodios y el consumo de alimento se denomina saciedad (Blundell, 1991).

La cascada de la saciedad (hambre-satisfacción-saciedad) representa los acontecimientos que estimulan la alimentación (pre-prandial) junto con los procesos desencadenados por la ingestión de alimentos, que terminan la ingesta (prandial) y los procesos que tienen lugar después de terminar de comer (pos-prandial). Las señales pre-prandiales son generadas a partir de los alimentos por las señales sensoriales (vista y olfato), estas sirven inicialmente para estimular la ingesta de alimento y para preparar al cuerpo para la ingestión (Teff, 2000). También, la información sensorial en la fase prandial por contacto químico y físico del alimento en la boca, es señal de hambre y promueve el consumo. Las señales procedentes del tracto gastrointestinal (GI) se transmiten hacia el cerebro principalmente vía el nervio vago (Mei & Chen, 1985). Por último, las señales prandiales y post-prandiales se generan por la detección de los nutrientes absorbidos desde el GI hacia la circulación periférica. Los nutrientes circulantes pueden ser metabolizados en los órganos (por ejemplo, el hígado) y los tejidos periféricos y activar receptores del SNC (por ejemplo, el tallo cerebral) o entrar directamente al SNC a través de la circulación y actuar como señales de saciedad post-absorción (Harrold, Dovey, Blundell & Halford, 2012) (Fig. 11).

Es interesante comprender que la conducta alimentaria y el balance energético son controlados por una red compleja de interacciones de mecanismos que involucran al SNC (por ejemplo, hipotálamo y tallo cerebral) y al sistema nervioso periférico (intestino, hígado, tiroides y tejido adiposo). El cerebro integra la información de numerosas señales para determinar el requerimiento energético del cuerpo y así modificar la experiencia del hambre e iniciar los procesos conductuales necesarios en respuesta a ésta. Dentro de estos

mecanismos podemos encontrar la liberación de mensajeros químicos como las hormonas, los neuropéptidos y los neurotransmisores.

Dentro de las señales periféricas se encuentran principalmente la leptina, insulina, colecistocinina (CCK) y la grelina, derivados del tejido adiposo, el páncreas, el intestino y el estómago respectivamente; las primeras tres señales son consideradas promotoras de la saciedad (inhibidoras de la ingesta de alimento) y la última, estimuladora de la ingesta de alimento, cuyo mensaje llega al SNC, particularmente al hipotálamo, a través del torrente sanguíneo o del nervio vago.

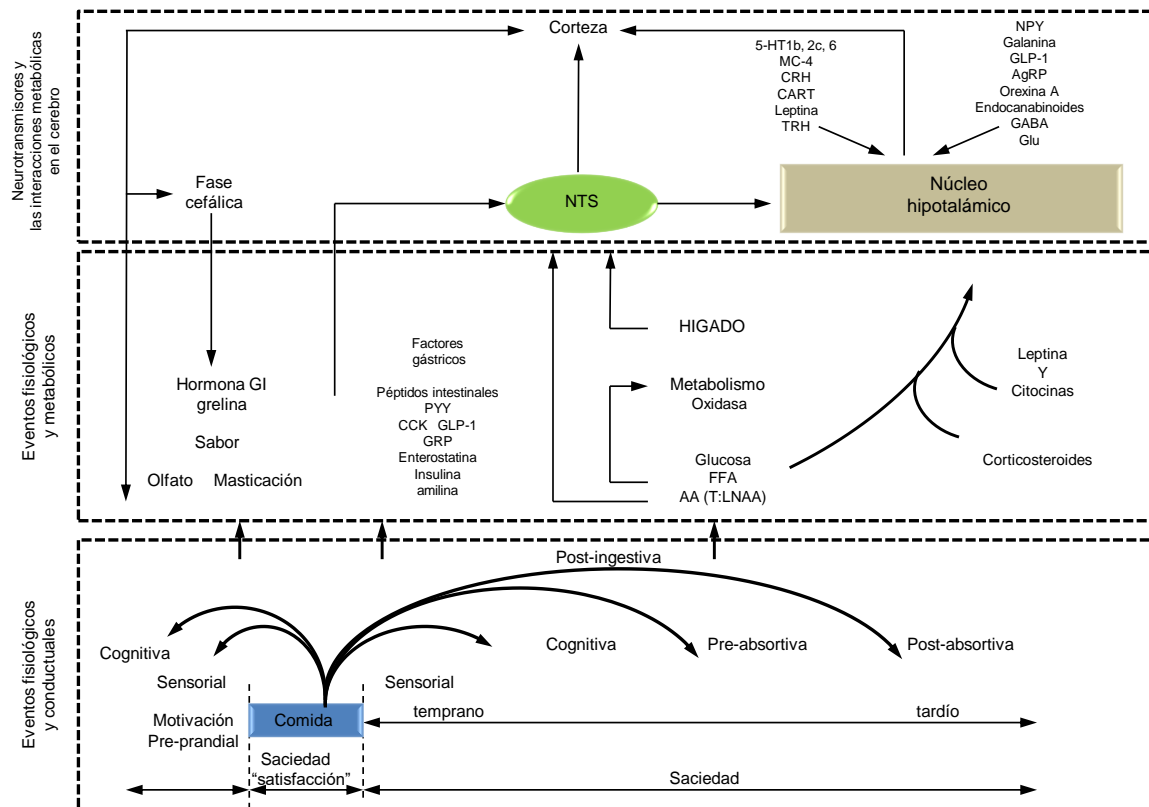


Figura 11. Esquema representativo de la red de la regulación psico-biológica del apetito dividido en tres dominios distintos pero coordinados: a) fisiológicos y conductuales; b) fisiológicos y metabólicos; c) neuroquímicos y la actividad cerebral. GI, Tracto gastrointestinal; péptido YY, PYY; colecistoquinina, CCK; péptido similar al glucagón, GLP-1; péptido liberador de gástrina, GRP; ácidos grasos libres, FFA; aminoácidos, AA; proporción de aminoácidos neutrales triptófano, T:LNAA; núcleo del tracto solitario, NTS; melanocortina, MC; Hormona liberadora de corticotropina, CRH; hormona liberadora de tirotropina, TRH; serotonina, 5-HT; transcripto relacionado con cocaína-anfetamina, CART; neuropéptido Y, NPY; péptido relacionado agouti, AgRP, glutamato, Glu. (Modificado de Harrold et al., 2012).

2.2.1 Mecanismos periféricos

Diversos tejidos periféricos producen péptidos/hormonas que actúan vía receptores que se expresan en el cerebro. Los circuitos estimuladores e inhibidores del apetito están influenciados por señales hormonales periféricas que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, tales como la leptina, la insulina, la grelina y el péptido YY3-6 (Gale, Castracane & Mantzoros, 2004).

La leptina es una proteína de 146 aminoácidos producida principalmente por el tejido adiposo. Bajos niveles de expresión de esta hormona se han detectado en el hipotálamo, la pituitaria, la placenta, el músculo esquelético, los epitelios gástricos y mamaros (Moschos, Chan & Mantzoros, 2002; Gale, Castracane & Mantzoros, 2004).

La leptina puede jugar un papel en diversos procesos fisiológicos, pero está involucrada principalmente en la homeostasis energética y la saciedad. Los niveles de leptina se encuentran incrementados en proporción al tejido graso, la leptina circulante lleva información al hipotálamo referente a la cantidad de energía almacenada en el tejido adiposo, suprimiendo el apetito e influyendo en el gasto energético (Friedman & Halaas, 1998).

Por otro lado, la insulina fue una de las primeras señales hormonales estudiadas por estar implicadas en el control del peso corporal por el sistema nervioso central. La insulina es producida en las células β de los islotes de Langerhans pancreáticos, llega al cerebro por la circulación y actúa sobre neuronas hipotálamicas suprimiendo la ingesta de alimento (Werther, *et al.*, 1987).

La grelina es una hormona gástrica que participa en la homeostasis estimulando el apetito. Es un péptido de 28 aminoácidos, se expresa

principalmente en células enterocromafines localizadas en la mucosa del fundus del estómago (Kojima, *et al.*, 1999).

La grelina tiene una función promotora de la ingestión de alimento, aumenta el uso de carbohidratos y reduce el uso de grasas, incrementa la motilidad gástrica y la secreción ácida (Gale, Castracane & Mantzoros, 2004). Estimula la síntesis y liberación de NPY, con efecto central opuesto al de la insulina y la leptina (Milke & Carmona, 2004).

2.2.2 Mecanismos centrales

El sistema nervioso central regula el balance energético y peso corporal a través de tres posibles mecanismos: (1) los efectos relacionados con conducta, incluyendo alimentación y actividad física, (2) los efectos relacionados con la actividad del sistema nervioso autónomo, el cual regula el gasto energético y otros aspectos de metabolismo; y (3) los efectos sobre el sistema neuroendócrino, incluyendo la secreción de hormonas tales como la hormona del crecimiento, tiroidea, cortisol e insulina (Spiegelman & Flier, 2001). Es un centro regulador, el cual recibe una serie de señales provenientes de la ingesta y el gasto calórico, tales como, las señales sensoriales (vista, olfato, gusto); derivadas del tracto gastrointestinal (Ghrelina, GLP-1, CCK, bombesina, enterostatina); de depósitos corporales de energía (leptina, insulina) y señales derivadas del metabolismo de los sustratos de energía (glucosa, lactato).

Dentro del SNC, una de las regiones que participa sustancialmente en el control de la homeostasis energética es el hipotálamo, que es considerado ampliamente como un centro integrador de señales periféricas y neuronales que se encuentran involucradas en los mecanismos de hambre y saciedad.

2.2.2.1 Hipotálamo y control alimentario

Un importante sitio de acción del sistema endocanabinoide en la modulación de la ingesta de alimento es el hipotálamo (Flier, 2004). Principal centro del sistema nervioso central responsable para el mantenimiento de la homeostasis, por medio de la integración de información neuronal ascendente y descendente así como de señales hormonales circulantes para la regulación de diversos procesos homeostáticos, como la sed, la reproducción, la temperatura, el balance hormonal, los ritmos biológicos y la regulación del consumo y el gasto energético, así como la distribución corporal de la grasa (Rosenbaum, *et al.*, 1997). En cuanto a la regulación de la ingesta de alimento y el balance energético es considerado uno de los sensores principales de los nutrientes porque forma parte de un sistema en el cual se integra la información proveniente de una serie de estímulos relacionados con el estado metabólico (señales periféricas) y centrales, los cuales modulan la liberación de péptidos hipotalámicos, hormonas y neurotransmisores, que regulan las vías anabólicas que estimulan la ingesta de alimento y disminuyen el gasto de energía (NPY, AgRP, MCH) y las vías catabólicas (CRH, TRH, CART, α -MSH), además de modular el eje hipotálamo hipofisario.

El hipotálamo está constituido por más de 40 núcleos que son distinguibles histológicamente, los que a su vez, pueden ser divididos en diferentes subnúcleos. La importancia del hipotálamo en la regulación del balance energético y el peso corporal se estableció en los trabajos de Hetherington-Ranson y Anand-Brobeck, quienes demostraron que las lesiones bilaterales en diferentes áreas del hipotálamo llevaban a una dramática ganancia o pérdida de peso corporal. Por ejemplo mostraron que lesiones en el VMH generaba un marcado aumento del peso corporal y obesidad, por lo tanto, nombraron a esta región como el “centro de la saciedad” mientras que las lesiones en el HL producían una pérdida del peso corporal, causando afagia y eventos de muerte por inanición (centro del hambre). Actualmente se sabe que existen más

estructuras hipotalámicas involucradas en la regulación de ingesta de alimento, el balance energético y el peso corporal.

Las áreas hipotalámicas que están asociadas con la regulación de la conducta alimentaria y el balance energético incluyen principalmente al ARC, VMH, DMH, NPH, HL, área perifornical (APF), y el núcleo supraquiasmático (Kalra et al., 1999) (Fig. 13). Las neuronas localizadas en estas regiones producen mensajeros químicos, los cuales son liberados en las terminales nerviosas para estimular o inhibir la conducta alimentaria (Meister, 2007).

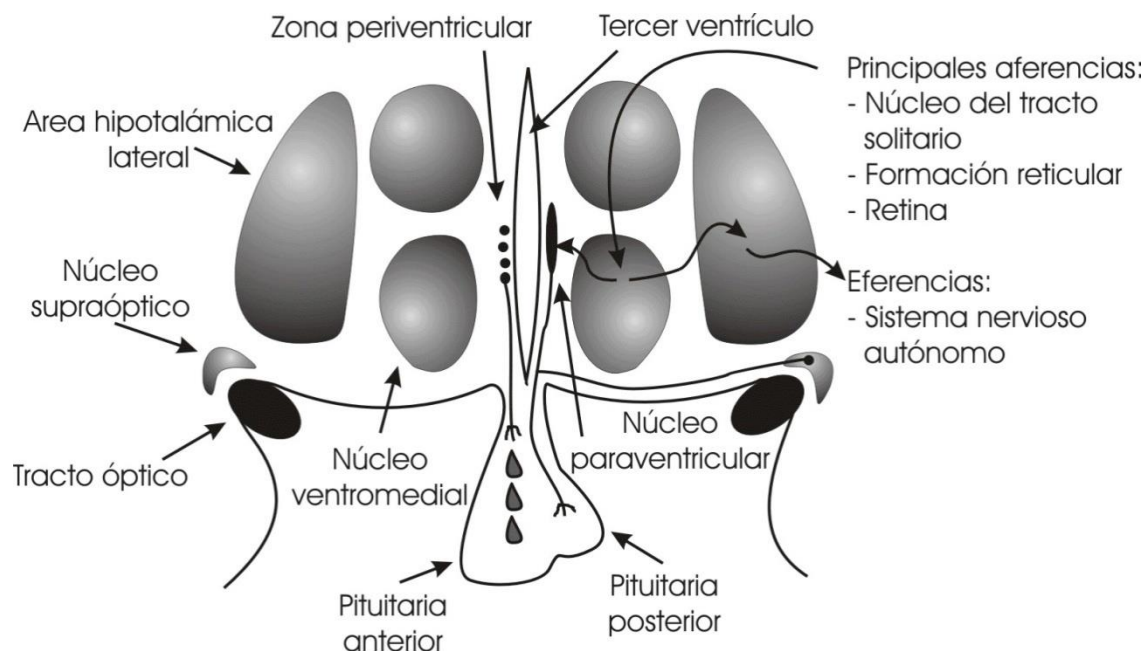


Figura 13. Esquema representativo de un corte coronal de cerebro mostrando la región diencefálica que contiene al hipotálamo y algunos de sus núcleos.

Entre los grupos neuronales que forman al hipotálamo, el núcleo arqueado (ARC) es considerado el centro del mecanismo de la regulación del peso corporal, constituye el sensor primario de las señales periféricas que son evocadas por la alimentación o el ayuno. Las neuronas de esta región producen péptidos que regulan la ingesta de alimento. En esta región existen dos subpoblaciones neuronales, las neuronas que sintetizan NPY/AgRP (NPY considerado uno de los potentes estimuladores de la ingesta de alimento) (King

& Williams, 1998), y las neuronas que sintetizan POMC/CART (señales inhibitoras de la ingesta de alimento). El ARC envía proyecciones a otros núcleos hipotalámicos tales como el NPH, VMH, DMH e HL. Las neuronas del ARC son consideradas neuronas de primer orden debido a la ausencia de la barrera hematoencefálica, por lo que este núcleo se encuentra estratégicamente situado para que se establezca una comunicación directa con las señales periféricas y los péptidos que viajan a través de torrente sanguíneo (Kalra, et al., 1999).

El VMH, es uno de los grandes núcleos hipotalámicos considerado el “centro de la saciedad”. Las estimulaciones en este núcleo inhiben la alimentación, en contraparte las lesiones en esta región causan sobrealimentación y ganancia del peso corporal (Hetherington & Ranson, 1940; Satoh, et al., 1997). Además, es identificado como un objetivo clave para la señal de Leptina, que actúa en el hipotálamo para inhibir la alimentación, estimulando el gasto energético y causando bajo peso (Satoh, et al., 1997). El VMH tiene conexiones directas con el NPH y el DMH.

El DMH, se encuentra inmediatamente dorsal al VMH, presenta amplias conexiones directas con otras regiones hipotalámicas tales como el NPH y el HL. El NPH y el DMH pueden cooperar funcionalmente como una unidad, que involucra la iniciación y el mantenimiento de la ingesta de alimento. Este núcleo contiene una amplia expresión de receptores a insulina así como receptores a leptina (Ob/Rb) (Kalra, et al., 1999).

El HL es conocido como el clásico “centro del hambre” ya que su estimulación incrementa la ingesta de alimento y su destrucción atenúa la alimentación generando afagia, adipsia y disminución del peso corporal (Grossman, Halaris & Collier, 1978). El HL contiene subpoblaciones de neuronas que sintetizan orexinas y la hormona concentradora de melanina (MCH), ambos péptidos estimulan la ingesta de alimento (Kalra, et al. 1999).

Por su parte, el NPH es considerado el segundo núcleo hipotalámico de interés en la regulación de la homeostasis energética. Las neuronas de este núcleo se consideran neuronas de segundo orden. También se le ha propuesto como

centro de saciedad, ya que se ha demostrado que las lesiones en este núcleo causan un incremento notable en la ingesta de alimento y obesidad (Sims & Lorden, 1986). Este núcleo tiene mucha influencia sobre la regulación la alimentación ya que regula la ingesta de alimento por influencia metabólica, hormonal y por respuestas endocrinas relacionadas con el estado nutricional del organismo (Williams et al., 2001). Esta estructura es el blanco donde convergen muchas señales estimuladoras o inhibitoras del apetito originadas de diferentes núcleos hipotalámicos (ARC, VMH, DMH, HL) (Elmqvist et al., 1998) (Fig. 14).

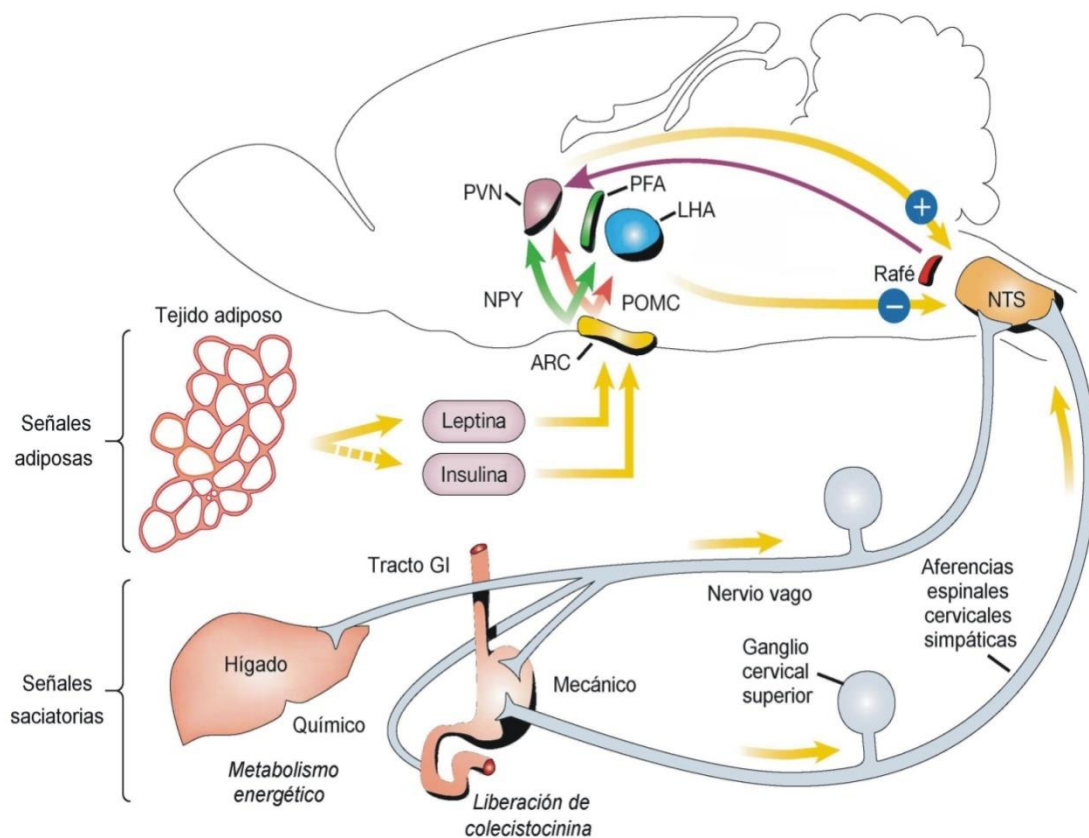


Figura 13. Esquema representativo de los mecanismos centrales y periféricos en el control de la ingesta de alimento. El hipotálamo recibe e integra señales neuronales, metabólicas y humorales para la regulación de la homeostasis energética. (Schwartz, *et al.*, 2000).

2.2.2.1.1 Neuropeptidos hipotálamicos y alimentación

Las neuronas hipotálamicas producen mediadores que tienen acciones orexigénicas y anorexigénicas, los cuales son liberados en las terminales dentro del hipotálamo así como también en otras regiones del cerebro, del tallo cerebral y la medula espinal. Se han identificado un gran número de péptidos en el hipotálamo que modifican la conducta alimentaria, péptidos catabólicos (POMC, CART y CRH) y anabólicos (NPY, AgRP y MCH) (Matias & Di Marzo, 2007).

El NPY es sintetizado por neuronas del ARC y las mismas que proyectan a distintas regiones como el NPH, el DM, la región perifornical y el HL (Grove & Smith, 2003). La inyección de NPY en el NPH de las ratas estimula la ingesta de alimento (Stanley & Leibowitz, 1985). Las neuronas NPYérgicas son capaces de responder a una gama de nutrientes periféricos y señales metabólicas hormonales tales como, glucosa, insulina y leptina (McMillen, *et al.*, 2005).

El AgRP coexpresa con las neuronas NPY en el ARC, y es un bloqueador de los receptores a melanocortina tipo 3 y 4 (MC₃/MC₄). La administración de AgRP produce incremento de la ingesta de alimento al bloquear el efecto inhibitorio de la alimentación de la melanocortina (mediado por receptores MC₃) (Nijenhuis, Oosterom & Adan, 2001).

La hormona estimulante de melanocitos α (α -MSH) es un péptido de 13 aminoácidos derivado de la molécula precursora POMC. Es considerado un péptido anoréxico que actúa a nivel de los receptores a melanocortina, suprimiendo la ingesta de alimento (Wisse & Schwartz, 2001).

El neuropeptido CART co-localiza con las neuronas POMC en el ARC y también actúa suprimiendo el apetito. Promueve el balance negativo de energía. Se ha observado un incremento de su síntesis neuronal en respuesta a un aumento

de señales del adiposito en el cerebro principalmente en el ARC. Colocaliza con MCH en el HL y con Tirotropina (TRH), galanina, vasopresina y oxitocina en el NPH (Kuhar & Dall Vechia, 1999). Así, CART esta colocalizado tanto con neuropéptidos orexigénicos como anorexigénicos.

2.2.2.1.2 Neurotransmisores hipotalámicos y alimentación

Dopamina

La dopamina (DA) es un importante neurotransmisor en la regulación de la ingesta de alimento (Meguid, *et al.*, 2000). La ausencia de la producción de dopamina en los ratones deficientes de DA causa una incapacidad para iniciar la alimentación. La liberación de DA parece tener un sitio de acción específico de la ingesta de alimento, tal como el núcleo acumbens que está asociado con el efecto reforzante en la alimentación. En el hipotálamo la liberación de DA está asociada con la duración del consumo de comida, el cual es un factor determinante en el patrón de alimentación. Así pues, la DA se requiere para iniciar cada comida y por lo tanto está asociada con el número de comidas y su duración (Meguid, *et al.*, 2000).

Noradrenalina

Las fibras ascendentes noradrenérgicas del tallo cerebral (*Locus coeruleus*) difunden e inervan al hipotálamo. Las lesiones químicas y electrolíticas de las fibras ascendentes noradrenérgicas y las vías al hipotálamo se asocian a la sobrealimentación y obesidad (Wellman, 2000). Estos resultados sugieren que la noradrenalina (NA) juega un papel en la saciedad. Sin embargo, la introducción de NA exógena dentro de regiones discretas del cerebro aumenta la alimentación.

Estos datos indican que la alteración de la noradrenalina en el cerebro puede aumentar o disminuir la ingesta de alimento, dependiendo del sitio de la aplicación (Wellman, 2000).

Glutamato

El glutamato es un neurotransmisor excitador en la regulación neuroendocrina (Meister, 2000). El glutamato también juega un papel en la conducta alimentaria, se ha mostrado que la inyección de glutamato en el HL ejerce una intensa respuesta en la ingesta de alimento en ratas saciadas (Stanley, Willet, Donias, Ha, & Spears, 1993). Este efecto pudiera ser explicado por un papel excitatorio de glutamato sobre neuronas orexigénicas MCH y orexina.

2.2.2.2 Papel del Núcleo paraventricular del hipotálamo en la ingesta de alimento/ Balance de energía

El **núcleo paraventricular del hipotálamo (NPH)** anatómicamente dividido en dos grupos de neuronas; magnocelulares (tres subdivisiones) y parvocelulares (5 subdivisiones). Las subdivisiones magnocelulares son colectivamente conocidas como subnúcleo magnocelular anterior, posterior y medial. Las neuronas de estas regiones proyectan a la neurohipófisis y están involucradas en la producción de las hormonas de la pituitaria posterior (Swanson & Sawchenko, 1983). La subdivisión parvocelular comprende los subnúcleos parvocelulares dorsal, lateral, medial, periventricular y anterior. Estas regiones proyectan al núcleo autonómico en el tallo cerebral y la medula espinal y son responsables de la activación del sistema nervioso simpático (Sawchenko & Swanson, 1982). Las principales funciones homeostáticas reguladas por el NPH incluyen las repuestas al estrés, conducta alimentaria y balance energético, equilibrio de los fluidos, funciones cardiovasculares, temperatura corporal y funciones reproductivas.

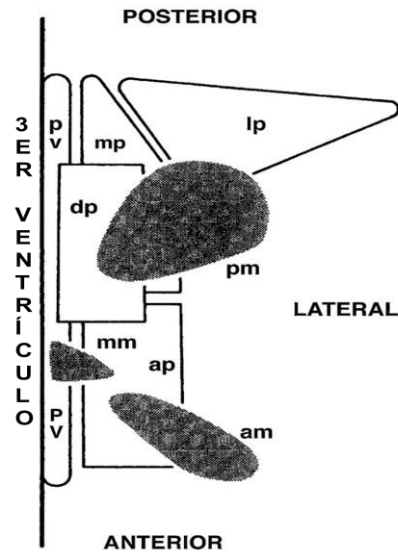


Figura 14. Esquema representativo que muestra las subdivisiones magnocelulares (áreas sombreadas) y parvocelulares del NPH de la rata. am, área magnocelular anterior; ap, área parvocelular anterior; dp, área parvocelular dorsal; lp, área parvocelular lateral; mm, área magnocelular medial; mp, área parvocelular medial; pm, área magnocelular posterior; pv, área parvocelular periventricular. (Modificado de Swanson, 1981).

La regulación de la ingesta de alimento y el gasto de energía es fundamental para la homeostasis y el NPH es una estructura clave en los circuitos del sistema nervioso central que controlan la ingesta de alimento y la homeostasis energética, debido a su papel como un órgano efector neuroendocrino y autonómico. Las señales circulantes del estado nutricional del organismo ingresan al NPH, ya sea directamente o a través de la activación de aferentes del núcleo arqueado, dichas señales regulan las salidas neuroendocrinas o autonómicas. Las salidas neuroendocrinas del NPH incluyen la liberación de oxitocina, vasopresina, hormona liberadora de corticotropina (CRH), y la hormona liberadora de tirotrina (TRH), las cuales modulan la secreción hormonal periférica del intestino, la secreción de corticosteroides adrenales y el metabolismo energético celular respectivamente. Las eferencias preautonómicas del NPH incluyen las proyecciones oxitocinérgicas hacia al complejo motor vagal dorsal que regula la motilidad gástrica (Tasker, 2006). Estas eferencias del NPH generalmente juegan un papel inhibitor en el control de la ingesta de alimento, de tal manera que el NPH es considerado como un

centro de saciedad. Las lesiones del NPH o la inhibición crónica de estas neuronas causan hiperfagia y obesidad en roedores (Gradison & Guidotti, 1977; Sims & Lorden, 1986).

El NPH se encuentra densamente innervado por axones de neuronas que proyectan del núcleo arqueado con NPY con AgRP; proyecciones con POMC, CART y de las neuronas que producen orexina del hipotálamo lateral (Elmqvist, *et al*, 1998, 1999). Además, es rico en terminales que contienen numerosos neurotransmisores que modifican el apetito ya sea estimulándolo o inhibiéndolo, de los cuales se encuentran el NPY, la galanina, la noradrenalina, la hormona estimulante de los melanocitos α (α -MSH), el GABA, la serotonina (5-HT), los péptidos opiodes y, más recientemente, los endocannabinoides. Por otra parte, las neuronas hipofisiotropicas de este núcleo actúan como transductores neuroendocrinos, que en respuesta a estímulos, liberan péptidos hacia la circulación portal, estos actúan como hormonas que llegan a la pituitaria anterior para regular el eje hipotalámico-hipofisario. En el NPH se encuentran dos importantes tipos de neuronas que regulan el metabolismo energético, las neuronas que sintetizan TRH, que se encargan de controlar el eje pituitario-tiroideo y las neuronas que producen CRH, encargadas de controlar el eje pituitario-adrenal (Leibowitz & Wortley, 2004; Hillebrand, de Wied & Adam, 2002; Flier, Harris & Hollenberg, 2000). Las hormonas tiroideas son consideradas importantes moduladores de la homeostasis energética a través de sus efectos en la termogénesis, la acción directa de proteínas de desacoplamiento y la estimulación de la lipólisis (Lanni, Moreno, Lombardi & Goglia, 2003).

2.3 Relación sistema endocanabinoide y la ingesta de alimento

Los cannabinoides juegan un papel importante en la regulación de la conducta alimentaria y el balance energético. La activación de los CB1R desencadena una serie de eventos a nivel periférico y central (figura 15). A nivel central son

importantes moduladores de la conducta alimentaria (Kirkham, 2005; Vickers & Kennett, 2005). Se sabe que tanto los cannabinoides exógenos (Δ^9 -THC) como endógenos (AEA, 2-AG) aumentan la ingesta de alimento en animales y humanos (Kirkham & Williams, 2001; Avraham, *et al.*, 2005; Simiand, *et al.*, 1998; Colombo, *et al.*, 1998; Freedland, *et al.*, 2001). En este contexto, los antagonistas de los CB1R, el SR141716 y el AM 251 disminuyen la ingesta de alimento y el peso corporal (Williams & Kirkham, 1999). Experimentos realizados en ratones *knockout* del receptor CB1 muestran una reducción en el consumo de alimento (Di Marzo, *et al.*, 2001) y del peso corporal con respecto a los ratones *wild type* (Cota, *et al.*, 2003), además son resistentes a la obesidad inducida por dieta (Ravinet, *et al.*, 2003). La administración intraventricular de SR141716 reduce la alimentación en ratas no privadas (Verty, *et al.*, 2005). La AEA y el 2-AG se detectan en altas concentraciones en el hipotálamo, en donde la restricción de alimento incrementa los niveles de 2-AG pero no de AEA (Kirkham *et al.*, 2002).

El sistema endocanabinoide desempeña un papel clave en la sobrealimentación y la obesidad, pues se ha observado que en ratones con obesidad inducida por una dieta alta en grasas (OID), la administración crónica de Rimonabant induce una reducción temporal de la ingesta de alimento y una sostenida reducción de la ganancia del peso corporal (Ravinet, *et al.*, 2003). En cuanto a la distribución de los receptores CB1, éstos colocalizan con señales orexigénicas y anorexigénicas, lo cual sugiere que están involucrados en el control homeostático y hedónico de la ingesta de alimento y del balance energético. Además, los niveles de endocannabinoides se encuentran incrementados durante el ayuno, mientras que se reducen en la saciedad. La inyección directa de agonistas del CB1R dentro de ciertas áreas hipotalámicas ejercen efectos hiperfágicos, mientras que los antagonistas del CB1R conducen a una reducción del apetito (Jamshidi & Taylor, 2001). Los sujetos sometidos a modelos animales de obesidad (ratones deficientes de leptina *ob/ob* y deficientes del receptor a leptina *db/db*) los niveles hipotalámicos de endocannabinoides se encuentran elevados, y la administración de leptina

reduce esta sobreproducción (Di Marzo et al., 2001), así como las concentraciones de ambos endocannabinoides (Di Marzo et al., 2001). Los experimentos realizados en ratones carentes de la enzima FAAH (FAAH (-/-), la enzima encargada de metabolizar a los ligandos endógenos, resultan en una reducción de los niveles de CART (péptido anorexigénico) en el ARC, el DMH y el NAc (Osei-Hyiaman et al., 2005). De la misma forma, en experimentos *in vitro*, la AEA aumenta los niveles de NPY en el hipotálamo (Gamber et al., 2005), sugiriendo que los incrementos de los niveles de los endocannabinoides después de una privación de alimento regulan disminuyendo o aumentando a los neuropéptidos anorexigénicos y orexigénicos respectivamente.

Los endocannabinoides además de controlar la liberación de péptidos que influyen en la ingesta de alimento, modulan diferentes redes hipotalámicas actuando retrógradamente en las neuronas presinápticas por la inhibición de neurotransmisores inhibidores y/o excitadores.

Dentro de los estudios clínicos, una de las terapias para el tratamiento de la obesidad ha sido el uso de Rimonabant (SR 141716), el antagonista de los CB1R. Resultados obtenidos en estudios clínicos realizado con pacientes obesos mostró una disminución significativa del peso corporal y de la circunferencia de la cintura (Van Gall, Rissanen, Scheen, Ziegler & Rössner, 2005); incluso se sugirió su uso en pacientes con síndrome metabólico, pues la administración crónica de dicho antagonista mejoró el perfil lipídico, disminuyendo los triglicéridos y aumentando el colesterol de alta densidad (HDL), disminuyendo los factores de riesgo cardiovasculares y metabólicos (Van Gall, Rissanen, Scheen, Ziegler & Rössner, 2005; Després et al., 2005; Pi-Sunyer et al., 2006). Aunque el Rimonabant fue retirado del mercado Europeo y rechazado por la FDA (Food and Drug Administration) debido a efectos secundarios relacionados con el estado de ánimo (Despres et al., 2005; Traynor 2007), los efectos positivos de este fármaco han demostrado la importancia

que representa el sistema de endocannabinoides (EC) en la modulación de la conducta alimentaria, el balance energético y el control del peso corporal.

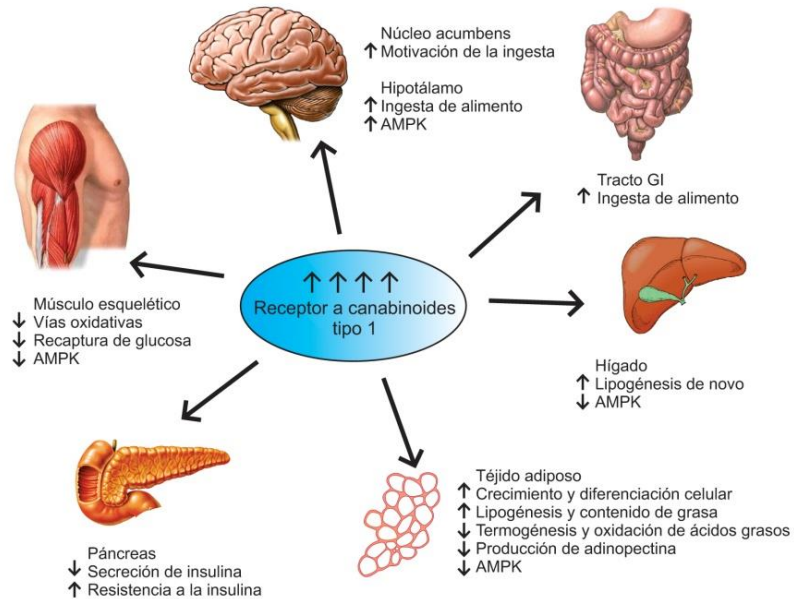


Figura 15. Los efectos de la activación de los CB1R en el control de la ingesta de alimento y el balance energético. Proteína cinasa activada por AMP, AMPK. (Modificado de Bellochio et al., 2008).

2.3.1 Relación Serotonina-cannabinoides-alimentación

La serotonina (5-HT) es una amina biogénica sintetizada a partir del aminoácido esencial derivado de la dieta, triptófano, a través de dos enzimas, la triptófano hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. La enzima TH presenta dos isoformas, la TH1 presente principalmente a nivel periférico y la TH2 localizada a nivel cerebral (Walther & Bader, 2003). La 5-HT es almacenada en vesículas sinápticas para posteriormente ser liberada al espacio sináptico y activar a sus respectivos receptores ubicados pre o post-sinápticamente. Los receptores serotoninérgicos (5-HTR) se clasifican en base a la estructura y la transducción de señales en 7 familias (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇) con 14 subtipos de receptores. La mayoría de los 5-HTR se encuentran acoplados a la proteína G (1 y 5 acoplados a Gi; 2, Gq;

4,6, y 7, Gs), excepto el receptor 5-HT₃ que es un canal catiónico de Na⁺ y K⁺ activado por ligando. A nivel cerebral, la distribución de las neuronas que sintetizan 5-HT se restringe al núcleo del rafé del tallo cerebral, específicamente 9 áreas designadas como B1 a B9. Las proyecciones axonales de las neuronas serotoninérgicas se encuentran ampliamente distribuidas en la mayoría de las regiones del SNC, (B5-B9, cerebro anterior, tálamo, hipotálamo, estriado, corteza, cerebelo y tallo cerebral; B1-B4, médula espinal, bulbo raquídeo, cerebro medio y cerebelo) (Marston et al., 2011).

La 5-HT se encuentra involucrada en múltiples procesos fisiológicos y conductuales. Por ejemplo, la 5-HT periférica participa en la agregación plaquetaria, tono vascular, hipertensión y motilidad intestinal. En contraste, a nivel central se le asocia con la regulación de la temperatura, ritmos de sueño-vigilia, emesis, conducta sexual, agresión, nocicepción, regulación del estado de ánimo, conducta alimentaria y balance energético (Berger, Gray & Roth, 2009; Jonnakuty & Gragnoli, 2008; Lam et al., 2008; Tecott, 2007).

La 5-HT central está asociada con la homeostasis energética, la regulación de la ingesta de alimento y el peso corporal, además es considerada un potente agente anorexigénico que promueve la saciedad. El hipotálamo juega un papel importante en este sistema, las neuronas serotoninérgicas originadas en el núcleo del rafé dorsal (B7) y mediano (B8) proyectan al NPH y al núcleo supraóptico (SON), además ciertos subtipos de receptores serotoninérgicos se encuentran localizados en estas regiones. Existe evidencia que muestra que los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C} y 5-HT₆ están relacionados directamente en los mecanismos del control alimentario. En estudios autorradiográficos realizados en rebanadas de cerebro de rata se han encontrado densas concentraciones del receptor 5-HT_{1B} en el núcleo supraóptico, el NPH, el núcleo retroquiasmático y el ARC (Pazos & Palacios, 1985). Con respecto a los receptores 5-HT_{1A}, éstos se han observado tanto en neuronas magnocelulares como parvocelulares del NPH (Collin et al., 2002). Altas densidades de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2C} se encuentran presentes en las neuronas magnocelulares del NPH (Makarenko et al., 2002, 2003;

Zhang et al., 2002). La inervación directa del sistema serotoninérgico y la expresión de los receptores 5-HT en el NPH, indican que la 5-HT puede mediar respuestas endocrinas. Se ha establecido que la activación de los receptores serotoninérgicos en el NPH produce un efecto inhibitorio sobre la ingesta de alimento (Mancilla-Díaz, et al., 2002; López-Alonso et al., 2007). Además, los agentes farmacológicos que incrementan la actividad de 5-HT (sibutramina, fluoxetina, D-fenfluramina) en el SNC reducen la ingesta de alimento e incrementan el gasto energético (Leibowitz & Alexander, 1998). Por otra parte, el bloqueo de la síntesis de serotonina (utilizando paraclorofenilalanina [pCPA], o la destrucción de neuronas serotoninérgicas con la neurotoxina 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DT), resultan en un incremento de la ingesta de alimento (hiperfagia) (Le Feuvre, Aisenthal & Rothwell, 1991; Waldbilling et al., 1981).

Con respecto al sistema de los endocannabinoides, se ha reportado que las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe Dorsal y Mediano que inervan al NPH, expresan la proteína y el ARNm que codifica para el CB1R (Häring et al., 2007). Asimismo, en experimentos *in vitro* e *in vivo* se ha observado que en ciertas regiones cerebrales como la corteza prefrontal y el hipocampo, la activación de los CB1R disminuye la liberación de 5-HT (Nakazi, et al., 2000; Egashira et al., 2002), en tanto que el bloqueo de los CB1R incrementa los niveles extracelulares de 5-HT en la corteza prefrontal medial y el núcleo accumbens de la rata. Estos hallazgos nos revelan la importancia de la 5-HT en la regulación de la alimentación y la posible participación de los CB1R en la modulación del sistema serotoninérgico.

2.3.2 Relación GABA-canabinoides-alimentación

GABA, principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central y el más abundante de los neurotransmisores, se sabe que también juega un papel importante en el control alimentario. Este es sintetizado en neuronas de varios núcleos hipotalámicos y extrahipotalámicos, los cuales contribuyen con el control de la conducta alimentaria (Kalra et al., 1999). El GABA ha sido descrito como un neurotransmisor que puede inducir efectos orexigénicos a través de la activación tanto de receptores GABA_A como GABA_B. La administración intra-NPH de muscimol, agonista del receptor GABA_A, induce un incremento en la ingesta de alimento. (Gradison & Guidotti, 1977; Kelly & Grossman, 1980; Kelly, Alheid, Newberg & Grossman, 1977, Kelly, Rothstein & Grossman, 1979; Morley, Levine, & Kneip, 1981; Tsujii & Bray, 1991; Arnt & Scheel-Kruger, 1979; Stratford & Kelley, 1997), dicho efecto es bloqueado por el antagonista selectivo del receptor GABA_A, bicuculina (Tsujii & Bray, 1991; Stratford & Kelley, 1997). De la misma forma, la activación del receptor GABA_B mediante la administración sistémica e intracerebroventricular (i.c.v.) de su agonista, baclofén, causa un incremento en la ingesta de alimento y dicho efecto estimulador es prevenido por su antagonista faclofen (Ebenezer & Baldwin, 1990). Se ha reportado que cierta población de neuronas que sintetizan NPY en el ARC también sintetiza GABA (Horvath et al., 1997). Con respecto a los CB1R, estudios previos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que la activación de los receptores CB1 en otras regiones cerebrales como el globo pálido, estimula la liberación de GABA y dicho efecto estimulador es prevenido por el antagonista AM 251 (González et al., 2009). Por otra parte, en estudios electrofisiológicos la actividad de algunas terminales GABAérgicas también puede ser modulada por receptores serotoninérgicos de la familia 5-HT₁ (Bramley et al., 2005; Lee et al., 2008).

2.4 Herramienta metodológica para la evaluación de la conducta alimentaria Secuencia de Sacidad Conductual (SSC)

Desde el punto de vista de la farmacología de la alimentación, está bien documentada la existencia de una gran variedad de fármacos que modifican la conducta de alimentación, la forma de acción más conocida hasta el momento, es la que tiene que ver con la utilización de fármacos que suprimen la ingesta de alimento.

Un aspecto importante que no todas las investigaciones consideran y que está relacionado con la supresión de la ingesta de alimento debida a la administración de un fármaco, es que un animal puede dejar de comer por varias razones que pueden o no estar relacionadas necesariamente con el hambre. Por ejemplo, existen fármacos que actúan inhibiendo conductas motoras, otros que producen somnolencia o contrariamente un estado de actividad exagerado, generando así situaciones que son incompatibles con las conductas relacionadas con la alimentación como son el acercarse al alimento y llevárselo a la boca. Por lo tanto, la sola interpretación de datos que han resultado estadísticamente significativos acerca de los gramos de alimento consumido por un animal al que se le ha administrado un fármaco puede llevar a conclusiones parciales o incluso erróneas.

Con base a lo anterior, es recomendable que las investigaciones en el campo de la farmacología de la alimentación utilicen metodologías y herramientas que permitan conocer no solo la cantidad de alimento consumido sino que también consideren el “flujo conductual”, el cual incluye las características cualitativas de la conducta de alimentarse como la duración y frecuencia de conductas particulares (sujetar el alimento, morderlo, caminar, husmear, acercarse de nuevo a la comida, etc.). De esta forma se consideran las conductas que preceden y que suceden a cada período de alimentación, solo así se puede entender que cuando un animal deja de comer debido a la acción de un

fármaco, no solo se debe a que “no tiene hambre”, sino porque existe una estructura de la conducta de alimentación que puede estar sufriendo cambios que se reflejan sobre el consumo de alimento.

De esta manera, el análisis de la secuencia de saciedad conductual (SSC) se presenta como una herramienta que puede ser de gran utilidad para evaluar la acción hipofágica de los fármacos sobre la conducta de alimentación; ya que SSC puede contribuir a aclarar si la hipofagia inducida por un fármaco se debe al desarrollo de la saciedad o a reacciones colaterales adversas como náusea, sedación, hiperactividad y/o paladeabilidad del alimento (McGuirk, Muscat & Willner, 1992; Gao, Harvey, Mook & Zeigler, 1998; Halford, Wanninayake & Blundell, 1998; Vickers, Clifton, Dourish & Tecott, 1999; López-Alonso, Mancilla-Díaz, Rito-Domingo, Gonzalez-Hernandez & Escartin-Pérez, 2007).

La SSC se define como la transición ordenada del alimento, el acicalamiento, la actividad y el descanso medidos durante el período post-ingestivo (Halford, Wanninayake & Blundell, 1998).

3. Planteamiento del problema

Una conducta es el resultado de la actividad de circuitos neuronales, de los neurotransmisores que estos usan y del balance de señales que estimulan e inhiben la actividad de estos circuitos y provienen del ambiente y variables homeostáticas. Esto sugiere una alta complejidad de los procesos conductuales, y para entenderlo se requiere de abordajes experimentales en los que se manipulen núcleos, neurotransmisores o señales específicas, con el objeto de entender el papel de cada uno de ellos en el proceso conductual a estudiar.

De acuerdo con lo anterior, la participación del sistema endocanabinoide en la conducta alimentaria no sólo dependería de un grupo neuronal o núcleo, sino también de sus interacciones con otros sistemas de neurotransmisión o modulación y las señales que estos procesan. El efecto de los endocannabinoides en otros procesos conductuales sigue esta regla, particularmente en cuanto a su interacción con el sistema serotoninérgico; por ejemplo, Egashira et al., (2008) mostró que la inmovilidad producida por el Δ^9 -tetrahydrocannabinol en un modelo de nado forzado es mediada por la actividad de receptores a la 5-HT del subtipo 5-HT_{1A}. De igual manera, Rodríguez-Gaztelumendi et al (2009) encontraron que el aumento del tono serotoninérgico inducido por un inhibidor de la recaptura de 5-HT (fluoxetina) provoca una alteración en la señalización de receptores a cannabinoides tipo CB1 que median respuestas antidepresivas. Asimismo, Palazzo et al., (2006) reportaron en un modelo de dolor neuropático que los niveles de endocannabinoides se encuentran elevados en el núcleo del rafé, participando probablemente en el control de la analgesia mediada por la 5-HT que es el mediador químico de estas neuronas.

La relación del sistema de endocannabinoides con el sistema serotoninérgico no solo ha sido mostrada a nivel conductual sino también, como ya se ha mencionado (Palazzo et al., 2006), a nivel de los procesos de señalización del receptor CB1 por la 5-HT. En la amígdala por ejemplo se ha mostrado que los

receptores a cannabinoides modulan la liberación de 5-HT especulándose su participación en la disforia producida por la intoxicación con cannabis sativa. Por otra parte, se ha demostrado que el antagonista de los CB1R, Rimonabant, produce efectos antidepresivos similares a los inducidos por la fluoxetina (inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT) (Griebel, Stemmelin & Scatton, 2005). Así mismo se ha mostrado que la activación de los receptores 5-HT₂ estimula la formación de endocannabinoides que, de manera retrograda, inhiben la liberación de glutamato (Best & Reghr, 2008). De todos estos estudios se puede inferir una estrecha relación entre los sistemas endocanabinoide y serotoninérgico que participa en diversos procesos conductuales con una base neuroquímica.

Los receptores a cannabinoides del tipo CB1 modulan la ingesta de alimento probablemente a nivel del NPH, que es un núcleo donde estos se expresan a nivel presináptico, (Herkenham et al., 1991 con respecto de otros núcleos hipotalámicos y que está relacionado con la ingesta de alimento. El ARNm del receptor CB1 se encuentra en las neuronas del núcleo del rafé (Håring et al., 2007), el cual envía proyecciones al NPH, lo que sugiere un posible papel de los CB1R en el control de 5-HT. También es conocido que los diferentes subtipos de receptores a la 5-HT se localizan en este núcleo, y que algunos de ellos como el 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT₂ participan en la regulación de la alimentación, ya que al ser manipulados localmente se modifica la ingesta de alimento. En este trabajo nos propusimos esclarecer el papel de los CB1R en el control de la ingesta de alimento, particularmente a nivel del NPH, y la posible interacción de éstos con el sistema serotoninérgico y sus receptores. Dado que los receptores a serotonina 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} modulan la actividad GABAérgica en otras regiones del cerebro (Kishimoto, Koyama & Akaike, 2001; Bramley et al., 2005; Lee et al., 2008), también estudiamos si los efectos de los CB1R y 5-HT depende de modular al sistema GABAérgico.

4. Hipótesis

La activación de los receptores CB1 del NPH inhibe la liberación de [³H]-5-HT e indirectamente estimula la liberación de [³H]-GABA.

La hiperfagia inducida por la activación de los receptores CB1 se caracteriza por estimular específicamente la ingestión de carbohidratos y por inducir nuevos episodios alimentarios en animales saciados.

La activación y bloqueo de los receptores serotoninérgicos y GABAérgicos respectivamente previene la hiperfagia inducida por la activación de los receptores CB1 en el NPH a través de una desinhibición de la secuencia de saciedad conductual.

5. Objetivos

General

Proponer un mecanismo neuroquímico que explique los efectos de la activación de los receptores CB1 sobre la conducta alimentaria por medio de la modulación de la liberación de serotonina y GABA en el núcleo paraventricular hipotalámico, así como caracterizar en términos de selección de nutrientes y la secuencia de saciedad conductual el efecto hiperfágico de la activación de los receptores a canabinoides CB1.

Específicos

Evaluar *in vitro* los efectos de la activación de los CB1R sobre la liberación de 5-HT y GABA en el NPH mediante la técnica de liberación de NT marcados radioactivamente.

Estudiar *in vivo* los efectos de la activación de los receptores CB1 sobre la preferencia de nutrientes y la secuencia de saciedad conductual.

Determinar si la hiperfagia inducida por la activación de los CB1R es prevenida por la activación de receptores serotoninérgicos en el NPH.

Determinar si la hiperfagia inducida por la activación de los CB1R es prevenida por el bloqueo de los receptores GABAérgicos en el NPH.

6. Método

Sujetos experimentales

Se emplearon ratas Macho de la cepa Wistar de 200-220 g al inicio de la investigación (para el caso de la técnica de liberación de neurotransmisores) y de 200-240 g (para conducta alimentaria). Los animales fueron mantenidos en cajas habitación individuales en el cuarto de experimentación a 21 ± 2 °C con el ciclo de luz/oscuridad de 12x12 horas invertido (las luces se apagaban a las 07.00 h). Todos los procedimientos experimentales se realizaron de conformidad con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y la Guía para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud, y fueron aprobados por los Comités Institucionales de Cuidado Animal del CINVESTAV.

Fármacos

ACEA [N-(2-Chloroethyl)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamida] (agonista CB1), AM251 [1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H-pirazol-3-carboxamida (antagonista CB1), CP 93129 [1,4-dihidro-3-(1,2,3,6-tetrahidro-4-piridinil)-5H-pirrol[3,2b]piridin-5-dihidroclorado (agonista 5-HT_{1B}), SB 224289 (antagonista 5-HT_{1B}) (Tocris Bioscience, St. Louis MO, USA); 8-OH-DPAT [(R)-(+)-8-hidroxi-2-(dipropilamino)tretalin hidrobromado] (agonista 5-HT_{1A/7}); DOI [(±)-1-(2,5-Dimetoxi-4-yodofenil-2-aminopropano hidrociorado)] (agonista 5-HT_{2A/2C}), WAY 100635 (antagonista 5-HT_{1A}), ciproheptadina [4-(5H-Dibenzo[a,d]ciclohepten-5-ilidina)-metilpiperidina hidrociorada] (antagonista 5-HT₂), Bicuculina (antagonista GABA_A) (Sigma-Aldrich, USA). Fluoxetina (inhibidor de la captura de serotonina), Pargilina [N-metil-N-2-propinilbenzilamida, HCl] [inhibidor del metabolismo de la 5-HT; inhibidor de la monoaminoxidasa (MAO)], Metabisulfito de Sodio (Na₂S₂O₅; inhibidor de la oxidación de la 5-HT).

Para los experimentos conductuales el ACEA se adquirió en una solución con etanol (5mg/ml) por lo que para la preparación se tuvo que resuspender en dimetilsulfoxido (DMSO), se sonicó y posteriormente agregó Nitrógeno líquido para la evaporación de etanol. La solución obtenida libre de alcohol, se diluyó con solución salina al 0.9% para posteriormente realizar la inyección. El AM 251 se disolvió en DMSO y posteriormente se diluyó en solución salina al 0.9% (DMSO 5%).

Cirugía

Sujetos anestesiados con la administración de Ketamina/Xilacina vía ip. (112.5 mg/kg y 22.5 mg/kg respectivamente) fueron estereotáxicamente implantados con cánulas de inyección en el área suprayacente del NPH del lado derecho. Las cánulas se fijaron al cráneo mediante tornillos de acero y cemento acrílico. Las coordenadas estereotáxicas fueron (relativo a bregma): Antero-posterior (AP) -0.11, latero-medial (LM) -0.045, dorso-ventral (DV) -0.65 (Paxinos & Watson, 1998). Los animales tuvieron un período de 5 días de recuperación de la cirugía.

Dieta

Administración sistémica

Los animales fueron habituados a la presentación diaria (5 días) de alimento estándar, posteriormente fueron entrenadas (3 días) con un programa de restricción alimentaria y a la presentación de tres diferentes tipos de fuentes de nutrientes por separado: proteínas (SUPRO 550E aislado de proteínas de Soya al 95%; Protein Technologies Internacional, St. Louis, MO), carbohidratos (harina de maíz nixtamalizado MASECA, Molinos Azteca de Chalco, México) y grasas (manteca vegetal Inca, Anderson Clayton y col., México). La ubicación de los alimentos se cambió diariamente para prevenir las preferencias de posición.

Administración intra-NPH

Los animales fueron habituados a la presentación diaria (4 días) de alimento estándar (LabDiet® formulab diet #5008, % de calorías provistas: Proteína 26.849%; Grasa 16.710 %; Carbohidratos 56.441 %). Durante los registros (2 de 1 hora cada uno) se pesó al principio y al final de cada hora para determinar la cantidad consumida.

Programa de alimentación restringida

Para evaluar los efectos de los tratamientos sobre la conducta alimentaria en condiciones de ingesta basal alta (alimento estándar), los animales fueron habituados durante 4 días a un paradigma de acceso restringido al alimento (2 horas al día, durante el inicio de la fase oscura), con agua *ad libitum* en la caja habitación. Lo anterior tuvo la finalidad de habitar a las ratas a comer sólo en los horarios de la presentación del alimento y poder evaluar el efecto de los tratamientos farmacológicos en el NPH sobre la ingesta de alimento y la saciedad. El quinto día se suspendió la restricción de alimento, para posteriormente implantar estereotáxicamente las cánulas de inyección (sexto día). Una vez transcurrido el periodo de recuperación operatoria (con alimento y agua *ad libitum*), los sujetos fueron nuevamente expuestos al programa de restricción alimentaria durante 3 días, mismos en los que se simularon las inyecciones, para que en el día 4 fueran administrados intrahipotalámicamente los tratamientos especificados en el diseño. Los animales que no se adaptaron al programa de alimentación (consumo total durante las 2 horas menor al 80% del promedio de todos los sujetos) fueron excluidos de las sesiones experimentales.

Para los experimentos de la administración sistémica, los animales fueron entrenados (3 días) con un programa de restricción alimentaria (2 horas al día, durante la fase de la oscuridad), teniendo acceso a tres diferentes dietas: carbohidratos, lípidos y proteínas que se presentaron en comederos individuales

Registros conductuales

Ingesta de alimento.

Para el caso de las administraciones sistémicas, estas se realizaron posterior a las 2 horas del acceso al alimento (dieta de carbohidratos, lípidos y proteína) en la fase de oscuridad del ciclo de luz, el alimento pesado previamente fue colocado en las cajas habitación y se realizó un registro (una hora). El consumo de alimento (g) se determinó en el periodo de tiempo de 60 min después del acceso a las diferentes dietas.

Entre 10 y 15 minutos antes del inicio de la fase oscura del ciclo de luz fueron aplicadas las inyecciones intrahipotalámicas. El alimento pesado previamente fue colocado en las cajas habitación al inicio de la fase oscura del ciclo de luz y se realizaron dos registros de ingesta de alimento (una hora cada uno). El consumo de alimento (g) se determinó en los dos periodos de tiempo, 60 y 120 min después del acceso a la dieta estándar de laboratorio (hora 1 y hora 2). En la sección de los resultados esto se presenta en términos de medias \pm el error estándar de la media (EEM).

Secuencia de saciedad conductual (SSC)

Simultáneamente a la determinación de la ingesta de alimento, se realizaron videograbaciones de los animales para llevar a cabo el análisis de la secuencia de saciedad conductual. A partir de las grabaciones se realizó un registro de duración de 60 minutos para la administración sistémica y de 2 registros de duración continua de 60 minutos cada uno (cada hora se dividió a su vez en 12 periodos de 5 min) para la administración en el NPH, donde se midieron las duraciones (s) de cinco categorías conductuales mutuamente excluyentes: alimentación (consumo de cualquier tipo de alimento), ingestión de agua, actividad (locomoción, levantamiento en dos patas), acicalamiento y descanso (inmovilidad con la cabeza del animal en el piso de la caja, con o sin ojos abiertos). Dado que no se encontraron diferencias significativas en las categorías conductuales de beber, acicalamiento y actividad entre los grupos experimentales, se sumaron todas las actividades de cada grupo

presentándose como actividad no alimentaria. Los resultados de la SSC se presentaron en términos de duraciones por periodo (gráficas de SSC) y como área bajo la curva (ABC).

Diseño experimental

Administración sistémica

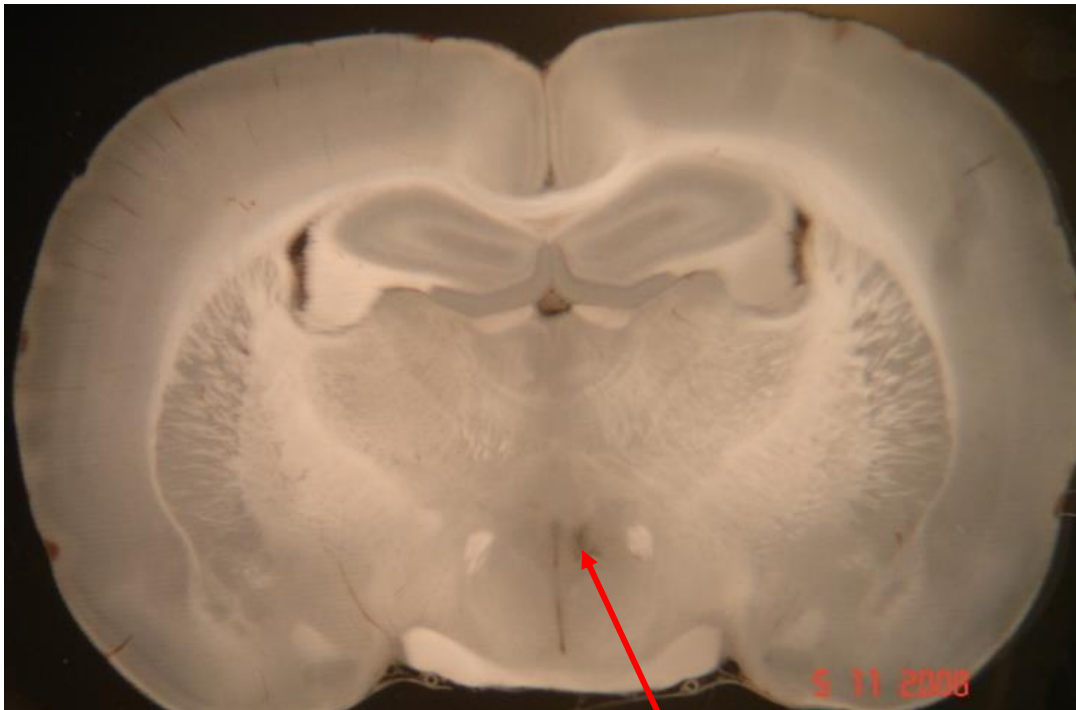
Para las evaluaciones conductuales (ingesta de alimento y análisis de secuencia de saciedad conductual), posterior al entrenamiento los animales fueron aleatoriamente asignados a grupos independientes y recibieron tratamientos sistémicos agudos con vehículo, ACEA (0.5 mg/kg) o de AM 251 (0.05 Y 0.25 mg/kg). Los fármacos se aplicaron intra-peritonealmente al final del periodo de alimentación (2 horas) y se les dio nuevamente acceso al alimento durante 60 minutos, periodo durante el cual la conducta alimentaria fue evaluada, midiendo la ingesta de alimento (dieta de proteínas, carbohidratos y grasa en comedores separados) en gramos y la SSC.

Administración intra-NPH

Para las evaluaciones conductuales (ingesta de alimento y análisis de la secuencia de saciedad conductual), los animales canulados en el NPH fueron asignados aleatoriamente a grupos independientes y recibieron inyecciones (directamente en el NPH) de vehículo (grupo VH, n=6), ACEA 0.25 µg (agonista CB1R; n=7), de 5-HT 2.0 µg + ACEA 0.25 µg (n=4), 5-HT 2.0 µg (agonista serotoninérgico, n=5), 8-OHDPAT 0.1 µg (agonista 5-HT_{1A}; n=5), 8OHDPAT + ACEA (n=5), CP 93129 0.18 µg (agonista 5-HT_{1B}; n=5), CP 93129 + ACEA (n=4), DOI 0.1 µg (agonista 5-HT_{2A/2C}; n=4), DOI + ACEA (n=5), bicuculina 0.20 µg (agonista GABAA; n=4), bicuculina + ACEA (n=5). Todas las inyecciones fueron aplicadas en un volumen de 0.5 µl a un flujo de 0.25 µl por minuto (0.25 µl/minuto en 3 minutos).

Histología

Al final de las sesiones experimentales, los animales que recibieron inyecciones intrahipotalámicas fueron sacrificados, los cerebros se removieron y permanecieron en la solución fijadora (formaldehído en solución al 10%) durante tres días para su óptima fijación. Cortes coronales de 160 μm se realizaron para verificar que el sitio de inyección haya correspondido al NPH.



Sitio de inyección en
el NPH

Estudios de liberación de [³H]-GABA/ [³H]-5-HT

Soluciones

Krebs-Henseleit Normal: NaCl (124.5 mM), KCl (3 mM), MgSO₄ (1 mM), KH₂PO₄ (1.2 mM), CaCl₂ (1.8 mM), NaHCO₃ (16.5 mM), Glucosa (11 mM) a un pH de 7.4.

Krebs-Henseleit alto potasio: NaCl (107.5 mM), KCl (15 mM), MgSO₄ (1 mM), KH₂PO₄ (1.2 mM), CaCl₂ (1.8 mM), NaHCO₃ (16.5 mM), Glucosa (11 mM) a un pH de 7.4.

Experimento de liberación de neurotransmisores con marca radioactiva

Se llevaron a cabo estudios de liberación de [³H]-GABA y [³H]-5-HT en rebanadas del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPH) de ratas. Los experimentos de liberación se llevaron a cabo de acuerdo a un método adaptado de Raiteri y Levi (1974), el cual es descrito a detalle por Mitchell y Doggett (1980).

Obtención de rebanadas

Grupos independientes de ratas fueron sacrificados mediante dislocación cervical, posteriormente decapitadas e inmediatamente removidos sus cerebros, los cuales fueron fijados en una caja petri (colocada en un vibrátomo [CAMPDEN instrumens ltd, USA]), a la cual se le agregó solución Krebs-Henseleit normal fría (4° C) para la obtención de cortes coronales de 300 μm de espesor, de estas rebanadas se diseccionó el NPH bajo microscopio (UNITRON ZSB, Japón). Las rebanadas obtenidas se colectaron en un tubo de ensayo conteniendo solución Krebs-Henseleit normal. Posteriormente, con el fin de estabilizarlas, estas rebanadas se colocaron en solución fisiológica Krebs-Henseleit a 37° C con burbujeo constante de una mezcla de O₂/CO₂ (95/5%), estas condiciones se mantuvieron durante 20 minutos.

Incubación con la marca radioactiva

Una vez transcurrido el periodo de estabilización, las rebanadas se resuspendieron en solución fisiológica adicionada con [³H]-GABA (10 µL) a una concentración de 200 nM (actividad específica 50 Ci/mmol) durante 30 minutos. Posteriormente las rebanadas se lavaron tres veces con solución Krebs-Henseleit en presencia de ácido nipecótico, para bloquear de forma selectiva la captura de GABA, con el fin de retirar el exceso de [³H]-GABA que no fue captado por el tejido.

Desarrollo experimental

Las rebanadas del NPH fueron transferidas a cámaras de perfusión acopladas a un colector de fracciones, donde se trataron con los fármacos a evaluar en cada condición experimental. Las cámaras se perfundieron de forma constante con solución fisiológica a 37° C con burbujeo constante, a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Después de un periodo de estabilización y lavado de 20 minutos, se colectaron 4 fracciones de 4 minutos de liberación basal y posteriormente se aplicó un pulso despolarizante de K⁺ para inducir la despolarización de las terminales, se elevó la concentración de K⁺ de 3 mM a 15 mM durante 24 minutos (6 fracciones más). Al despolarizar las terminales se aumentó la probabilidad de apertura, y por lo tanto, la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, de esta forma se promovió el influjo de Ca²⁺ al interior de las terminales, lo cual produjo la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana y la liberación del neurotransmisor por exocitosis.

La velocidad de flujo (0.5 ml/min) a la que se perfundieron los fármacos eliminó la recaptura del neurotransmisor liberado (Mitchell y Doggett, 1981), esto permitió que se observaran únicamente los efectos de los fármacos sobre la liberación y no posibles efectos sobre la recaptura.

Los fármacos del estudio se perfundieron dos fracciones antes del pulso despolarizante de K⁺ y durante la duración del mismo, en los grupos indicados.

En cada experimento se corrieron 12 muestras en paralelo, para cada caso experimental se realizaron cuando menos tres experimentos, con tres réplicas para cada uno.

Al término de cada experimento, las rebanadas se extrajeron de las cámaras de perfusión y se les adicionó 1 ml de HCl 0.1 N, con el fin de solubilizar la membrana y cuantificar la radiactividad remanente en el tejido.

Cuantificación de la liberación de [³H]-GABA.

Para cuantificar la radiactividad, se adicionaron 12 ml de líquido de centelleo a cada una de las fracciones colectadas. La radiactividad se determinó mediante un contador de centelleo. Los resultados fueron expresados como liberación fraccional, la cual se obtuvo de la siguiente relación: $F.R. = R.P.F./R.P.T.$

Dónde:

F.R. es la fracción de liberación, calculada mediante la división de la radioactividad presente por fracción (R.P.F), sobre la radioactividad total remanente en el tejido (R.P.T). La F.R. se expresó en las gráficas como el cociente de la fracción "X", entre la fracción 4 (fracción anterior inmediata al pulso de K⁺), esto se realizó para normalizar la fracción de liberación de cada curva por encima de la basal.

Se colectaron las muestras y la marca radioactiva se cuantificó por centellometría líquida, calculando la fracción de liberación como el cociente de la cantidad de radioactividad contenida en una muestra, dividida entre la radioactividad del tejido al momento de tomar dicha muestra. La cantidad de [³H]-GABA se expresó como el área relativa, de las curvas de liberación fraccional.

Liberación de [³H]-5-HT

Con grupos independientes de ratas se obtuvo el tejido correspondiente al NPH) y se incubó durante 30 minutos con [³H]-5-HT (10 µL) (500 nM, actividad

específica 15-30 Ci/mmol) y posteriormente se colocó en cámaras donde fue sometido a perfusión continua con solución fisiológica (Krebs-Henseleit) mediante una bomba peristáltica. A través del líquido de perfusión se aplicó un pulso despolarizante (en presencia de fluoxetina para evitar la recaptura de la 5-HT liberada, de metabisulfito de sodio y pargilina para evitar la oxidación y el metabolismo de la 5-HT respectivamente) con 30 mM de K⁺. La cantidad de [³H]-5-HT se expresó como el área relativa, de las curvas de liberación fraccional, tal como se describió anteriormente.

Diseño experimental

Para la determinación de los efectos de la activación de los CB1R sobre la liberación de [³H]-GABA inducida por 15 mM de K⁺, el tejido correspondiente al NPH (incubado con el GABA con la marca radioactiva) fue expuesto a las siguientes condiciones (cámaras de perfusión independientes, cada condición por triplicado): Control, agonista CB1 (ACEA 1 μM), antagonista CB1R + Agonista CB1R (AM 251 1μM + ACEA 1μM), antagonista (AM 251 1μM). Para evaluar si la activación de los CB1R participaba en la modulación de la liberación de [³H]-GABA por medio de la inhibición de la liberación de 5-HT, en otro grupo de experimentos se cuantificó la liberación de [³H]-GABA en presencia de ACEA (1μM), de 5-HT (1μM) o de ambos (ACEA + 5-HT en las mismas concentraciones). Posteriormente, se determinó si la activación y bloqueo de los receptores serotoninérgicos afectaba la liberación de [³H]-GABA por medio de la adición de ligandos serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, 100 nM; 5-HT_{1B}, CP 93129, 100 nM y 5-HT_{2A/2C}, DOI, 100 nM; antagonistas 5-HT_{1A}, WAY 100635, 100 nM; 5-HT_{1B}, SB 224289, 100 nM y 5-HT₂, CIPROHEPTADINA, 100 nM).

Para la determinación de los efectos de la activación de los CB1R sobre la liberación de [³H]-5-HT inducida por 30 mM de K⁺, el tejido correspondiente al NPH (incubado con la 5-HT marcada radioactivamente) fue expuesto a las siguientes condiciones (cámaras de perfusión independientes, cada condición

por triplicado): Control, agonista CB1 (ACEA 1 μ M), antagonista CB1R + Agonista CB1R (AM 251 1 μ M + ACEA 1 μ M), antagonista (AM 251 1 μ M).

Análisis estadístico

Los datos del estudio del análisis de la ingesta de alimento fueron comparados estadísticamente con un ANOVA de dos entradas (factor tratamiento, factor hora), seguida de la prueba *post hoc* de Bonferroni. En el caso del análisis de la secuencia de saciedad conductual, adicionalmente se calculó el área bajo la curva de las categorías conductuales de ingesta, descanso y actividad, comparándose cada categoría entre los diferentes grupos con ANOVAS separados. El criterio para la significancia estadística en todos los casos fue de $p < 0.05$.

Para el caso de la administración sistémica los estudios del análisis de la ingesta de alimento fueron comparados estadísticamente con un ANOVA de una vía, seguida de una prueba de post-hoc de *Tukey*, para calcular las diferencias en la selección de macronutrientes debido al tratamiento. El criterio para la significancia estadística en todos los casos fue de $p < 0.05$.

Para los experimentos de liberación se obtuvo el área bajo la curva expresada como Área Relativa (AR) para cada una de las curvas de liberación obtenidas en los experimentos, empleando el método de aproximación por trapecios usando el software GraphPad Prism. Las AR obtenidas en cada caso experimental se compararon utilizando un ANOVA de una vía, seguida de una prueba de post-hoc de *Tukey*. El criterio para la significancia estadística fue de $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1 Liberación de Neurotransmisores

7.1.1 Efecto de la activación del receptor CB₁ sobre la liberación de [³H]-5-HT

Los CB₁R están acoplados a proteínas G inhibitoras y como resultado de su activación generan la disminución de la liberación de neurotransmisores. Para evaluar si el receptor CB₁ contribuye con la modulación de la liberación de 5-HT, se utilizó el agonista selectivo de los CB₁R, ACEA (1 μM) para su activación en el NPH. De acuerdo con lo observado, la activación de los CB₁R disminuyó significativamente la liberación de 5-HT con respecto al control, ($F_{(3,8)} = 5.267$; $p < 0.05$). Este efecto inhibitor fue prevenido por el pretratamiento con el antagonista CB₁, AM 251 (1 μM), El AM 251 *per se* no indujo efecto sobre la liberación de [³H]-GABA (Fig. 16).

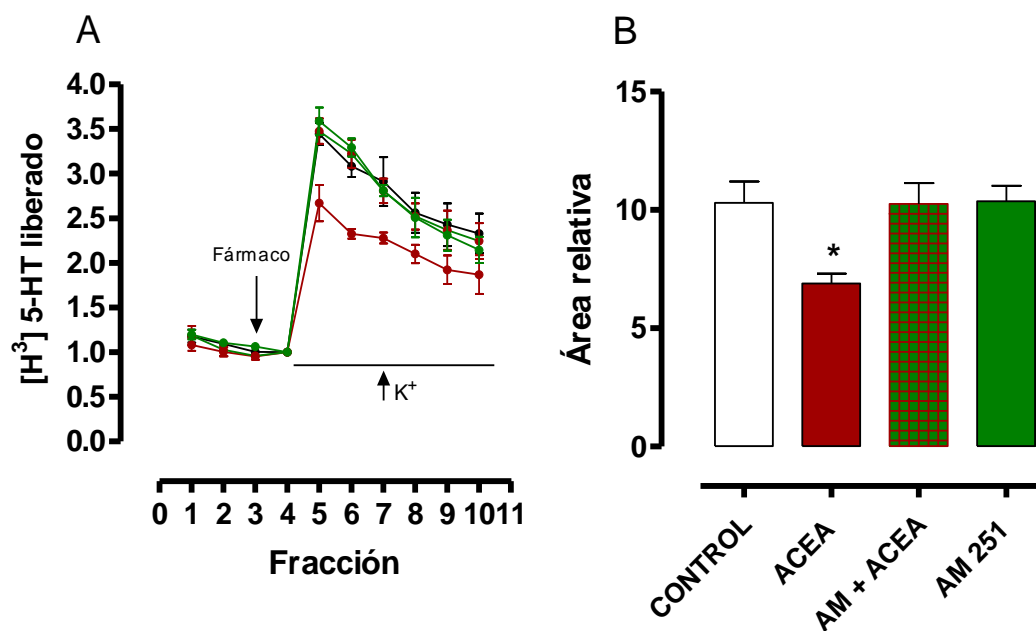


Figura 16. (A). Gráfica representativa de la curva de liberación de [³H]-5-HT estimulada por un pulso despolarizante de alto K⁺ en rebanadas del NPH de ratas. En el eje de las ordenadas se muestra la liberación de 5-HT contra las diferentes fracciones obtenidas, en la fracción 3 se adicionó el fármaco y en la fracción 5 se observó el pulso despolarizante. (B). Efectos del ACEA (agonista CB₁R [1 μM]), la coadministración de ACEA (1 μM) con AM 251 (1 μM) y AM 251 (antagonista CB₁R [1 μM]) sobre la liberación de [³H]-5-HT. El ACEA Inhibe la liberación de [³H]-5-HT y dicho efecto inhibitor es prevenido por el AM251. Datos expresados en Áreas relativas (B) del área bajo la curva de la liberación fraccional (A). n=3 experimentos, tres replicas para cada experimento. *p< 0.05.

7.1.2 Efecto de la activación del receptor CB₁ sobre la liberación de [³H]-GABA

De la misma manera se realizaron los experimentos para evaluar el efecto de los receptores CB₁ sobre la liberación de [³H]-GABA y en contraste con los resultados obtenidos sobre la liberación de [³H]-5-HT, la activación del receptor CB₁ con el agonista selectivo ACEA (1.0 μM) incrementó significativamente la liberación de [³H]-GABA ($F_{(2, 6)} = 20.61$; $p < 0.01$), efecto que fue prevenido por el pretratamiento con AM251 (1.0 μM), el antagonista AM 251 *per se* tampoco presentó diferencias significativas con respecto al control (Vehículo) (Fig. 17).

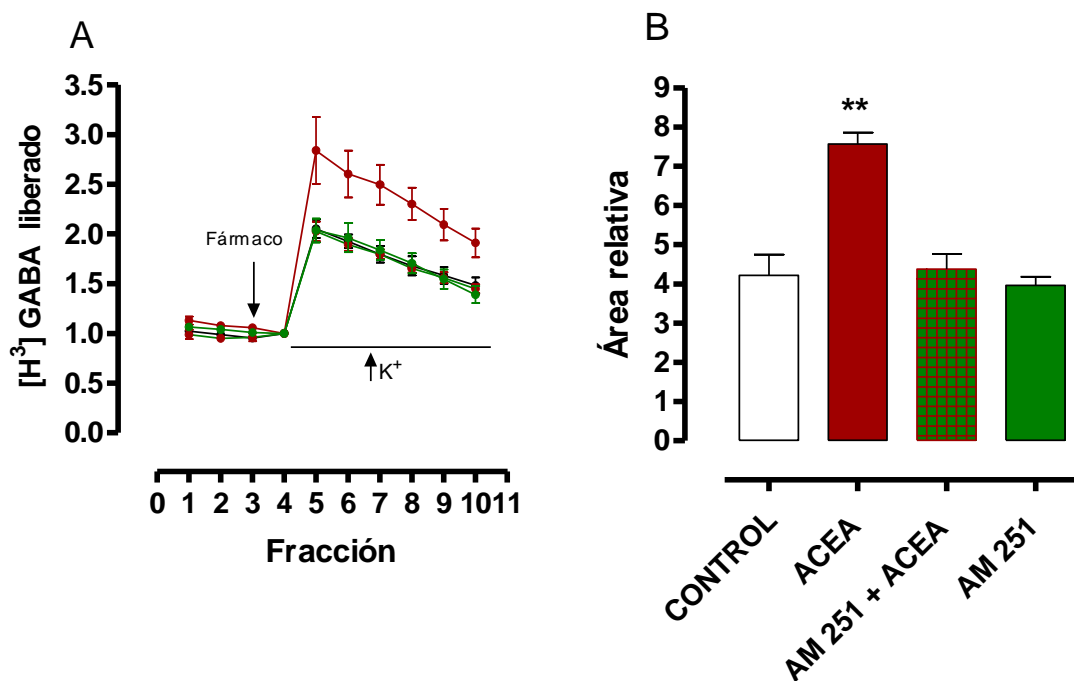


Figura 17. Gráfica representativa de la curva de liberación de [³H]-GABA estimulada por un pulso despolarizante de alto K⁺ en rebanadas del NPH de ratas. Efectos del ACEA (1 μM), la combinación de ACEA (1 μM) con AM 251 (1 μM) y AM 251 (1 μM) sobre la liberación de [³H]-GABA. El ACEA estimula la liberación de [³H]-GABA y dicho efecto estimulador es prevenido por el AM251. Datos expresados en Áreas relativas (B) del área bajo la curva de la liberación fraccional (A). n=3 experimentos, tres replicas para cada experimento. ** $p < 0.01$.

7.1.3 Efecto de la activación del receptor CB₁ con el pre-tratamiento de 5-HT sobre la liberación de [³H]-GABA

Dado que la activación de los CB1R estimuló la liberación de GABA y además estos están acoplados a proteínas Gi lo que daría un efecto opuesto al observado, es posible sugerir que sea un mecanismo indirecto, en donde los CB1R estén modulando a otro sistema de neurotransmisión y este a su vez module la liberación de GABA. Un posible candidato es la 5-HT (Lee et al., 2008), por lo tanto se evaluó la participación de la serotonina sobre la liberación de GABA a través de la activación de los CB1R. Como mostramos anteriormente la activación del receptor CB1 con el agonista selectivo ACEA (1.0 μM) incrementó significativamente la liberación de [³H]-GABA. Dicho efecto estimulador fue prevenido por el pretratamiento con 5-HT (100 nM) ($F_{(3, 7)}=6.972$; $p<0.05$), dosis que *per se* no mostró diferencia con respecto al grupo control (Fig. 18).

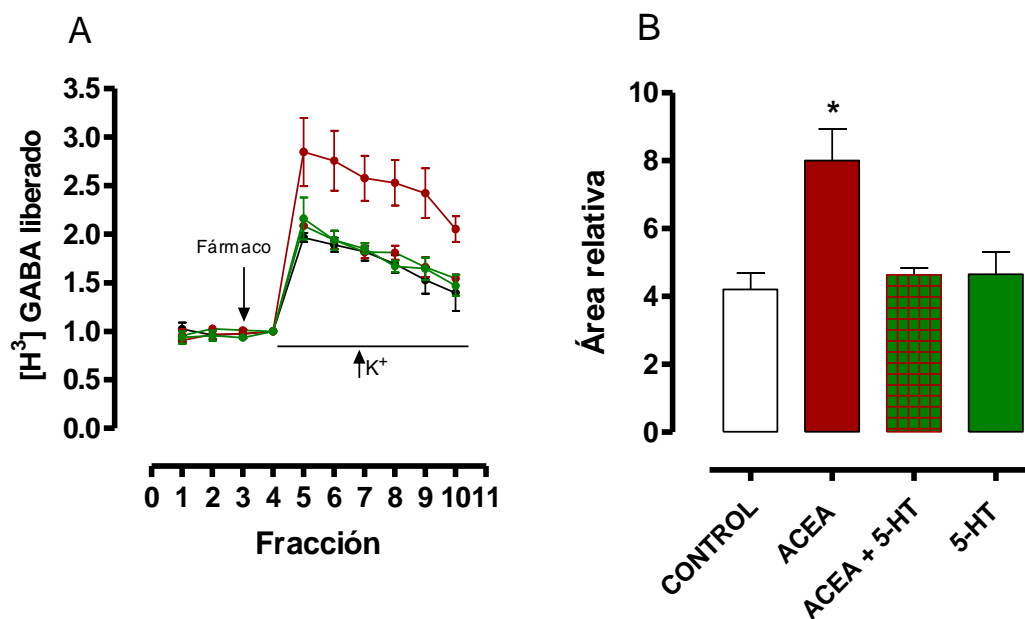


Figura 18. Gráfica representativa de la curva de liberación de [³H]-GABA estimulada por un pulso despolarizante de alto K⁺ en rebanadas del NPH de ratas. Efectos de ACEA (1 μM), en presencia de 5-HT (1 μM) sobre la liberación de [³H]-GABA. La 5-HT bloqueó la estimulación de la liberación de [³H]-GABA producida por el agonista selectivo de los receptores CB₁, ACEA (1 μM) en rebanadas del NPH. Datos expresados en Áreas relativas (B) del área bajo la curva de la liberación fraccional (A). n=4 experimentos, tres replicas para cada experimento. * $p<0.05$.

7.1.4 Efecto de la activación del receptor CB1 en presencia de agonistas del receptores serotoninérgicos sobre la liberación de [³H]-GABA

Para saber cuál es el receptor de serotonina que media el efecto sobre la liberación de GABA, se realizaron experimentos para determinar los subtipos de receptores serotoninérgicos presentes en el NPH involucrados en dicho efecto (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT₂) (Kishimoto, Koyama & Akaike, 2001; Bramley et al., 2005; Lee et al., 2008). La activación de los receptores 5-HT_{1A} con su agonista (8-OH-DPAT, 100 nM) bloqueó la estimulación de la liberación de [³H]-GABA mediada por ACEA (1.0 μM) ($F_{(3, 11)} = 6.805$; $p < 0.05$). (Fig. 19).

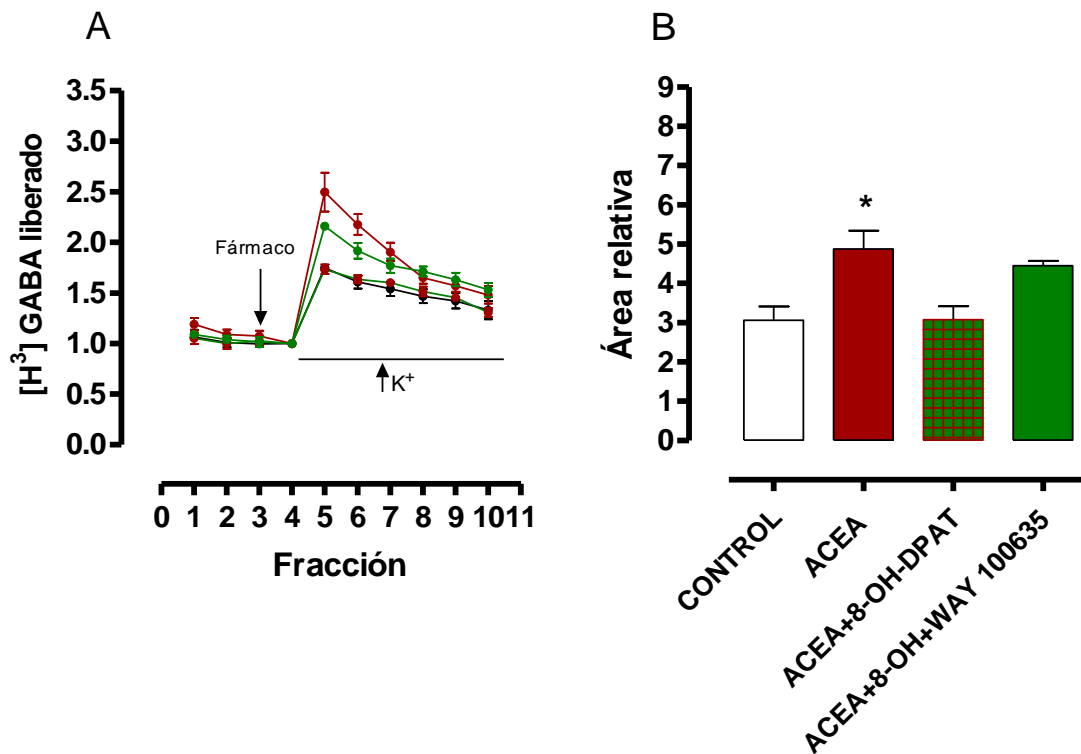


Figura 19. Efecto de la activación del CB1R con ACEA (1 μM), en presencia de 8-OH-DPAT (100 nM) sobre la liberación de [³H]-GABA en rebanadas del NPH. El agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT previno la estimulación de la liberación de [³H]-GABA inducida por ACEA en rebanadas del NPH. Datos expresados en Áreas relativas (B) del área bajo la curva de la liberación fraccional (A). n=3 experimentos, tres replicas para cada experimento. *p < 0.05.

Con respecto a la participación de los receptores 5-HT_{1B}, la estimulación de la liberación de [³H]-GABA inducida por ACEA (1.0 μM) fue prevenida por la activación de estos receptores con su agonista CP 93129 (100 nM), efecto que a su vez fue revertido por la adición de un antagonista de los receptores 5-HT_{1B} (SB 224289, 100 nM) ($F_{(3, 8)} = 7.251$; $p < 0.05$) (Fig. 20).

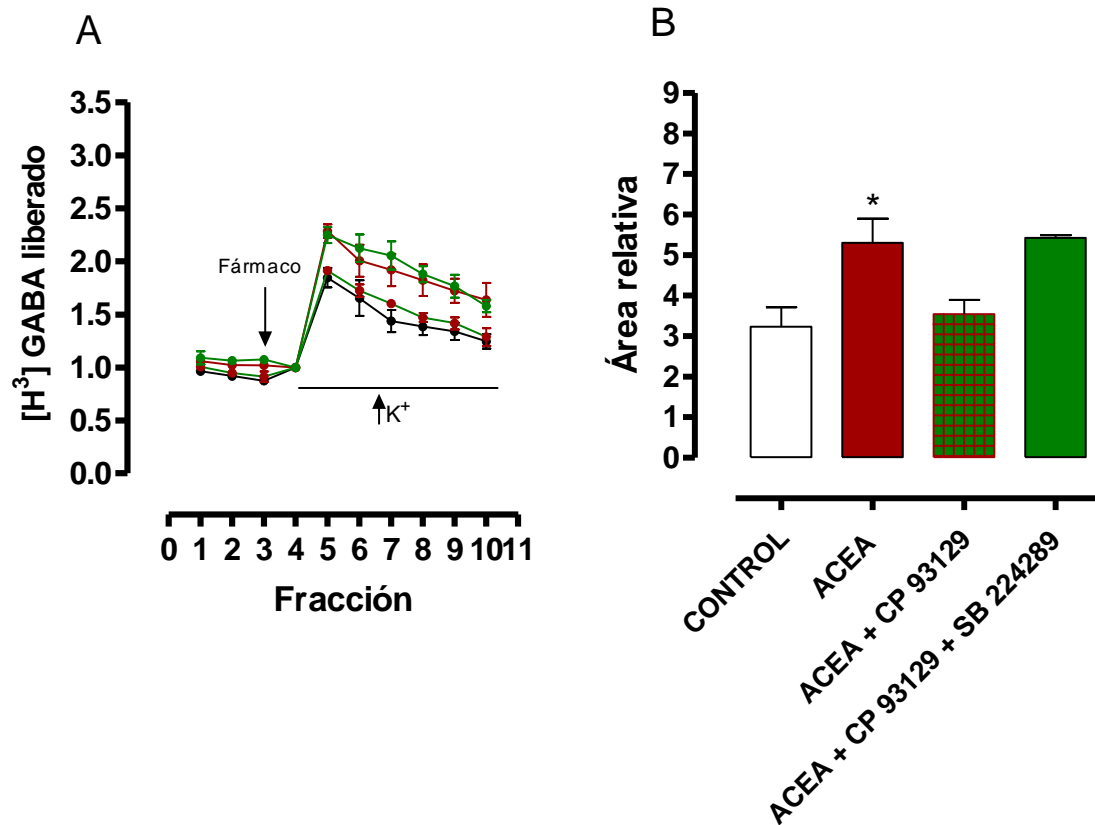


Figura 20. Efectos del ACEA (1 μM) sobre la liberación de [³H]-GABA en rebanadas del NPH en presencia de un agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1B} (CP 93129, 100 nM). El agonista 5-HT_{1B}, bloqueó la estimulación de liberación de [³H]-GABA inducida por ACEA. Datos expresados en Áreas relativas (B) del área bajo la curva de la liberación fraccional (A). n=3 experimentos, tres replicas para cada experimento. * $p < 0.05$.

La activación del receptor 5-HT₂ con su agonista DOI no previno la estimulación de la liberación de [³H]-GABA inducida por la activación de los CB1R ($F_{(3, 8)}=7.664$; ns) (Fig. 21).

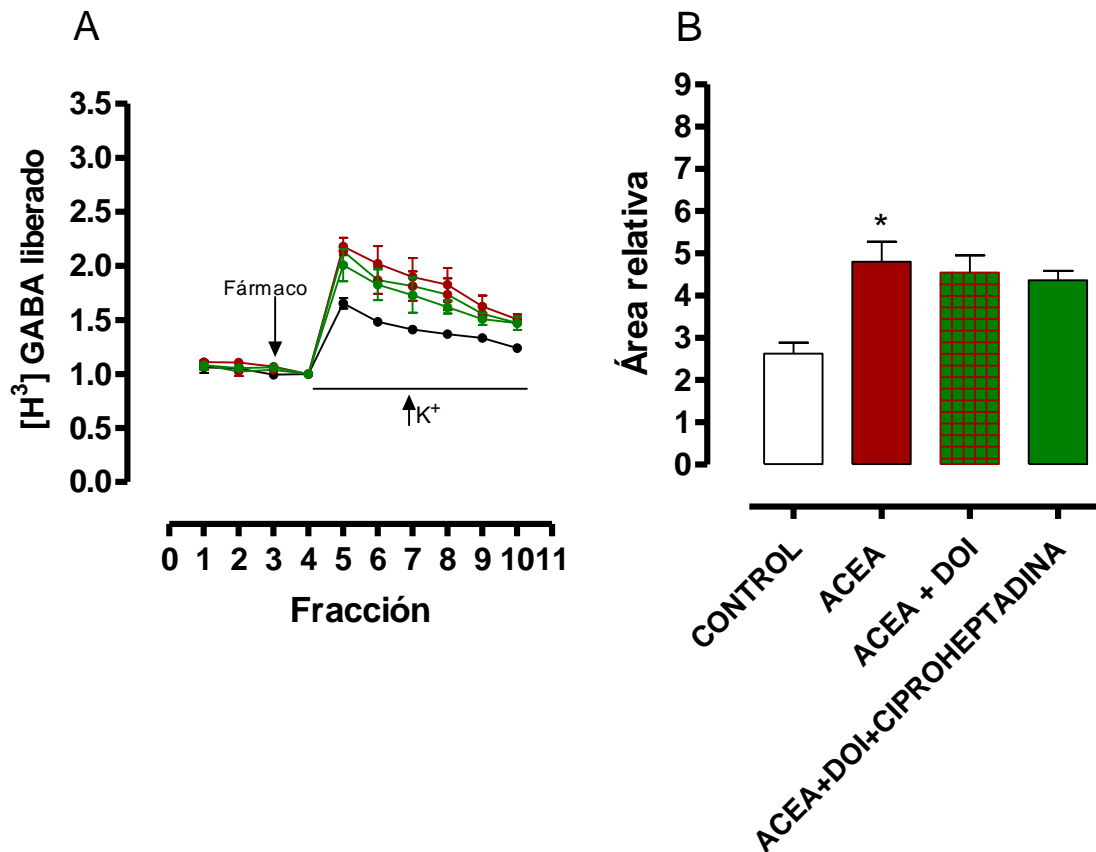


Figura 21. Efecto del ACEA (1 μ M) en presencia de DOI (100 nM) sobre la liberación de [³H]-GABA en rebanadas del NPH. El agonista de los receptores 5-HT₂ no previene el efecto estimulador de ACEA sobre la liberación de [³H]-GABA en rebanadas del NPH. Datos expresados en Áreas relativas (B) del área bajo la curva de la liberación fraccional (A). n=3 experimentos, tres replicas para cada experimento. *p< 0.05.

7.2. Conducta alimentaria

7.2.1 Ingesta de Alimento

7.2.1.1 Efecto de la administración sistémica de ACEA, sobre la selección de macronutrientes en ratas pre-saciadas y la secuencia de saciedad conductual

Se sabe que la activación de los CB1R contribuye en el control de la homeostasis energética y la ingesta de alimento, por lo tanto para asegurar la participación de estos receptores en la regulación alimentaria investigamos la participación de los CB1R a nivel sistémico y sobre la selección de macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) en ratas pre-saciadas usando el agonista selectivo el ACEA que hasta el momento no ha sido empleado para mostrar este efecto de los receptores CB1. Los resultados obtenidos muestran que la activación de los CB1R con ACEA (0.5 mg/kg) estimuló la ingesta de alimento y particularmente el consumo de carbohidratos [$F_{(4,32)}=31.5$; $p<0.0001$] con respecto a la ingesta de proteínas y lípidos, este efecto es mediado por los CB1R, ya que el pre-tratamiento con el antagonista, AM251 (0.25 mg/kg) bloqueó totalmente el efecto estimulador del ACEA sobre la ingesta de carbohidratos [$F_{(4,25)}= 5.999$; $p<0.001$; *pos hoc* Tukey $p<0.05$, 0.0 mg/kg AM 251 + 0.5 mg/kg ACEA vs 0.25 mg/kg AM 251 + 0.5 mg/kg ACEA). (Fig. 22).

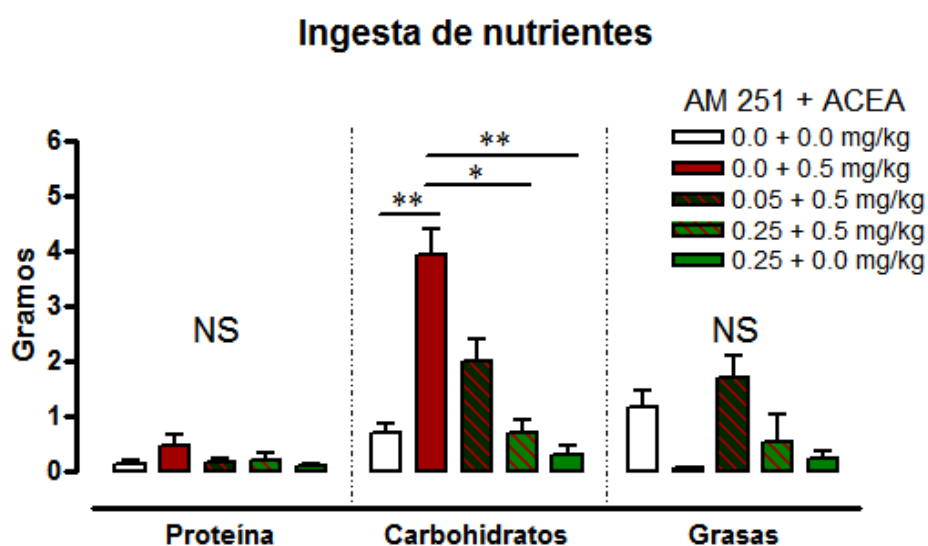


Figura 22. Efecto de la administración intraperitoneal (i.p.) de ACEA (0.5 mg/kg), VH y el pre-tratamiento i.p. con diferentes dosis de AM 251 (0.05 y 0.25 mg/kg). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, NS= no hay diferencias significativas, $n=6$ por grupo.

Secuencia de Siedad Conductual

El análisis de la SSC muestra que en el grupo control de las ratas pre-saciadas, el periodo de ingesta de alimento se encontró disminuido, observándose el periodo de descanso, lo cual refleja saciedad; ésta transición ordenada de la ingesta al descanso ocurre antes del primer periodo de los 60 minutos de observación (Fig. 23A). La administración de ACEA (0.5 mg/kg) inhibió totalmente la transición de la ingesta al descanso, la ingesta de alimento se llevó a cabo durante la hora de registro comparado con el grupo control (Fig. 23B). El pre-tratamiento con 0.25 mg/kg de AM 251 previno la inhibición de la saciedad inducida por la activación de los CB1R, la transición de la ingesta al descanso fue observada alrededor de los 22 minutos (periodo 4-5) (Fig. 23C), *per se* el antagonista AM 251 no modificó la SSC con respecto al grupo control (Fig. 23D).

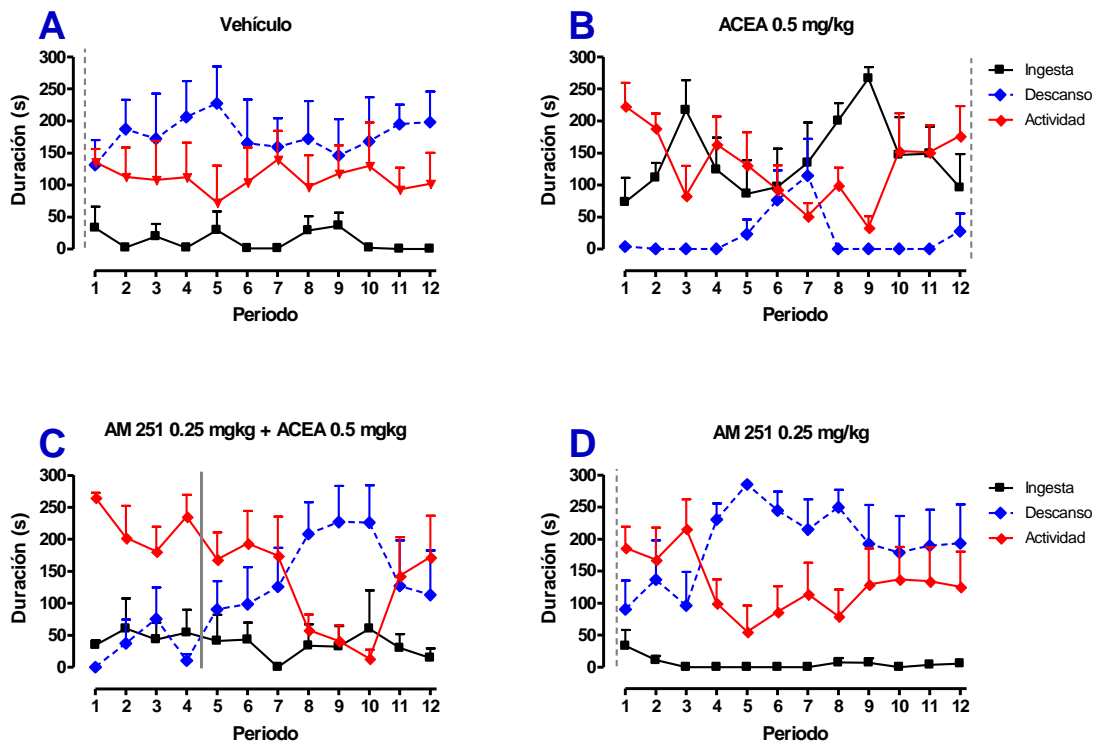


Figura 23. Duración media del tiempo que emplearon los sujetos en las categorías conductuales de ingesta (-■-), descanso (-◆-) y actividad (-▲-) en las distintas condiciones; Vehículo (A); ACEA (0.5 mg/kg) (B); AM 251 + ACEA (C); AM 251 (0.25 mg/kg) (D). El registro de 60 min (hora 1) fue dividido en periodos de 5 min cada uno. La línea vertical gris continua representa la transición de la ingesta al descanso (expresión de la saciedad), cuando es discontinua indica que la transición entre la ingesta y el descanso ocurrió antes y/o después de la hora de registro. Vh, n=8; ACEA, n=5; AM 251 + ACEA, n=5; AM 251, n=6

7.2.1.2 Efecto intra-NPH de ACEA y del pre-tratamiento con 5-HT sobre la ingesta de alimento y la secuencia de saciedad conductual en la rata.

A nivel sistémico la activación de los CB1R regula la conducta alimentaria como lo mostramos, la participación del NPH en este fenómeno se estudió mediante la administración intra-NPH del agonista selectivo del CB1R, ACEA (0.25 μ g), el cual incrementó significativamente la ingesta de alimento, tanto en la primer hora de registro (H1), como en la segunda hora (H2); factor tratamiento ($F_{(3,18)}=33.73$; $p<0.0001$); factor hora ($F_{(3,18)}=475.6$; $p<0.0001$), *post hoc* de Bonferroni $p<0.001$ en la H1 y H2 de registro con respecto al grupo control. Además este efecto fue prevenido por el pre-tratamiento intra-NPH de 5-HT (2.0 μ g) y se observó que disminuye de manera significativa con respecto al grupo control, *post hoc* de Bonferroni $p<0.05$ (Fig. 24).

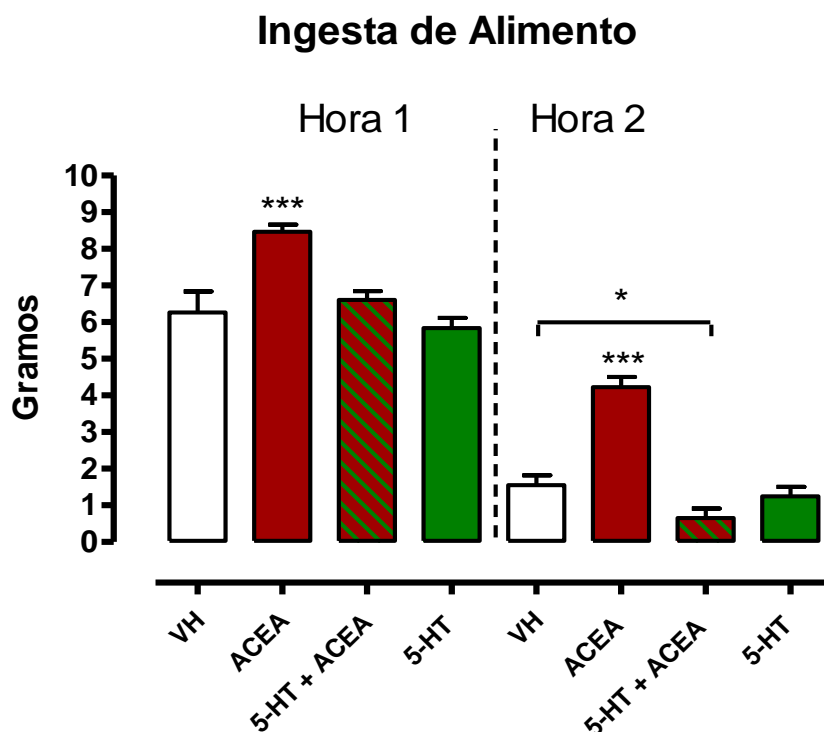


Figura 24. Efecto de las inyecciones intra-NPH de ACEA (0.25 μ g/0.5 μ l), 5-HT (2.0 μ g/0.5 μ l) o vehículo (VH [0.5 μ l 0.9% NaCl]) sobre la ingesta de alimento en 60 (H1) y 120 (H2) minutos. Datos expresados en términos de Media \pm EEM (Error estándar de la media). Las diferencias significativas entre los grupos fueron determinadas por un ANOVA de dos vías seguido por la prueba *post-hoc* Bonferroni. *** $p<0.001$ en H1 y H2 (VH vs ACEA); * $p<0.05$ en H2 (VH vs 5-HT + ACEA); n= 4-7 por grupo.

Secuencia de Siedad Conductual.

El análisis de la SSC, mostró que en los sujetos que recibieron la inyección del vehículo en el NPH, la expresión de la siedad (posprandial) se presentó alrededor de los 80 minutos (periodo 16) posterior a la inyección, donde los sujetos dejaron de comer para descansar (Fig. 25B). Por el contrario los sujetos que recibieron la administración de ACEA (0.25 μ g) en el NPH se observó que la ingestión de alimento se prosiguió durante las dos horas de registro, inhibiéndose la expresión de la siedad (Fig. 25C y 25D).

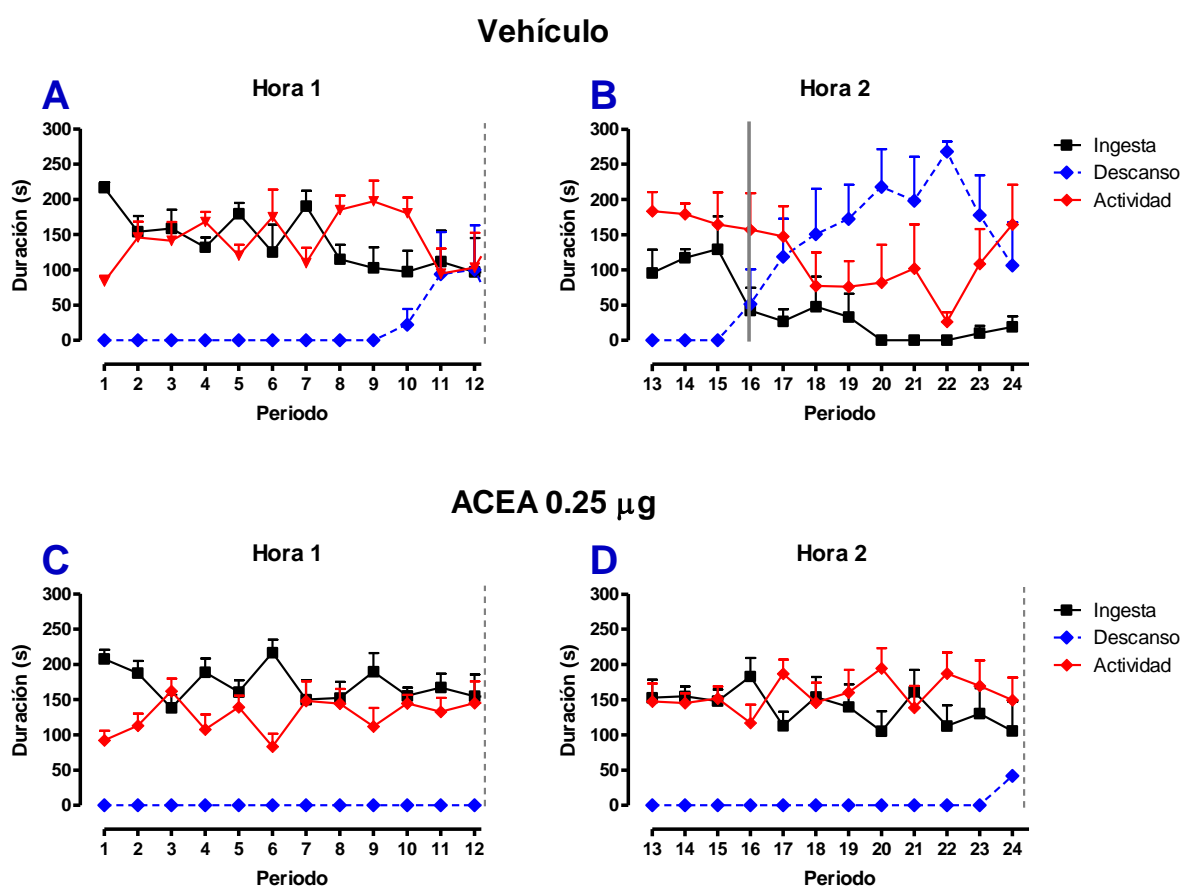


Figura 25. Duración media del tiempo que emplean los sujetos en las categorías conductuales de ingesta (-■-), descanso (-◆-) y actividad no alimentaria (-◆-) en las distintas condiciones; Vehículo (A, B); ACEA (0.25 μ g) (C, D); 5-HT + ACEA; 5-HT (2.0 μ g). Los dos registros de 60 min (hora 1 y hora 2,) fueron divididos en periodos de 5 min cada uno. La línea vertical gris continua representa la transición de la ingesta al descanso (expresión de la siedad, cuando es discontinua dicha transición no se presentó durante el tiempo de registro. Vehículo (n =6), ACEA (n = 7), 5-HT + ACEA (n = 4), 5-HT (n = 5).

El efecto de la inhibición de la expresión de la saciedad por medio de la activación de los CB1R con el agonista selectivo ACEA (0.25 μg) fue prevenido por el pretratamiento de 5-HT (2.0 μg), en donde la expresión de la saciedad se adelantó y se apreció alrededor de los 55 minutos (período 11) de la primer hora y 70 minutos (período 14) de la segunda hora de registro (Fig. 26A y 26B).

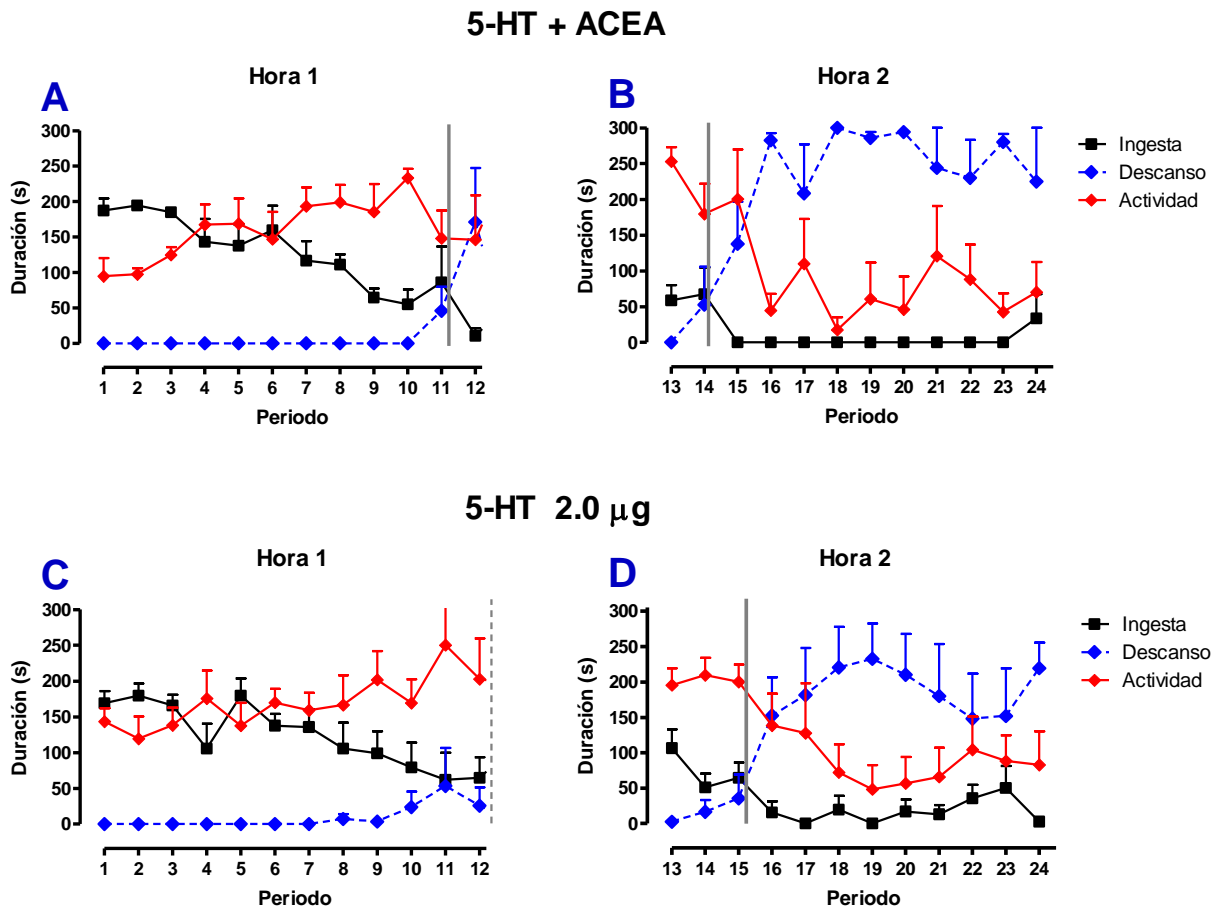


Figura 26. Duración media del tiempo que emplearon los sujetos en las categorías conductuales de ingesta (-■-), descanso (-◆-) y actividad no alimentaria (-●-) en las distintas condiciones; Vehículo; ACEA (0.25 μg); 5-HT + ACEA (A, B); 5-HT (2.0 μg) (C, D). Los dos registros de 60 min (hora 1 y hora 2,) fueron divididos en periodos de 5 min cada uno. La línea vertical gris continua representa la transición de la ingesta al descanso (expresión de la saciedad, cuando es discontinua dicha transición no se presentó durante el tiempo de registro. Vehículo (n = 6), ACEA (n = 7), 5-HT + ACEA (n = 4), 5-HT (n = 5).

7.2.1.3 Efecto de la activación del CB1R en animales pre-tratados con 8-OHDPAT (agonista 5-HT_{1A}) sobre la ingesta de alimento y la secuencia de saciedad conductual.

La administración intra-NPH del agonista selectivo del CB1R, ACEA (0.25 µg) estimuló la ingesta de alimento de manera significativa en ambas horas de registro (H1 y H2); factor tratamiento ($F_{(3,19)}= 7.606$; $p=0.0004$); factor hora ($F_{(3,19)}= 168.8$; $p< 0.0001$), *post hoc* de Bonferroni $p< 0.05$ en la H1 y $p< 0.01$ en la H2. Este efecto estimulador fue prevenido por el pre-tratamiento con el agonista de los receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (0.1 µg) en la H1y H2. El agonista 8-OHDPAT *per se* no produjo efectos con respecto al grupo control (Fig. 27).

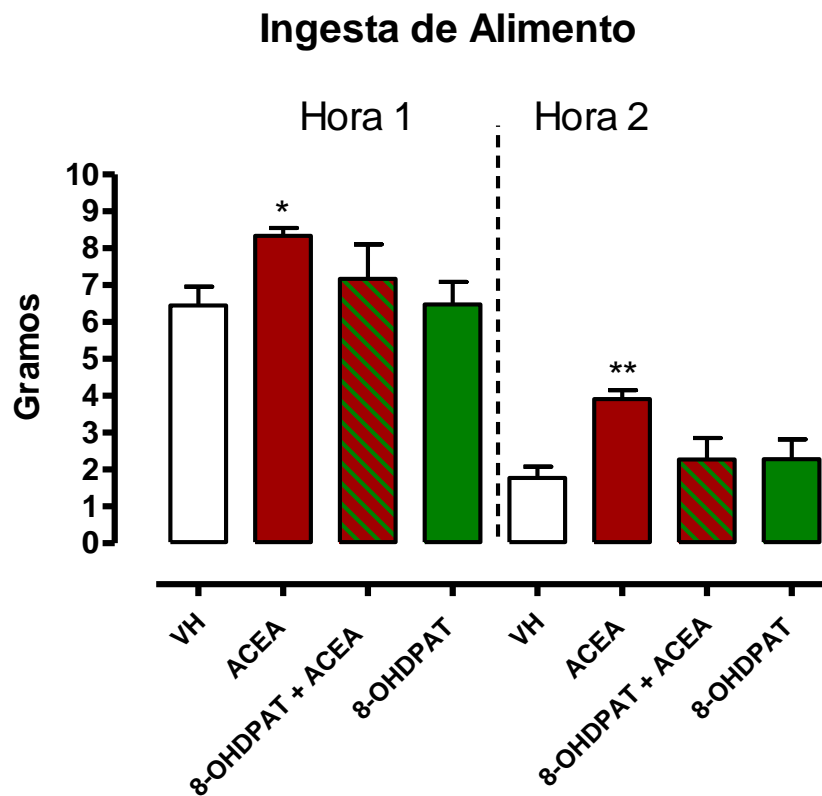


Figura 27. Efecto de las inyecciones intra-NPH de ACEA (0.25 µg/0.5µl), 8-OHDPAT (0.1µg/0.5µl) o vehículo (VH [0.5µl 0.9% NaCl]) sobre la ingesta de alimento en 60 (H1) y 120 (H2) minutos. Datos expresados en términos de Media ± EEM (Error estándar de la media). Las diferencias significativas entre los grupos fueron determinadas por un ANOVA de dos vías seguido por la prueba *post-hoc* Bonferroni. * $p< 0.05$ en H1 (VH vs ACEA); ** $p<0.01$ en H2 (VH vs ACEA); $n= 5-7$ por grupo.

Secuencia de Siedad Conductual

La inhibición de la expresión de la saciedad por el ACEA (0.25 μg) fue prevenida por el pretratamiento de 8-OH-DPAT (0.1 μg [agonista 5-HT_{1A}]), donde la expresión de la saciedad (posprandial) se presentó alrededor de los 42 minutos (período 8-9) de la primer hora y 76 minutos (período 15-16) de la segunda hora de registro (Fig. 28A y 28B).

8-OHDPAT+ ACEA

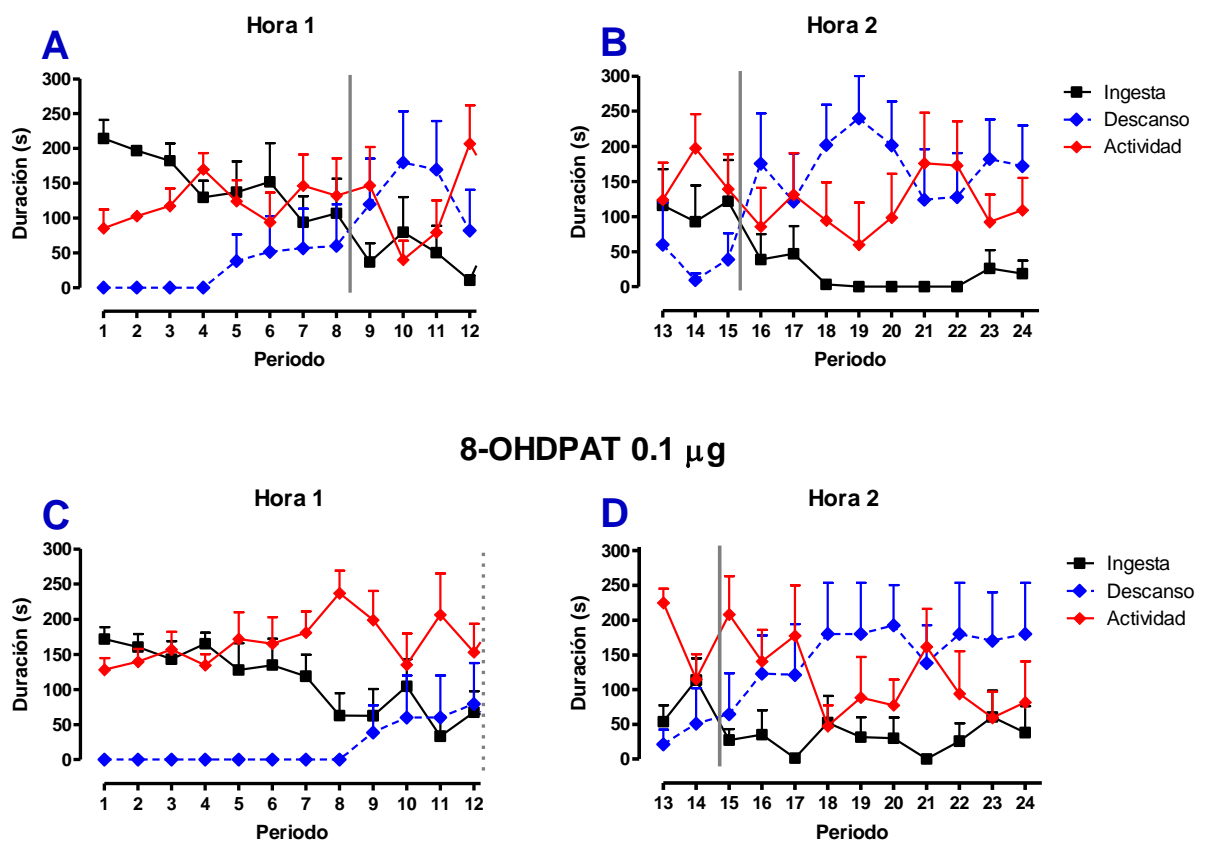


Figura 28. Duración media del tiempo que emplearon los sujetos en las categorías conductuales de ingesta (-■-), descanso (-□-) y actividad no alimentaria (-◇-) en las distintas condiciones; Vehículo; ACEA (0.25 μg); 8-OH-DPAT + ACEA (A, B); 8-OH-DPAT (0.1 μg) (C, D). Los dos registros de 60 min (hora 1 y hora 2,) fueron divididos en periodos de 5 min cada uno. La línea vertical gris continua representa la transición de la ingesta al descanso (expresión de la saciedad, cuando es discontinua dicha transición no se presentó durante el tiempo de registro. Vehículo (n =6), ACEA (n = 7), 8-OHADPAT+ ACEA (n = 5), 8-OHDPAT (n = 5).

7.2.1.4 Efecto de la activación del CB1R en animales pre-tratados con CP 93129 (agonista 5-HT_{1B}) sobre la ingesta de alimento y la secuencia de saciedad conductual.

La administración intra-NPH del agonista selectivo del CB1R, ACEA (0.25 μ g) estimula la ingesta de alimento de manera significativa en ambas horas de registro (H1 y H2); factor tratamiento ($F_{(3,18)}= 14.98$; $p < 0.0001$); factor hora ($F_{(3,18)}= 74.42$; $p < 0.0001$), *post hoc* de Bonferroni $p < 0.01$ en la H1 y $p < 0.001$ en la H2. Este efecto estimulador fue prevenido por el pre-tratamiento del agonista de los receptores 5-HT_{1B}, CP 93129 (0.18 μ g) en la H1 y H2. El agonista CP 93129 *per se* no produjo cambios significativos del consumo de alimento con respecto al grupo control (Fig. 29).

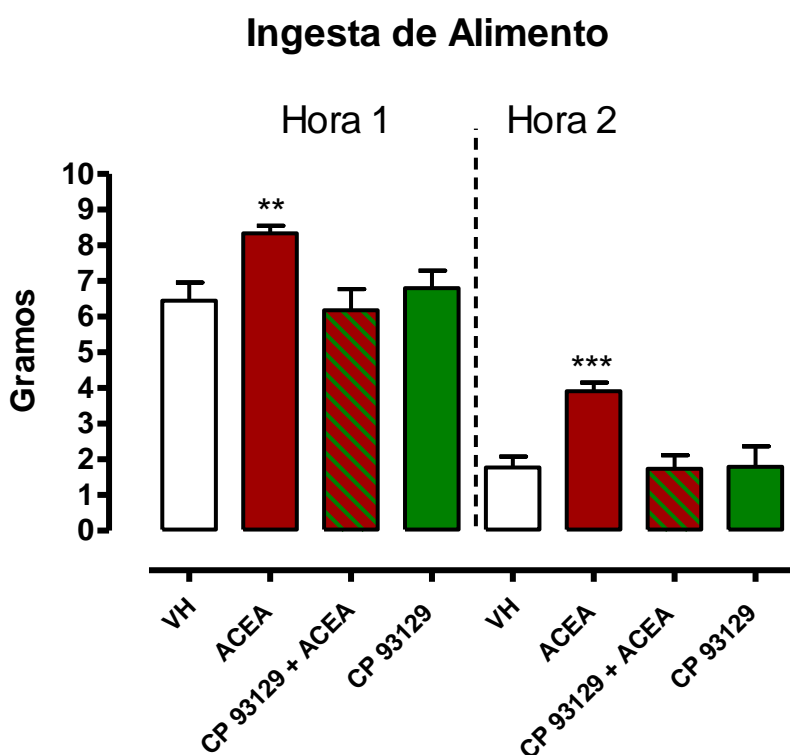


Figura 29. Efecto de las inyecciones intra-NPH de ACEA (0.25 μ g/0.5 μ l), CP 93129 (0.18 μ g/0.5 μ l) o vehículo (VH [0.5 μ l 0.9% NaCl]) sobre la ingesta de alimento en 60 (H1) y 120 (H2) minutos. Datos expresados en términos de Media \pm EEM. Las diferencias significativas entre los grupos fueron determinadas por un ANOVA de dos vías seguido por la prueba *post-hoc* Bonferroni. ** $p < 0.01$ en H1 (VH vs ACEA); *** $p < 0.001$ en H2 (VH vs ACEA); $n = 4-6$ por grupo.

Secuencia de Siedad Conductual.

La inhibición de la expresión de la siedad por ACEA (0.25 μg) fue prevenida por el pretratamiento de CP 93129 (0.1 μg [agonista 5-HT_{1B}]), donde la expresión de la siedad (posprandial) se representó alrededor de 76 minutos (período 15-16) de la segunda hora de registro (Fig. 30B). El agonista CP 93129 *per se* no alteró la SSC.

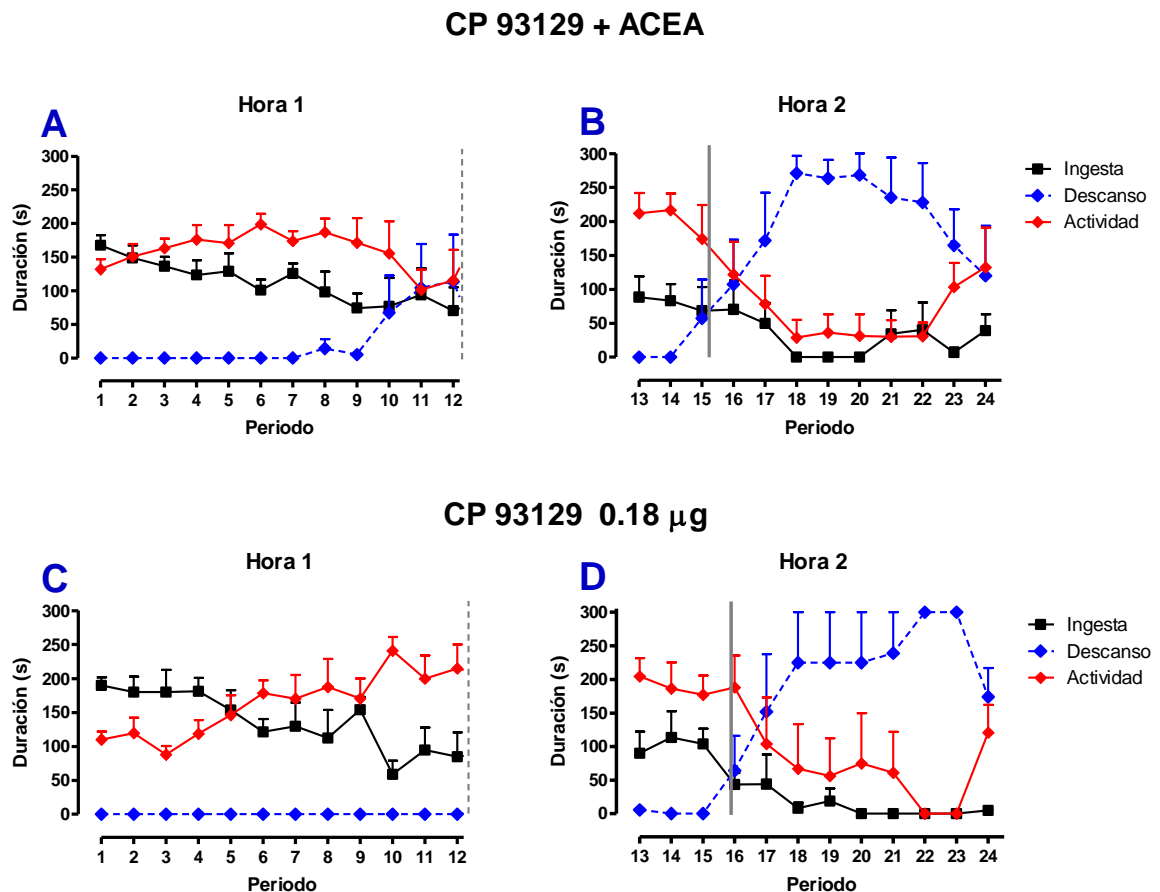


Figura 30. Duración media del tiempo que emplearon los sujetos en las categorías conductuales de ingesta (-■-), descanso (-□-) y actividad no alimentaria (-◇-) en las distintas condiciones; Vehículo; ACEA (0.25 μg); CP 93129 + ACEA (A, B); CP 93129 (0.18 μg) (C, D). Los dos registros de 60 min (hora 1 y hora 2,) fueron divididos en periodos de 5 min cada uno. La línea vertical gris continua representa la transición de la ingesta al descanso (expresión de la siedad, cuando es discontinua dicha transición no se presentó durante el tiempo de registro. Vehículo (n =6), ACEA (n =7), CP 93129 + ACEA (n =5), CP 93129 (n =4).

7.2.1.5 Efecto de la activación de los CB1R (ACEA) en animales pre-tratados con DOI (agonista 5-HT_{2A/2C}) sobre la ingesta de alimento y la secuencia de saciedad conductual.

La administración intra-NPH del agonista selectivo del CB1R, ACEA (0.25 µg) estimuló la ingesta de alimento de manera significativa en ambas horas de registro (H1 y H2); factor tratamiento ($F_{(3,18)} = 10.12$; $p < 0.0001$); factor hora ($F_{(3,18)} = 290.0$; $p < 0.0001$), *post hoc* de Bonferroni $p < 0.001$ en la H1 y $p < 0.001$ en la H2. Este efecto estimulador fue prevenido por el pre-tratamiento con el agonista de los receptores 5-HT_{2A/2C}, DOI (0.1 µg) solamente en la segunda hora de registro. El agonista DOI *per se* no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control (Fig. 31).

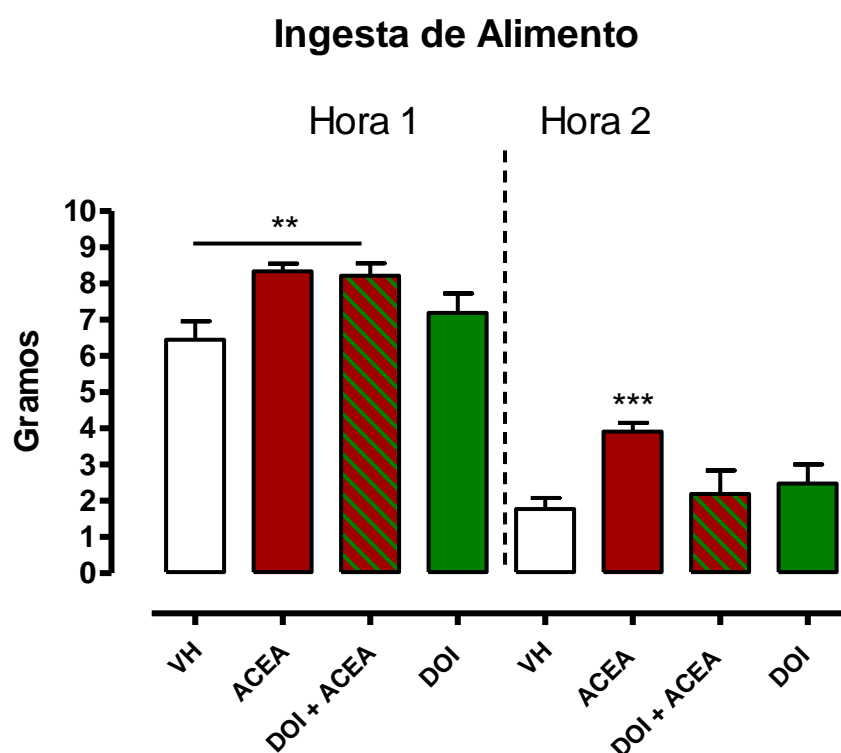


Figura 31. Efecto de las inyecciones intra-NPH de ACEA (0.25 µg/0.5µl), DOI (0.1µg/0.5µl) o vehículo (VH [0.5µl 0.9% NaCl]) sobre la ingesta de alimento en 60 (H1) y 120 (H2) minutos. Datos expresados en términos de Media ± EEM. Las diferencias significativas entre los grupos fueron determinadas por un ANOVA de dos vías seguido por la prueba *post-hoc* Bonferroni. ** $p < 0.01$ en H1 (VH vs ACEA); *** $p < 0.001$ en H2 (VH vs ACEA); * $p < 0.01$ H1 (VH vs DOI + ACEA) $n = 4-7$ por grupo.

Secuencia de Siedad Conductual.

El agonista de los receptores 5-HT_{2A/2C}, DOI (0.1 µg), previno la inhibición de la expresión de la saciedad mediada por la activación de los CB1R con ACEA (0.25 µg), donde la expresión de la saciedad (posprandial) se representó alrededor de los 80 minutos (período 16) de la segunda hora de registro (Fig. 32B).

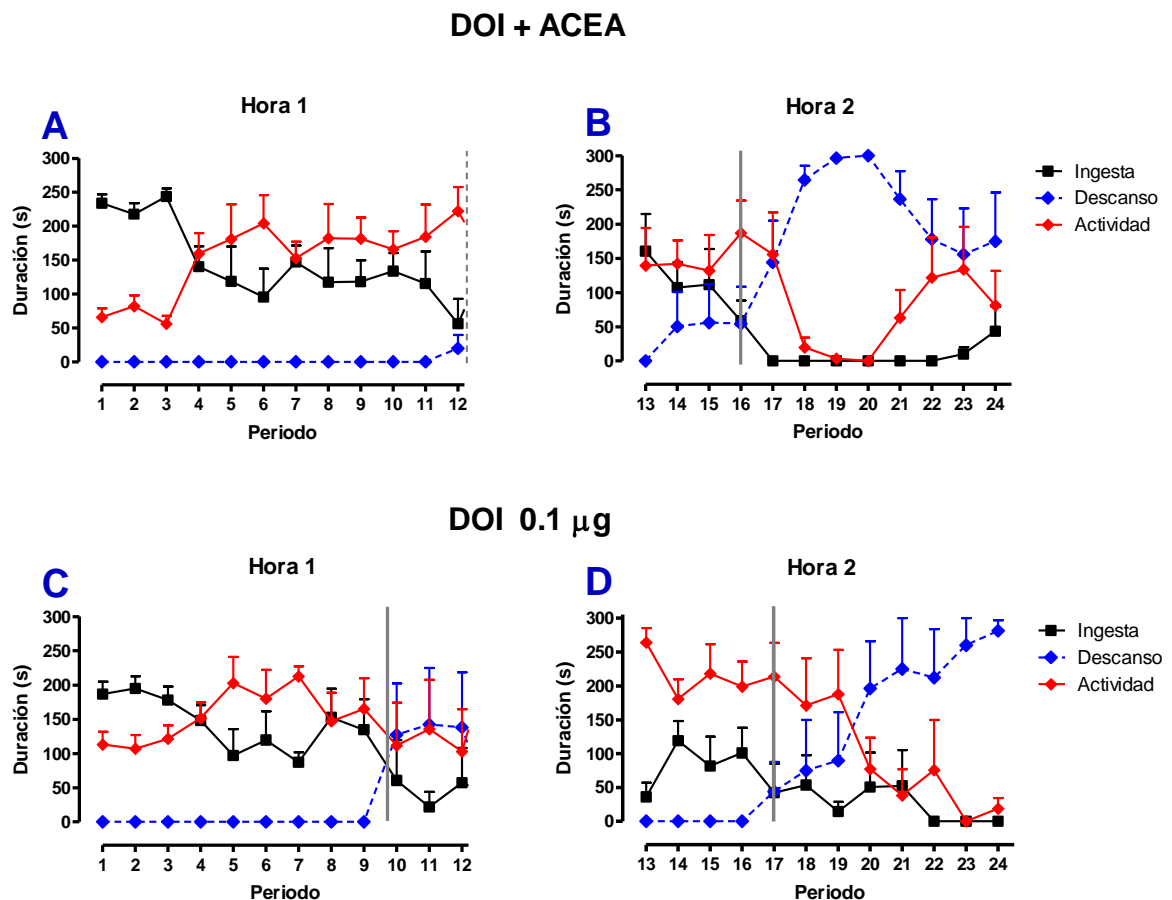


Figura 32. Duración media del tiempo que emplearon los sujetos en las categorías conductuales de ingesta (-■-), descanso (-□-) y actividad no alimentaria (-○-) en las distintas condiciones; Vehículo; ACEA (0.25 µg); DOI + ACEA (A, B); DOI (0.1 µg) (C, D). Los dos registros of 60 min (hora 1 y hora 2,) fueron divididos en periodos de 5 min cada uno. La línea vertical gris continua representa la transición de la ingesta al descanso (expresión de la saciedad, cuando es discontinua dicha transición no se presentó durante el tiempo de registro. Vehículo (n =6), ACEA (n = 7), DOI + ACEA (n = 5), DOI (n = 4).

7.2.1.6 Efecto de la activación del CB1R en presencia del antagonista de los receptores GABA_A con bicuculina sobre la ingesta de alimento y la secuencia de saciedad conductual.

El siguiente paso fue investigar si en el efecto hiperfágico de la activación de los CB1R se encontraba involucrado el sistema GABAérgico, por lo cual se bloqueó al receptor GABA_A. La administración intra-NPH de ACEA (0.25 µg) estimuló la ingesta de alimento de manera significativa en ambas horas de registro (H1 y H2); factor tratamiento ($F_{(3,18)} = 14.29.0$; $p < 0.0001$); factor hora de registro ($F_{(3,18)} = 383.0$; $p < 0.0001$); *post hoc* de Bonferroni $p < 0.001$ en la H1 y H2 con respecto al vehículo (Fig. 26). Este efecto estimulador fue prevenido por el pretratamiento con bicuculina (0.20 µg) en la segunda hora de registro. El antagonista bicuculina *per se* no presentó diferencia significativa con respecto al grupo control (Fig. 33).

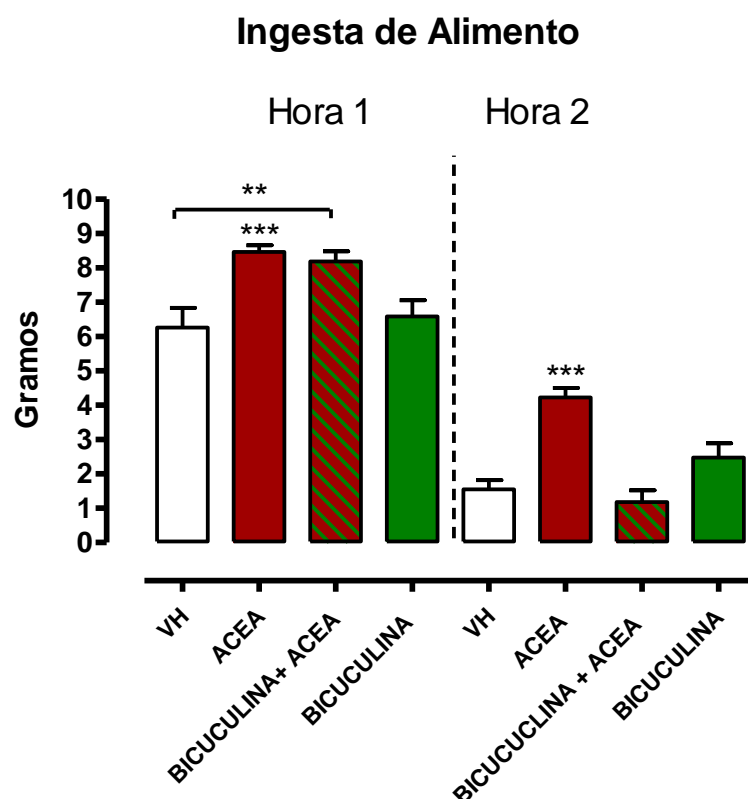


Figura 33. Efecto de las inyecciones intra-NPH de ACEA (0.25 µg/0.5µl), bicuculina (0.20µg/0.5µl) o vehículo (VH [0.5µl 0.9% NaCl]) sobre la ingesta de alimento en 60 (H1) y 120 (H2) minutos. Datos expresados en terminos de Media ± EEM. Las diferencias significativas entre los grupos fueron determinadas por un ANOVA de dos vías seguido por la prueba *post-hoc* Bonferroni. *** $p < 0.001$ en H1 y H2 (VH vs ACEA); ** $p < 0.01$ en H1 (VH vs bicuculina + ACEA); $n = 4-6$ por grupo.

Secuencia de Siedad Conductual.

El bloqueo de los receptores GABA_A con bicuculina previno la inhibición de la expresión de la siedad inducida por ACEA (0.25 µg), y la expresión de la siedad (posprandial) se presentó alrededor de los 76 minutos (período 15-16) de la segunda hora de registro, en donde presentó un comportamiento similar al del grupo control. (Fig. 34B).

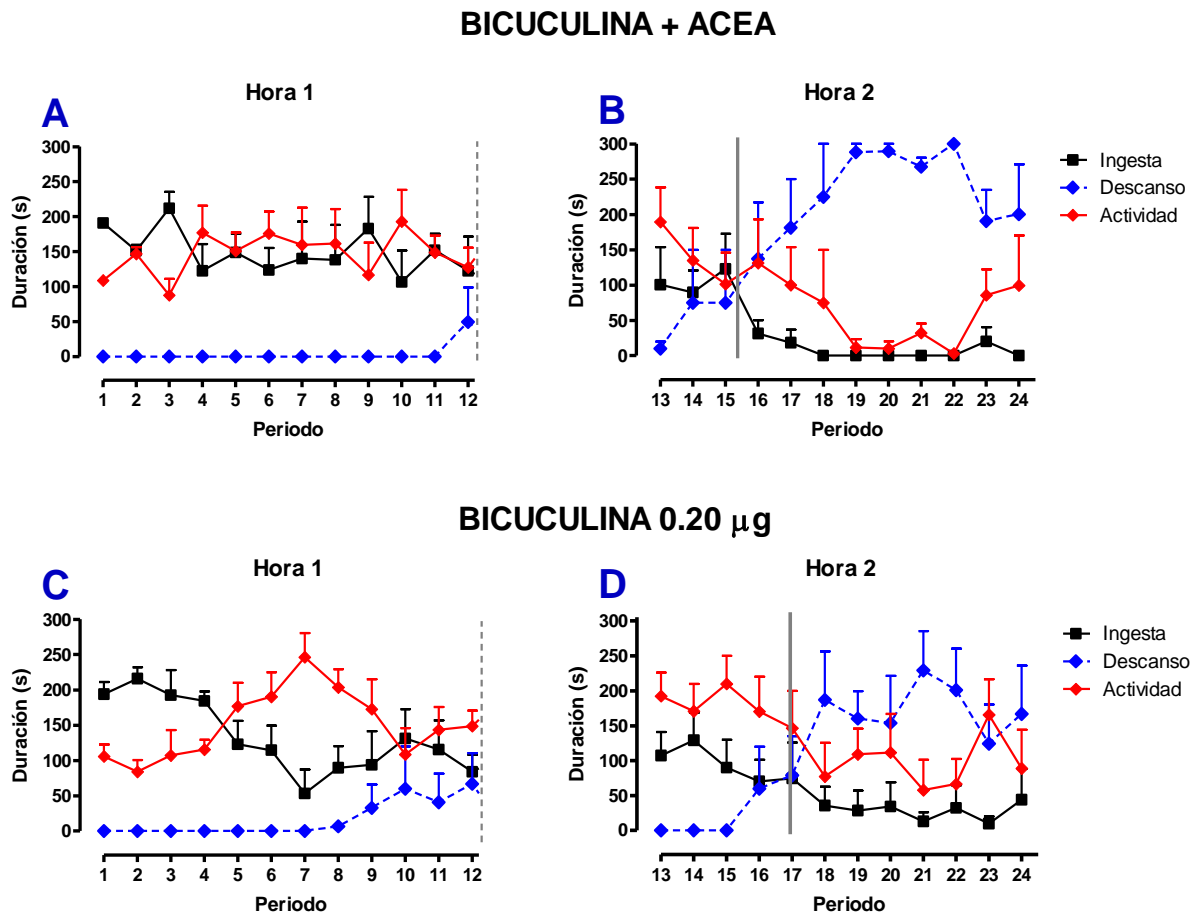


Figura 34. Duración media del tiempo que emplearon los sujetos en las categorías conductuales de ingesta (-■-), descanso (-□-) y actividad no alimentaria (-◇-) en las distintas condiciones; Vehículo (A, B); ACEA (0.25 µg) (C, D); bicuculina + ACEA (E, F); bicuculina (0.20 µg) (G, H). Los dos registros de 60 min (hora 1 y hora 2,) fueron divididos en periodos de 5 min cada uno. La línea vertical gris continua representa la transición de la ingesta al descanso (expresión de la siedad, cuando es discontinua dicha transición no se presentó durante el tiempo de registro. Vehículo (n =6), ACEA (n = 7), bicuculina + ACEA (n = 4), bicuculina (n = 5).

8. DISCUSIÓN

8.1 El sistema de los endocannabinoides y la alimentación

En el presente estudio, se analizaron los efectos de la activación sistémica y del NPH de los CB1R en la ingesta de nutrientes, así como en los procesos de saciedad en las ratas pre-saciadas con el fin de proporcionar una visión de los mecanismos conductuales involucrados en la hiperfagia inducida por los cannabinoides, además de conocer los componentes dietéticos específicos afectados por la activación de los CB1R. También se analizaron los efectos de la activación de los CB1R y su relación con el sistema serotoninérgico, para determinar los posibles mecanismos neuroquímicos implicados en los efectos de la activación de los CB1R sobre la conducta alimentaria. Los datos obtenidos indican que los receptores CB1R son capaces de estimular la ingesta de alimento en las ratas pre-saciadas, específicamente la ingesta de carbohidratos, a la vez que son capaces de prevenir completamente la saciedad, esencialmente previenen la secuencia de saciedad conductual natural y producen sobreingesta de alimento, un efecto específico y dependiente de receptor.

Este mecanismo conductual relacionado con el efecto hiperfágico de los cannabinoides concuerdan con hallazgos previos, que sugieren una acción directa de los CB1R en los procesos de motivación que incluyen la inhibición de la saciedad (Gómez et al., 2002), y/o la estimulación del hambre (Koch, 2001). Además de que es posible que la inhibición de la saciedad ocurra simultáneamente con la estimulación del hambre. En estudios previos se ha reportado que los cannabinoides exógenos y endógenos incrementan la motivación para comer (reduciendo la latencia de comer) (Williams & Kirkham, 2002), también aumentan el número y la duración del lengüeteo de una solución rica en sacarosa (Higgs, Williams & Kirkham, 2003). En los presentes experimentos, encontramos que la estimulación de los CB1R con ACEA consistentemente aumentó el tiempo dedicado a comer de las ratas pre-

alimentadas, lo que sugiere la estimulación del hambre. Del mismo modo, nuestros resultados muestran que el patrón de la SSC de las ratas saciadas fue prevenido por la activación de los CB1R, apoyando la idea de que la hiperfagia inducida por los cannabinoides implica la inhibición de la saciedad. Por lo tanto, el sistema de los endocannabinoides modula a la conducta alimentaria por mecanismos conductuales específicos. A pesar de la indiscutible contribución de los CB1R periféricos en la homeostasis energética y la regulación del peso corporal, los presentes resultados sugieren una acción central del sistema endocanabinoide dado que las señales conductuales, fisiológicas y neuroquímicas sobre la regulación del apetito son integradas en el sistema nervioso central (Madsen et al., 2009), donde a su vez es procesada la información para posteriormente determinar el requerimiento energético del cuerpo y así modificar la experiencia del hambre e iniciar los procesos conductuales necesarios en respuesta a esta. En consecuencia, los sitios de acción de los cannabinoides y endocannabinoides son presumiblemente (aunque no exclusivamente) también en el sistema nervioso central.

En cuanto a la SSC, esta es una herramienta que ayuda a distinguir el efecto hiperfágico o hipofágico de los fármacos sobre la conducta alimentaria. Asimismo, la SSC puede contribuir a aclarar si la hipofagia inducida por un fármaco se debe al desarrollo de la saciedad o a reacciones colaterales adversas como náusea, sedación, hiperactividad y/o palatabilidad del alimento (McGuirk, Muscat & Willner, 1992 a, b; Gao, Harvey, Mook & Zeigler, 1998; Halford, Wanninayake & Blundell 1998; Vickers, Clifton, Dourish & Tecott, 1999; López-Alonso, Mancilla-Díaz, Rito-Domingo, Gonzalez-Hernandez & Escartin-Pérez, 2007). De acuerdo con los resultados del presente trabajo, el perfil conductual asociado a la ingesta de alimento estimulada la activación de receptores CB1 en el NPH se caracteriza por la inhibición de la expresión de la saciedad y que de manera importante al evaluar la participación de 5-HT se observó que esta fue capaz de prevenir la inhibición de la expresión de la saciedad dada por la activación de los CB1R, lo que concuerda con el efecto

hiperfágico observado e indica que es un mecanismo directo sobre conducta alimentaria y no sobre otros parámetros conductuales.

8.2 Los receptores CB1 del NPH

Se sabe que los CB1R se expresan ampliamente en el SNC, en regiones claves importantes para la regulación del apetito, el balance energético y el control del peso corporal (hipotálamo, el área tegmental ventral, la amígdala basolateral, el núcleo accumbens, así como el núcleo parabranchial) (Herkenham et al., 1990, 1991; Madsen et al., 2009). Dentro de estas regiones está el hipotálamo que desempeña un papel importante en la regulación de la ingesta de alimento y el balance energético y particularmente el NPH.

El NPH es un centro integrador en el cual convergen vías neurales que modifican la alimentación, señales orexigénicas y anorexigénicas (King & Williams, 1998; Yun, *et al.*, 2005; Hagemann, *et al.*, 1998; Williams, *et al.*, 2001; Verty, McGregor & Mallet, 2005). De acuerdo con la evidencia experimental disponible, se sugiere que la activación de los CB1R en el NPH estimula la ingesta de alimento (Gamber, Macarthur & Westfall, 2005; Cruz et al., 2010). Los resultados del presente estudio muestran que uno de los posibles mecanismos neuroquímicos involucrados en el efecto hiperfágico de la activación de los CB1R localizados en el NPH implica la modulación de 5-HT y GABA. Como se sabe, los CB1R están acoplados a proteínas Gi y como consecuencia de su activación se genera la inhibición de la liberación de neurotransmisores, lo que se observó para el caso de la serotonina pero no para el GABA. El NPH recibe aferencias del núcleo del rafe dorsal y mediano (Lanser et al., 1996), por otra parte se ha encontrado la coexpresión del ARNm que codifica para el CB1R en neuronas positivas a Triptófano hidroxilasa 2 (TPH2) (marcador neuronal de células serotoninérgicas) (Häring et al., 2007), también la expresión del CB1R está presente en el NPH (Herkenham et al., 1990), estos datos ayudan a explicar el efecto observado sobre la liberación de

5-HT. La disminución de la liberación de [³H]-5-HT en sí misma podría explicar en parte el efecto hiperfágico de la activación de los CB1R en el NPH, ya que se sabe que la 5-HT es considerada una potente señal saciadora y participa de manera importante a nivel del hipotálamo para regular negativamente a la conducta alimentaria mediante mecanismos saciadores, así pues la microinyección de 5-HT en NPH induce anorexia (Leibowitz et al., 1990) probablemente por la excitación de la actividad neuronal.

En los experimentos de liberación de [³H]-GABA, los resultados obtenidos muestran que la activación de los CB1R (ACEA) estimula la liberación de GABA (Figura 17) datos que concuerdan con resultados obtenidos en nuestro grupo de trabajo donde la activación de los receptores CB1 en el globo pálido estimula también la liberación de [³H]-GABA (González et al., 2009) y el bloqueo disminuye su liberación (Menzies, Ludwig & Leng, 2010). Ya que se sabe que los CB1 están acoplados a proteínas Gi y su activación inhibe la liberación de neurotransmisores, dicho efecto sobre la liberación de [³H]-GABA podría ser un mecanismo indirecto que sea mediado por otros neurotransmisores, es decir la disminución de la liberación de un neurotransmisor local y que normalmente inhiba la liberación de GABA y generará a su vez la desinhibición de la liberación de GABA. A este respecto uno de los posibles candidatos para esta modulación, podría ser el sistema serotoninérgico, ya que en estudios electrofisiológicos se ha observado que la actividad de algunas terminales GABAérgicas es controlada por la 5-HT a través de receptores de la familia 5-HT₁ (Bramley et al., 2005; Lee et al., 2008). En otras como el área ventral tegmental (AVT) se ha mostrado que la administración del agonista del receptor 5-HT_{1B}, CP 93129 inhibe la liberación de [³H]-GABA inducida por alto potasio (K⁺) (Yan & Yan, 2001). De acuerdo con nuestros resultados, el efecto estimulador de los receptores CB1 sobre la liberación de [³H]-GABA es prevenido por la serotonina (Fig. 18), lo cual sugiere fuertemente que en nuestro modelo experimental la estimulación de la liberación de GABA inducida

por la activación de los CB1R es un efecto indirecto mediado por una inhibición de la liberación de la 5-HT.

Con respecto a GABA, se sabe que participa en la conducta alimentaria mediante la activación de sus receptores GABA_{A/B} y es considerada una señal estimuladora de la ingesta de alimento. Es por ello que el aumento en la liberación de GABA provocada por la activación de receptores CB1 y mediada por serotonina explique el efecto hiperfágico derivado de la administración del ACEA. Además, que el efecto de la activación del receptor CB1 sea prevenido por la administración de bicuculina apoya fuertemente que este es el mecanismo de generación de la conducta. De acuerdo al análisis de la SSC, la bicuculina previene la inhibición de expresión de la saciedad activada por los CB1R lo cual es consistente con un mecanismo de acción común.

8.3 Los receptores a serotonina y el efecto de los canabinoides

El siguiente paso fue investigar los subtipos de receptores serotoninérgicos involucrados en la modulación de la liberación de GABA. Se sabe que ciertos subtipos de receptores serotoninérgicos participan en la regulación de la ingesta de alimento, como son los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT₂. Estos receptores se expresan densamente en el hipotálamo, particularmente en el NPH (Sawchenko et al., 1983). Los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} se expresan a nivel pre y post-sináptico, mientras que los 5-HT₂ lo hacen a nivel post-sináptico. La activación de los receptores 5-HT_{1A} con el agonista 8-OH-DPAT (100 nM) en presencia de ACEA, fue capaz de prevenir la liberación de [³H]-GABA inducida por activación de los CB1R (Fig. 19). De la misma forma, nuestros datos demuestran que la activación del receptor 5-HT_{1B} con el agonista, CP 93129 (100 nM), también previene el efecto estimulador de la liberación de GABA inducido por ACEA (Fig. 20). Estos hallazgos sugieren la participación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} en el control de la liberación de GABA inducida por

los endocannabinoides, además de ser uno de los posibles mecanismos implicados en el efecto hiperfágico de la activación de los CB1R en el NPH.

De las señales orexigénicas y anorexigénicas que llegan al NPH, una de ellas proviene del ARC (Arora & Anubhuti, 2006), el cual es conocido por sintetizar NPY (señal estimuladora del apetito) y a su vez co-libera con el neurotransmisor GABA, además de que estas terminales nerviosas expresan los receptores 5-HT₁. La activación de los CB1R generaría una inhibición de la liberación de 5-HT y en consecuencia una desinhibición de liberación de GABA que a su vez, al activar receptores GABA_A postsinápticos podría inhibir la liberación de péptidos u hormonas como la α -MSH, CRH y TRH respectivamente, involucrados en la regulación de la alimentación y que son consideradas señales anorexigénicas. Por otro lado, el NPH también recibe aferencias del VMH (Moga & Saper, 1994; Krieger, Conrad & Pfaff, 1979; Sawchenko & Swanson 1983), que envía proyecciones de naturaleza GABAérgica, por lo que esta región también podría ser otro sitio de control pues expresa receptores 5-HT_{1B}. Así pues, el pretratamiento con el agonista del receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, previno el efecto estimulador de la ingesta de alimento mediado por la activación de los CB1R (Fig. 27). Cabe mencionar que la activación de los receptores 5-HT_{1A} puede presentar efectos bifásicos sobre la ingesta de alimento y esto puede deberse a la activación de receptores presinápticos 5-HT_{1A} (autorreceptores [estimulan la ingesta de alimento mediante la inhibición de la liberación de 5-HT]) (Park et al., 1999) o receptores postsinápticos 5-HT_{1A} [heterorreceptores [inhiben la ingesta de alimento]] (López-Alonso et. Al., 2007). El pretratamiento con el agonista 8-OH-DPAT previno la inhibición de la expresión de la saciedad inducida por la activación de los CB1R en la H1 (periodo 8-9) y la H2 (periodo 15-16) (Fig. 28A y 28B). Los receptores 5-HT_{1A} se encuentran involucrados en la facilitación de la expresión de la SSC con una disrupción del típico patrón conductual, aumentando la conducta del descanso post- ingesta, tal como se aprecia en los experimentos realizados por López-Alonso y colaboradores (López-Alonso et al., 2007).

Con respecto al efecto del pre-tratamiento con el agonista del receptor 5-HT_{1B}, CP 93129, también previene el efecto estimulador de la ingesta de alimento inducido por la activación de los CB1R (Fig. 29). Los receptores 5-HT_{1B} se encuentran involucrados en la regulación de la ingesta de alimento; pues la administración de agonistas 5-HT_{1B} produce hipofagia, efecto que es prevenido por el tratamiento con los antagonistas 5-HT_{1B} (Halford & Blundell, 1996; Lee & Simansky, 1997). Dichos efectos pueden deberse a los heterorreceptores 5-HT_{1B} expresados en neuronas no serotoninérgicas, como las GABAérgicas. En el presente estudio, la administración intra-NPH del agonista de los receptores 5-HT_{1B}, CP 93129, también previene la inhibición de la expresión de la saciedad inducida por la activación de los CB1R con ACEA, efecto que se aprecia en la H2 de registro (periodo 15-16) (Fig. 30B). Cabe mencionar que el patrón conductual de la SSC se preserva, pues la transición ordenada de la alimentación al descanso persiste.

En contraste, los receptores 5-HT₂ parecen no tener efecto en la modulación de la liberación de GABA estimulada por la activación de los CB1R (Fig. 21). Sin embargo, el pre-tratamiento con el agonista del receptor 5-HT_{2A/2C}, DOI, previene la estimulación de ingesta de alimento mediada por la activación de los CB1R en la segunda hora de registro (H2) (Fig. 31), lo que sugiere que es un mecanismo diferente en el que no están involucrados los efectos del sistema endocanabinoide sobre la regulación de la liberación de GABA. Estos datos concuerdan con experimentos electrofisiológicos donde la activación de los receptores 5-HT_{2A/2C} no tiene efecto sobre la transmisión GABAérgica, pero sí sobre la transmisión glutamatérgica (Ho et al., 2007). En adición a lo anterior, se sabe que los receptores 5-HT₂ se expresan a nivel post-sináptico y se encuentran acoplados a proteínas G_q que estimulan la liberación de neurotransmisores o péptidos y/o hormonas. En cuanto a la regulación de la alimentación se sabe que participan de manera importante; por ejemplo, se ha demostrado que en los ratones knockout del receptor 5-HT_{2C}, se produce una marcada hiperfagia, con un incremento en la duración y la frecuencia de los

periodos de alimentación, además de que los animales desarrollan obesidad (Nonogaki et al., 1998; Tecott et al., 1995).

La administración del agonista de los receptores 5-HT_{2A/2C} previene el efecto estimulador sobre la alimentación producido por la activación del CB1R, lo que puede apreciarse en la H2 (periodo 16) (Fig. 32B). Al realizar una cuantificación del tiempo que emplearon los animales para alimentarse y para descansar (Área Bajo la Curva, ABC), se observó que estos pasaron más tiempo consumiendo alimento sin presentarse el período del descanso cuando son activados los CB1R, efecto que se aprecia en la H2 de registro para la ABC del tiempo de alimentación y el descanso respectivamente en las diferentes condiciones (Anexo ABC alimentación, Fig. 35, 38, 41 y 44) y (Anexo ABC descanso Fig. 36, 39, 42 y 45). Los agonistas del sistema serotoninérgico previenen el tiempo de alimentación en la H2 de registro (Fig. 35, 38, 41 y 44), apreciándose el período del descanso en la H2 de registro (Fig. 36, 39, 42 y 45). En cuanto a la actividad, no presentan diferencias significativas en las diferentes condiciones (Fig. 37, 40, 43 y 46).

En resumen nuestros resultados nos sugieren que, el efecto hiperfágico de la de la activación de los CB1R de manera sistémica se caracteriza por un incremento de la ingesta de carbohidratos y la prevención de la secuencia de saciedad natural. Además, tanto *in vitro* como *in vivo*, los sistemas serotoninérgico y GABAérgico están involucrados en los efectos hiperfágicos de la activación de los CB1R en el NPH. Por otra parte, los receptores serotoninérgicos involucrados son el 5-HT_{1A} y el 5-HT_{1B}. Los receptores 5-HT_{2A/2C} no modulan la liberación de GABA pero si previenen los efectos del agonista de los CB1R, lo cual nos sugiere que están participando a través de la modulación de otro sistema de neurotransmisión.

9. Conclusión

Los resultados del presente estudio sugieren que el sistema endocanabinoide es un importante modulador de la conducta alimentaria, tanto a nivel periférico como central, y que a este nivel desempeñan un papel clave en la inhibición de señales saciatorias. De manera sistémica la activación de los CB1R induce una hiperfagia que se caracteriza por un incremento de la ingesta de carbohidratos y la inhibición de la secuencia de saciedad conductual. A nivel central, los hallazgos mostrados en el presente estudio sugieren una interacción entre los sistemas endocanabinoide, serotoninérgico y GABAérgico a nivel hipotalámico para la regulación del comportamiento alimentario a nivel del NPH. La modulación de la transmisión serotoninérgica podría ser uno de los mecanismos involucrados en los efectos hiperfágicos de la activación de los CB1R en el NPH. Dicho efecto podría relacionarse a su vez con la modulación de la liberación de 5-HT y GABA, por medio de la inhibición de la liberación de 5-HT y como consecuencia la desinhibición de la liberación de GABA, además de que los posibles receptores serotoninérgicos involucrados en dicho efecto podrían corresponder con los subtipos 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}.

10. Perspectivas

La obesidad predispone a los individuos a incrementar los riesgos de padecer enfermedades como la diabetes tipo II, las enfermedades cardiovasculares entre ellas la hipertensión, además de cáncer. Por ello es importante poder dilucidar los mecanismos conductuales y neuroquímicos que estén interviniendo en la regulación de la homeostasis energética, la ingesta de alimento y el peso corporal así como en los procesos hedónicos que predispongan a padecer este padecimiento, en consecuencia, para proponer blancos terapéuticos con el fin de regular los mecanismos neuroquímicos para disminuir la prevalencia de la obesidad. Con los resultados obtenidos podemos sugerir que el sistema de endocannabinoides en el NPH juega un papel importante en la regulación de la conducta alimentaria afectando específicamente el consumo de componentes específicos de la dieta y mecanismos conductuales selectivos (estimulación del hambre e inhibición de la saciedad). Además de que los sistemas que posiblemente están interactuando son el sistema serotoninérgico y GABAérgico, señales que inhiben o estimulan la ingesta de alimento. El estudiar el mecanismo neuroquímico y conductual del sistema endocanabinoide es de gran importancia para entender su participación en patologías como obesidad y así proponer posibles blancos terapéuticos. Aún hay muchos estudios por realizar para ampliar el conocimiento sobre la participación de diferentes sistemas de neurotransmisión, péptidos u hormonas involucrados en la regulación de la alimentación y que participan en los efectos del sistema de endocannabinoides. Por lo tanto se propone:

A nivel central

- Evaluar *in vitro* la liberación de glutamato mediante la activación de los receptores CB1 en el NPH, además de evaluar la interacción entre el sistema endocanabinoide y los receptores 5-HT_{2C} sobre la liberación de glutamato. Estudios previos han mostrado que el glutamato es considerado una señal orexigénica.

- Evaluar *in vivo* los cambios en los niveles de aminas biogénicas (noradrenalina, dopamina y serotonina) y aminoácidos (GABA, Glu) en el NPH producidos por la activación y bloqueo de los receptores a cannabinoides CB1.
- En base a los resultados obtenidos, estudiar la interacción de estos sistemas (endocanabinoide, serotoninérgico y GABAérgico) en la modulación de CRH y TRH (señales anorexigénicas).

10. Bibliografía

- Alger, B. E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol.* 68, 247-286.
- Anand, B. K. & Brobeck, J. R. (1951). Localization of feeding center in the hypothalamus of the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 11, 323-324.
- Anderson-Baker, W. C., McLaughlin, C. L., & Baile, C. A. (1979). Oral and hypothalamic injections of barbiturates, benzodiazepines and cannabinoids and food intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav,* 11(5), 487-491.
- Arnt, J. & Schell-Krüger, J. (1979). GABA in the ventral tegmental area: differential regional effects on locomotion, aggression and food intake after microinjection of GABA agonists and antagonists. *Life Sciences.* 25(15), 1351-1360.
- Aronne, L. J. (2002). Obesity as a disease: etiology, treatment, and management considerations for the obese patient. *Obesity Research.* 2, 95S-96S.
- Aronne, L. J. & Thornton-Jones, Z. D. (2007). New targets for obesity pharmacotherapy. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 81(5), 748-752.
- Arora, S. & Anubhuti. (2006). Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity—a review. *Neuropeptides,* 40(6), 375-401.
- Avraham, Y., Menachem, A. B., Okun, A., Zlotarav, O., Abel, N., Mechoulam, R. & Berry, E. M. (2005). Effects of the endocannabinoid noladin ether on

- body weight, food consumption, locomotor activity, and cognitive index in mice. *Brain Research Bulletin*, 65(2), 117-123.
- Bellocchio, L., Cervino, R., Pasquali, U. & Pagotto, U. (2008). The endocannabinoid system and energy metabolism. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 850-857.
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A., & Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, 277(5329), 1094-1097.
- Berger, M., Gray, J. A. & Roth, B. L. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*, 60, 355-366.
- Best, A. R. & Regehr, W. G. (2008). Serotonin evokes endocannabinoid release and retrogradely suppresses excitatory synapses. *The Journal of Neuroscience*, 28(25), 6508-6515.
- Blundell, J. (1991). Pharmacological approaches to appetite suppression. *Trends in Pharmacological Sciences*. 12(4), 147-157.
- Bramley, J. R., Sollars, P. J., Pickard, G. E., Dudek, F. E. (2005). 5-HT_{1B} receptor-mediated presynaptic inhibition of GABA release in the suprachiasmatic nucleus. *The Journal of Neurophysiology*. 93, 3157-3164.
- Breivogel, C. S., Selley, D. E. & Childers, S. R. (1998). Cannabinoid receptors agonist efficacy for stimulating [35S]GTPγS binding to rat cerebellar membranes correlates with agonist-induced decreases in GDP affinity. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(27), 16865-16873.
- Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L., & Piomelli, D. (1996).

- Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *The Journal of Neuroscience*, 16(12), 3934-3942.
- Childers, S. R. & Deadwyler, S. A. (1996). Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 52(6), 819-827.
- Childers, S. R., Pacheco, M. A., Bennett, B. A., Edwards, T. A., Hampson, R. E., Mu, J., et al. (1993). Cannabinoid receptors: G-protein-mediated signal transduction mechanisms. *Biochemical Society Symposium*, 59, 27-50.
- Collin, M., Bäckberg, M., Onnestam, K. & Meister, B. (2002). 5-HT_{1A} receptor immunoreactivity in hypothalamic neurons involved in body weight control. *Neuroreport*, 13(7), 945-951.
- Colombo, G., Agabio, R., Fa, M., Guano, L., Lobina, C., Loche, A., Reali, R. & Gessa, G. L. (1998). Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol-preferring sP rats by the cannabinoid antagonist SR-141716. *Alcohol Alcohol*, 33(2), 126-130.
- Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., Grübler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thöne-Reineke, C., Ortmann, S., Tomassoni, F., Cervino, C., Nisoli, E., Linthorst, A. C., 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.
- Cruz-Martínez, A. M., González-Hernández, B., Cendejas-Trejo, N. M., Mancilla-Díaz, J. M., Florán-Garduño, B. & Escartín-Pérez, R. E. (2010). Inhibición de la saciedad alimentaria inducida por activación de los receptores CB1 hipotalámicos. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*. 36, 39-51.
- Després, J. P., Golay, A., Sjöström, L. (2005). Rimonabant in Obesity Lipids

- Study Group. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med.* 353(20), 2121-2134.
- Devane, W. A., Dysarz, F. A. r., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34(5), 605-613.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., et al. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946-1949.
- Di Marzo, V., Goparaju, S. K., Wang, L., Liu, J., Batkai, S., Jarai, Z., Fezza, F., Miura, G. I., Palmiter, R. D., Sigiura, T. & Kunos, G. (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, 410(6830), 822-825.
- Di Marzo, V. & Matias, I. (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nature Neuroscience*, 8(5), 585-589.
- Ebenezer, I. S. & Baldwin, B. A. (1990). Effect of intracerebroventricular administration of the GABA_B-receptor agonist baclofen on operant feeding in satiated pigs. *British Journal of Pharmacology*. 101, 559-562.
- Egashira, N., Mishima, K., Katsurabayashi, S., Yoshitake, T., Matsumoto, Y., Ishida, J., Yamaguchi, M., Iwasaki, K. & Fujiwara, M. (2002). Involvement of 5-hydroxytryptamine neuronal system in Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced impairment of spatial memory. *European Journal of Pharmacology*, 445(3), 221-229.
- Elmqvist, J. K., Bjorbaek, C., Ahima, R. S., Flier, J. S., & Saper, C. B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *The Journal*

of Comparative Neurology, 395(4), 535-547.

Elmqvist, J. K., Elias, C. F., & Saper, C. B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, 22(2), 221-232.

Elphick, M. R., & Egertová M. (2001). The neurobiology and evolution of cannabinoid signaling. *The Royal Society*, 356, 381-408.

Fegley, D., Kathuria, S., Mercier, R., Li, C., Goutopoulos, A., Makriyannis, A., et al. (2004). Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(23), 8756-8761.

Felder, C. C., Briley, E. M., Axelrod, J., Simpson, J. T., Mackie, K., & Devane, W. A. (1993). Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90(16), 7656-7660.

Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Glass, M., Mackie, K. P., Fahey, K. J., et al. (1998). LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 284(1), 291-297.

Fernandez-Ruiz, J., Lastres-Becker, I., Cabranes, A., Gonzalez, S., & Ramos, J. A. (2002). Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66(2-3), 257-267.

- Flier, J. S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, 116(2), 337-350.
- Flier, J. S., Harris, M. & Hollenberg, A. N. (2000). Leptin, nutrition, and the thyroid: the why, the wherefore, and the wiring. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(7), 859-861.
- Freedland, C. S. Sharpe, A L., Samson, H. H. & Porrino, L. J. (2001). Effects of SR141716A on ethanol and sucrose self-administration. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 25(2), 277-282.
- Friedman, J. M. & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 395(6704), 763-770.
- Gale, S. M., Castracane, V. D., & Mantzoros, C. S. (2004). Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *The Journal of Nutrition*, 134(2), 295-298.
- Gamber, K. M., Macarthur, H., & Westfall, T. C. (2005). Cannabinoids augment the release of neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Neuropharmacology*, 49(5), 646-652.
- Gao, P., Harvey, M., Mook, D. G., & Zeigler, H. P. (1998). A "pre-satiety sequence" in rats drinking sucrose solutions. *Physiology and Behavior*, 65(2), 355-359.
- Gatley, S. J., Gifford, A. N., Volkow, N. D., Lan, R., & Makriyannis, A. (1996). 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *European Journal of Pharmacology*,

307(3), 331-338.

Gatley, S. J., Lan, R., Volkow, N. D., Pappas, N., King, P., Wong, C. T., Gifford, A. N., Pyatt, B., Dewey, S. L. & Makriyannis, A. (1998). Imaging the brain marijuana receptor: development of a radioligand that binds to cannabinoid CB1 receptors in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 70(1), 417-423.

Giuffrida, A., Beltramo, M., & Piomelli, D. (2001). Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(1), 7-14.

Glass, M., Dragunow, M. & Faull, R. L. (1997). Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*, 77(2), 299-318.

Gómez, R., Navarro, M., Ferrer, B., Trigo, J. M., Bilbao, A., Del Arco, I., Cippitelli, A., Nava, F., Piomelli, D. & Rodríguez de Fonseca, F. (2002). A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *The Journal of Neuroscience*, 22(21), 9612-9617.

González, B., Paz, B., Florán, L., Aceves, J., Erlij, D. & Florán, B. (2009). Cannabinoid agonists stimulated [³H]GABA release in the globus pallidus of the rat when Gi protein-receptor coupling is restricted: role of Dopamine D2 receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(3), 822-828.

Grandison L. & Guidotti, A. (1977). Stimulation of intake by muscimol and β -endorphin. *Neuropharmacology*, 16, 533-536.

Griebel, G., Stemmelin, J. & Scatton, B. (2005). Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biological Psychiatry*, 57(3), 261-267.

- Grossman, S. P., Dacey, D., Halaris, A. E., Collier, T. & Routtenberg, A. (1978). Aphagia and adipsia after preferential destruction of nerve cell bodies in hypothalamus. *Science*. 202(4367), 537-539.
- Grove, K. L. & Smith, M. S. (2003). Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiology & Behavior*, 79(1), 47-63.
- Hagemann, L. F., Costa, C. V., Zeni, L. Z., Freitas, C. G., Marino-Neto, J. & Paschoalini, M. A. (1998). Food intake after adrenaline and noradrenaline injections into the hypothalamic paraventricular nucleus in pigeons. *Physiology and Behavior*. 64(5), 645-652.
- Halford, J. C. & Blundell, J. E. (1996). The 5-HT_{1B} receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioral satiety sequence. *Physiology and Behavior*, 60(3), 933-939.
- Halford, J. C., Wanninayake, S. C., & Blundell, J. E. (1998). Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 61(2), 159-168.
- Hampson, R. E. & Deadwyler, S. A. (1999). Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sci*, 65(6-7), 715-723.
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., Kustanovich, I. & Mechoulam, R. (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(7), 3662-3665.

Hanus, I., Gopher, A., Almog, S. & Mechoulam, R. (1993). Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *The Journal of Medical Chemistry*. 36(20), 3032-3034.

Häring, M., Marsicano, G., Lutz, B. & Monory, K. (2007). Identification of the cannabinoid receptor type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice. *Neuroscience*. 146(3), 1212-1219.

Harrold, J., Dovey, T. M., Blundell, J. E. & Halford, J. C. G. (2012). CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*. 63, 3-17.

Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R. & Rice, K. C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87(5), 1932-1936.

Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R. & Rice, K. C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of Neuroscience*. 11(2), 563-583.

Hetherington, A. W. & Ranson, S. W. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anatomical Record*. 78, 149-172.

Higgs, S., Williams, C. M. & Kirkham, T. C. (2003). Cannabinoid influences on palatability: microstructural analysis of sucrose drinking after delta(9)-tetrahydrocannabinol, anandamida, 2-arachidonoyl glycerol and SR 141716. *Psychopharmacology*, 165(4), 370-377.

Hillard, C. J. (2000). Endocannabinoids and vascular function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*, 294(1), 27-32.

- Hillard, C. J., Manna, S., Greenberg, M. J., DiCamelli, R., Ross, R. A., Stevenson, L. A., et al. (1999). Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(3), 1427-1433.
- Hillebrand, J. J., de Wied, D. & Adan, R. A. (2002). Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides*, 23(12), 2283-2306.
- Ho, S. S., Chow, B. K. & Yung, W. H. (2007). Serotonin increase the excitability of the hypothalamic paraventricular nucleus magnocellular neurons. *European Journal of Neuroscience*, 25, 2991-3000.
- Horvath, T. L., Bechmann, I., Naftolin, F., Kalra, S. P. & Leranth, C. (1997). Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Research*. 756, 283-286.
- Howlett, A. C. (1995). Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 35, 607-634.
- Howlett, A. C. (1998). The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiology of Disease*. 5(6 Pt B), 405-416.
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., et al. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54(2), 161-202.
- Jamshidi, N. & Taylor, D. A. (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *British Journal of Pharmacology*, 134(6), 1151-1154.

- Jonnakuty, C. & Gragnoli, C. (2008). What do we know about serotonin?. *Journal of Cellular Physiology*, 217(2), 301-306.
- Kalra, S. P., Dube, M. G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T. L. & Kalra, P. S. (1999). Interacting appetite-regulating pathways hypothalamic regulation of body weight. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*. 20(1), 68-100.
- Kelly, J., Alheid, G. F., Newberg, A. & Grossman, S. P. (1977). GABA stimulation and blockade in the hypothalamus and midbrain: effects on feeding and locomotor activity. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*. 7, 537-541.
- Kelly, J. & Grossman, S. P. (1980). GABA and hypothalamic feeding system. *Brain Res Bull*. 5, 237-244.
- Kelly, J., Rothstein, J. & Grossman, P. (1979). GABA and Hypothalamic Feeding System. I. Topographic Analysis of the Effects of Microinjections of Muscimol. *Physiology & Behavior*. 23, 1123-1134.
- King, P. J. & Williams, G. (1998). Role of ARC NPY neurons in energy homeostasis. *Drug News Perspect*, 11(7), 402-410.
- Kirkham, T. C. (2005). Endocannabinoids in the regulation of appetite and body weight. *Behavioural Pharmacology*, 16(5-6), 297-313.
- Kirkham, T. C. & Williams, C. (2001). Endogenous cannabinoids and appetite. *Nutrition Research Reviews*, 14(1), 65-86.
- 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), 550-557.
- Kishimoto, K., Koyama, S. & Akaike, N. (2001). Synergistic mu-opioid and 5-HT_{1A} presynaptic inhibition of GABA release in rat periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacology*, 41(5), 529-538.
- Koch, J. E. (2001). Delta(9)-THC stimulates food intake in Lewis rats: effects on chow, high-fat and sweet high-fat diets. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 68(3), 539-543.
- Kojima, M., Hosodo, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., & Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402, 656-660.
- Krieger, M. S., Conrad, L. C. & Pfaff, D. W. (1979). An autoradiographic study of the efferent connections of the ventromedial nucleus of hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology*, 183(4), 785-815.
- Kuhar, M. J. & Dall Vechia, S. E. (1999). CART peptides: novel addiction- and feeding-related neuropeptides. *Trends Neuroscience*, 22(7), 316-320.
- Lam, D. D., Przydzial, M. J., Ridley, S. H., Yeo, G. S., Rochford, J. J., O'Rahilly, S. & Heisler, L. K. (2008). Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. *Endocrinology*, 149(3), 1323-1328.
- Lan, R., Gatley, J., Lu, Q., Fan, P., Fernando, S. R., Volkow, N. D., et al. (1999). Design and synthesis of the CB₁ selective cannabinoid antagonist AM281: a potential human SPECT ligand. *AAPS Pharm Sci.*, 1(2), E4.
- Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A. & Goglia, F. (2003). Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Letters*, 543(1-3), 5-10.

- Larsen, P. J., Hay, S. A., Vrang, N. & Mikkelsen, J. D. (1996). Origin of projections from the midbrain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: a combined retrograde and anterograde tracing study. *Neuroscience*, 70, 963-988.
- Lee, K. S., Han, T. H., Jo, J. Y., Kang, G., Lee, S. Y., Ryu, P. D., Im, J. H., Jeon, B. H. & Park, J. B. (2008). Serotonin inhibits GABA synaptic transmission in presympathetic paraventricular nucleus neurons. 439, 138-142.
- Lee, M. D. & Simansky, K. J. (1997). Cp-94,253: a selective serotonin_{1B} (5-HT_{1B}) agonist that promotes satiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 131(3), 264-270.
- Le Feuvre, R. A., Aisenthal, L. & Rothwell, N. J. (1991). Involvement of corticotrophin releasing factor (CRF) in the thermogenic and anorexic actions of serotonin (5-HT) and related compounds. (1991). *Brain Research*, 555(2), 245-250.
- Leibowitz, S. F. & Alexander, J. T. (1998). Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biological Psychiatry*, 44(9), 851-864.
- Leibowitz, S. F., Weiss, G. F. & Suh, J. S. (1990). Medial hypothalamic nuclei mediate serotonin's inhibitory effect on feeding behavior. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 37(4), 473-504.
- Leibowitz, S. F. & Wortley, K. E. (2004). Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides*, 25(3), 473-504.
- López-Alonso, V. E., Mancilla-Díaz, J. M., Rito-Domingo, M., González-

- Hernández, B., Escartín-Pérez, R. E. (2007). The effects of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2C} receptor agonists on behavioral satiety sequence in rats. *Neuroscience Letters*. 416, 285-288.
- Mackie, K., Devane, W. A., & Hille, B. (1993). Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Molecular Pharmacology*, 44(3), 498-503.
- Mackie, K. & Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89(9), 3825-3829.
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., & Mitchell, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *The Journal of Neuroscience*, 15(10), 6552-656
- Madsen, A. N., Jelsing, J., van de Wall, E.H., Vrang, N., Larsen, P.J. & Schwartz, G. J. (2009). Rimonabant induced anorexia in rodents is not mediated by vagal or sympathetic gut afferents. *Neuroscience Letters*, 449(1), 20-23.
- Malacara, J. M. (2004). Mecanismos regulatorios de la ingestión de alimentos ¿Al fin un tratamiento a la vista? *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 12, 188-198.
- Makarenko, I. G., Meguid, M. M. & Ugrumov, M. V. (2002). Distribution of serotonin 5-hydroxytryptamine 1B (5-HT(1B)) receptors in the normal rat hypothalamus. *Neuroscience Letters*. 328(2), 155-159.
- Makarenko, I. G., Meguid, M. M., Gatto, L., Goncalves, C. G., Ramos, E. J., Chen, C. & Ugrumov, M.V. (2003). Hypothalamic 5-HT1B-receptor changes in anorectic tumor bearing rats. *Neuroscience Letters*. 376(2), 71-

75.

Magalhaes, C. P., de Freitas, M. F., Nogueira, M. I., Campina, R. C., Takase, L. F., de Souza, S. L. & de Castro, R. M. (2010). Modulatory role of serotonin on feeding behavior. *Nutritional Neuroscience*. 13(6), 246-255.

Mancilla-Díaz, J. M., Escartín-Pérez, R. E., López-Alonso, V. E. & Cruz-Morales, S. E. (2002). Effect of 5-HT in mianserin-pretreated rats on the structure of feeding behavior. *European Neuropsychopharmacology*. 12(5), 445-451.

Marsicano, G. & Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *The European Journal of Neuroscience*. 11(12), 4213-4225.

Marston, O. J., Garfield, A. S. & Heisler, L. K. (2011). Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. *European Journal of Pharmacology*, 660(1), 70-79.

Matias, I. & Di Marzo, V. (2007). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 18(1), 27-37.

Matsuda, L. A., Bonner, T. I. & Lolait, S. J. (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*. 327(4), 535-550.

Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561-564.

McAllister, S. D., Griffin, G., Satin, L. S., & Abood, M. E. (1999). Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a xenopus oocyte expression system. *Journal of*

Pharmacology and Experimental Therapeutics. 291(2), 618-626.

McGuirk, J., Muscat, R., & Willner, P. (1992). Effects of the 5-HT uptake inhibitors, femoxetine and paroxetine, and a 5-HT_{1A/B} agonist, eltoprazine, on the behavioural satiety sequence. *Pharmacology Biochemistry, and Behavior*, 41(4), 801-805.

McGuirk, J., Muscat, R. & Willner, P. (1992). Effects of chronically administered fluoxetine and fenfluramine on food intake, body weight and the behavioural satiety sequence. *Psychopharmacology*, 106(3), 401-407.

McMillen, I. C., Adam, C. L. & Mühlhäusler, B. S. (2005). Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. *The Journal of Physiology*, 565(1), 9-17.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50(1), 83-90.

Meguid, M. M., Fetissov, S. O., Varma, M., Sato, T., Zhang, L., Laviano, A., et al. (2000). Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition*, 16(10), 843-857.

Mei, M. H. & Chen, Q. (1985). Interaction of vagal stimulation and duodenal acidification in the regulation of pancreatic secretion. *Sheng Li Xue Bao*. 37, 410-415.

Meister, B. (2000). Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam Horm*, 59, 265-304.

Meister, B. (2007). Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiology & Behavior*, 92(1-

2), 263-271.

Menzies, J. R, Ludwing, M. & Leng, G. (2010). Direct and indirect effects of cannabinoids on in vitro GABA release in the rat arcuate nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(6), 585-592.

Milke, P. & Carmona, R. (2004). Nutrición y gastroenterología. Temas selectos. *Edit. Masson Doyma México, 1a ed.*

Moga, M. M. & Saper, C. B. (1994). Neuropeptide-immunoreactive neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 346(1), 137-150.

Moreno, F. L., López, O. J., Jiménez, J. R., Martín, R., & Miranda, O. M. (1991). Alteraciones cardiovasculares en la obesidad. X Forum Nacional de Ciencias Médicas, Matanzas.

Morlans JA. (2001). La obesidad: factor de riesgo de la cardiopatía isquémica. *Rev Cub Cardio. Cardiovas*, 15, 36-39.

Morley, J. E., Levine, A. S. & Kneip, J. (1981). Muscimol induced feeding: a model to study the hypothalamic regulation of appetite. *Life Science*. 29, 1213-1218.

Moschos, S., Chan, J. L., & Mantzoros, C. S. (2002). Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril*, 77(3), 433-444.

Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, *Nature*, 365(6441), 61-65.

Nakazi, M., Bauer, U., Nickesl, T., Kathamann, M. & Schlicker, E. (2000). Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic

- cannabinoid CB₁ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 361(1), 19-24.
- Nijenhuis, W. A., Oosterom, J. & Adan, R. A. (2001). AgRP (83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Molecular Endocrinology*, 15(1), 164-171.
- Nonogaki, K., Strack, A. M., Dallman, M. F. & Tecott, L. H. (1998). Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT_{2C} receptor gene. *Nature Medicine*, 4(10), 1152-1156.
- Osei-Hyiaman, D., Depetrillo, M., Harvey-White, J., Bannon, A. W., Cravatt, B. F., Kuhar, M. J., Mackie, K., Palkovits, M. & Kunos, G. (2005). Cocaine-and amphetamine-related transcript is involved in the orexigenic effect of endogenous anandamida. *Neuroendocrinology*, 81(4), 273-282.
- Palazzo, E., de Novellis, V., Petrosino, S., Marabese, I., Vita, D., Giordano, C., Di Marzo, V., Mangoni, G. S., Rossi, F. & Maione, S. (2006). Neuropathic pain and the endocannabinoid system in the dorsal raphe: pharmacological treatment and interactions with the serotonergic system. *The European Journal of Neuroscience*, 24(7), 2011-2020.
- Park, S., Harrold, J. A., Widdowson, P. S. & Williams, G. (1999). Increased binding at 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{2A} receptors and 5-HT transporters in diet-induced obese rats. *Brain Research*, 847(1), 90-97.
- Parolaro, D. (1999). Presence and functional regulation of cannabinoid receptors in immune cells. *Life Science*, 65(6-7), 637-644.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998). The Rat Brain in stereotaxic coordinates. 4th ed.

- Pazos, A. & Palacios, J. M. (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Research*, 346(2), 205-230.
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(11), 873-884.
- Pi-Sunyer, F. X., Aronne, L. J., Heshmati, H. M., Devin, J., Rosenstock, J.; RIO-North America Study Group. (2006). Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*, 295(7), 761-765.
- Pu, S., Jain, R.M., Horvath, L. T., Diano, S., Kalra S. & Kalra P.S. (1999). Interactions between Neuropeptide Y and γ -Aminobutyric Acid in Stimulation of Feeding: A Morphological and Pharmacological Analysis. *Endocrinology*, 140(2), 933-940.
- Ravinet Trillou, C., Arnone, M., Delgorge, C., Gonalons, N., Keane, P., Maffrand, J. P. & Soubrie, P. (2003). Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(2), R345-353.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Congy, C., Martinez, S., Oustric, D., Perio, A., et al. (2004). SR147778 [5-(4-bromophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-ethyl-N-(1-piperidinyl)-1H-pyr azole-3-carboxamide], a new potent and selective antagonist of the CB1 cannabinoid receptor: biochemical and pharmacological characterization. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(3), 905-914.

- Rodríguez, U., Carrillo, E. & Guzmán, E. (2005). Canabinoides: neurobiología y usos médicos. *Elementos, Ciencia y Cultura*, 12(60), 3-9.
- Rodriguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Bermudez-Silva, F. J., Bilbao, A., Cippitelli, A. & Navarro, M. (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol and Alcoholism*, 40(1), 2-14.
- Rodriguez-Gaztelumendi, A., Rojo, M. L., Pazos, A. & Díaz, A. (2009). Altered CB receptor-signaling in prefrontal cortex from an animal model of depression is reversed by chronic fluoxetine. *Journal of Neurochemistry*, 108(6), 1423-1433.
- Romeo, G. R., Lee, J. & Schoelson, S. E. (2012). Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation—mechanisms and therapeutic targets. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 32(8), 1771-1776.
- Rosenbaum, M., Leibel, R. L. & Hirsch, J. (1997). Obesity. *The New England Journal of Medicine*, 337(6), 396-407.
- Satoh, N., Ogawa, Y., Katsuura, G., Tsuji, T., Masuzaki, H., Hiraoka, J., Okazaki, T., Tamaki, M., Hayase, M., Yoshimasa, Y., Nishi, S., Hosoda, K. & Nakao, K. (1997). Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: Evidence for the loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. *Endocrinology*, 138, 947-954.
- Sawchenko, P. E. & Swanson, L. W. (1983). The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 218(2), 121-144.

- Sawchenko, P. E., Swanson, L. W., Steinbusch, H. W. & Verhofstad, A. A. (1983). The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Research*, 277(2), 355-360.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D. Jr., Seeley, R. J. & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778), 661-671.
- Shire, D., Carrillon, C., Kaghad, M., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Caput, D. & Ferrara, P. (1995). An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(8), 3726-3731.
- Shoelson, S. E., Herrero, L. & Naaz, A. (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*, 132(6), 169-180.
- Showalter, V. M., Compton, D. R., Martin, B. R. & Abood, M. E. (1996). Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278(3), 989-999.
- Sim, L. J., Selley, D. E. & Childers, S. R. (1995). In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma-[35S]thio]-triphosphate binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7242-7246.
- Simiand, J., Keane, M., Keane, P. E. & Soubrié, P. (1998). SR 141716, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, selectively reduces sweet food intake in marmoset. *Behavioural Pharmacology*, 9(2), 179-181.

Sims, J. S. & Lorden J. F. (1986). Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels. *Behavioural Brain Research*, 22(3), 265-281.

Spiegelman, B. M. & Flier J. S. (2001). Obesity and the regulation of energy. *Cell*, 104, 531-543.

Stanley, B. G. & Leibowitz, S. (1985). Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(11), 3940-3943.

Stanley, B. G., Willet, V. L., Donias, H. W., Ha, L. H. & Spears, L. C. The Lateral hypothalamus: a primary site mediating excitatory amino acid-elicited eating. *Brain Research*, 630(1-2), 41-49.

Stella, N., Schweitzer, P. & Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388(6644), 773-778.

Stratford, T. R. & Kelley, A. E. (1997). GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *The Journal of Neuroscience*, 17, 4434-4440.

Swanson, L. W. & Sawchenko, P. E. (1983). Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annual Review of Neuroscience*, 6, 269-324.

Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Bérrod, A., Hartman, B. K., Helle, K. B. & Van Orden, D. E. (1981). An immunohistochemical study of the organization of catecholaminergic cells and terminal fields in the paraventricular and

- supraoptic nuclei of the hypothalamus. *The Journal of comparative Neurology*, 196, 190-195.
- Tasker, J. G. (2006). Rapid glucocorticoid actions in the hypothalamus as a Mechanism of Homeostatic integration. *Obesity*, 14, 259S-265S.
- Tecott, L. H. (2007). Serotonin and the orchestration of energy balance. *Cell Metabolism*, 6(5), 352-361.
- Tecott, L. H., Sun, L., Akana, S., Strack, A., Lowenstein, D., Dallman, M. & Julius, D. (1995). Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors. *Nature*, 374(6522), 542-546.
- Teff, K. (2000). Nutritional implications of the cephalic-phase reflexes: endocrine responses. *Appetite*, 34, 206-213.
- Traynor, K. (2007). Panel advises against rimonabant approval. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 64(14), 1460-1461.
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M. C., Macki, K. & Walker, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83(2), 393-411.
- Tsujii, S. & Bray, G. A. (1991). GABA-related feeding control in genetically obese rats. *Brain Research*, 540, 48-54.
- Van Gaal, L. F., Rissanen, A. M., Scheen, A. J., Ziegler, O., & Rossner, S. (2005). Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*, 365(9468), 1389-1397.

- Verty, A. N., McGregor, I.S., & Mallet, P. E. (2005). Paraventricular hypothalamic CB(1) cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology*, 49(8), 1101-1109.
- Vickers, S. P., Clifton, P. G., Dourish, C. T., & Tecott, L. H. (1999). Reduced satiating effect of d-fenfluramine in serotonin 5-HT(2C) receptor mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 143(3), 309-314.
- Vickers, S. P. & Kennett, G. A. (2005). Cannabinoids and the regulation of ingestive behaviour. *Current Drug Targets*, 6(2), 215-223.
- Waldbilling, R. J., Bartness, T. J. & Stanley, B. G. (1981). Increased food intake, body weight, and adiposity in rats after regional neurochemical depletion of serotonin. *J Comp Physiol Psycho*,. 95(3), 391-405.
- Walther, D. J. & Bader, M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochemical Pharmacology*, 66(9), 1673-1680.
- Wellman, P. J. (2000). Norepinephrine and the control of food intake. *Nutrition*, 16(10), 837-842.
- Werther, G. A., Hogg, A., Oldfield, B. J., McKinley, M. J., Figdor, R., Allen, A. M., et al. (1987). Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology*, 121(4), 1562-1570.
- Westlake, T. M., Howlett, A. C., Bonner, T. I., Matsuda, L. A. & Herkenham, M. (1994). Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains.

Neuroscience, 63(3), 637-652.

Williams, C. M. & Kirkham, T. C. (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 143(3), 315-317.

Williams, G., Bing, C., Cai, X. J., Harrold, J. A., King, P. J., & Liu, X. H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis. Different circuits, different purposes. *Physiology and Behavior*, 74(4-5), 683-771.

Wilson, R. I. & Nicoll, R. A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*. 296, 678-682.

Wisse, B. E. & Schwartz, M. W. (2001). Role of melanocortins in control of obesity. *Lancet*, 358(9285), 857-859.

Yan, Q. S. & Yan, S. E. (2001). Serotonin-1B receptor-mediated inhibition of [(3)H]GABA release from rat ventral tegmental area slices. *Journal of Neurochemistry*, 79(4), 914-922.

Yun, R., Dourmashkin, J. T., Hill, J., Gayles, E. C., Fried, S. K., & Leibowitz, S. F. (2005). PVN galanin increases fat storage and promotes obesity by causing muscle to utilize carbohydrate more than fat. *Peptides*, 26(11), 265-2273.

Zhang, Y., Damjanoska, K. J., Carrasco, G. A., Dudas, B., D'Souza, D. N., Tetzlaff, J., Garcia, F., Hanley, N. R., Scripathirathan, K., Petersen, B. R., Gray, T. S., Battaglia, G., Muma, N. A. & Van de Kar, L. D. (2004). Evidence that 5-HT_{2A} receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus mediate neuroendocrine responses to (-) DOI. *The Journal of Neuroscience*, 22(21), 9635-9642.

11. ANEXO [Área Bajo la Curva (ABC) de los datos de la SSC]

El cálculo del ABC nos permitió realizar un análisis cuantitativo de la SSC.

11.1

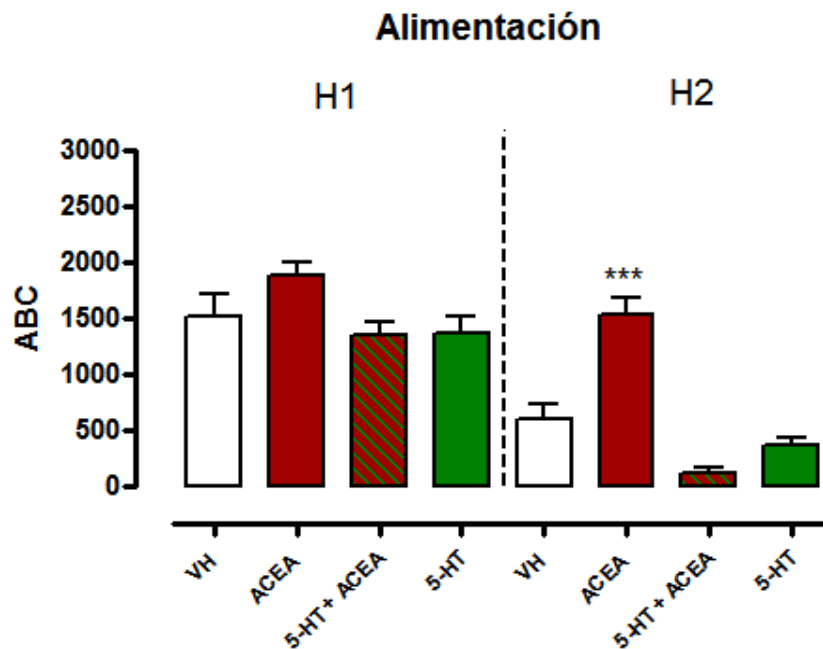


Figura 35. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para alimentarse. Vehículo (VH, n= 6), ACEA (0.25 μ g, n=7), 5-HT (2.0 μ g, n= 5) o 5-HT + ACEA (n= 4). (hora de registro x tratamiento) ($F_{(3, 36)} = 3.662$; $p < 0.05$); Factor tratamiento ($F_{(3, 18)} = 19.35$; $p < 0.0001$); factor hora de registro ($F_{(3, 18)} = 71.61$; $p < 0.0001$); *post hoc* de Bonferroni *** $p < 0.001$ en la hora 2 de registro (H2).

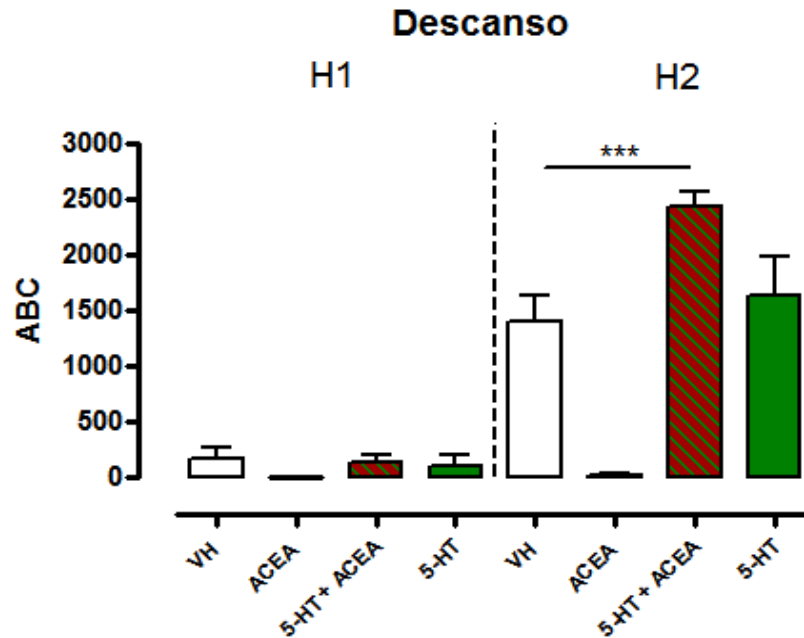


Figura 36. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para descansar. Vehículo (VH, n= 6), ACEA (0.25 μ g, n=7), 5-HT (2.0 μ g, n= 5) o 5-HT y ACEA (n= 4). Interacción (hora registro x tratamiento) ($F_{(3, 36)}= 19.10$; $p<0.0001$); Factor tratamiento ($F_{(3,18)}= 24.45$; $p<0.0001$); factor hora de registro ($F_{(3,18)}= 129.2$; $p< 0.0001$); *post hoc* de Bonferroni $p<0.001^{**}$.

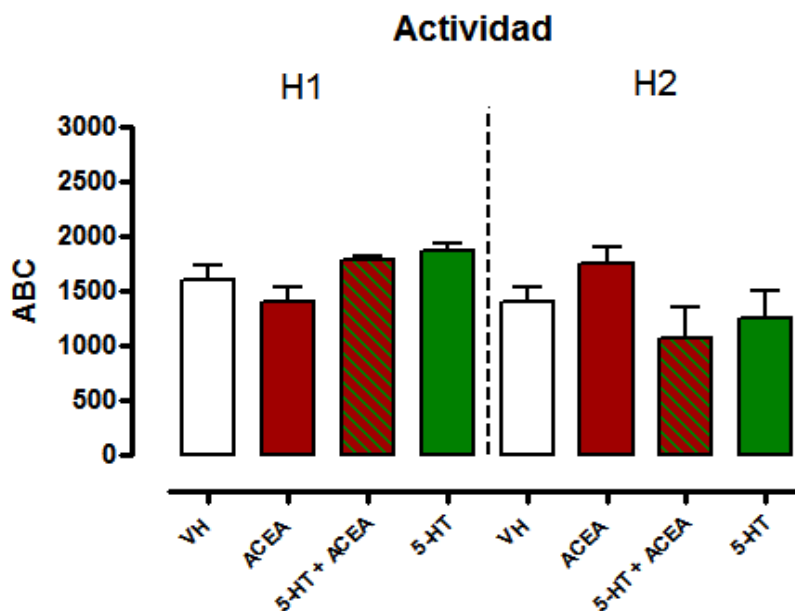


Figura 37. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para realizar otra actividad. (Vehículo VH, n=6), ACEA (0.25 μ g, n=7), 5-HT (2.0 μ g, n= 5) o 5-HT y ACEA (n= 4).

11.2

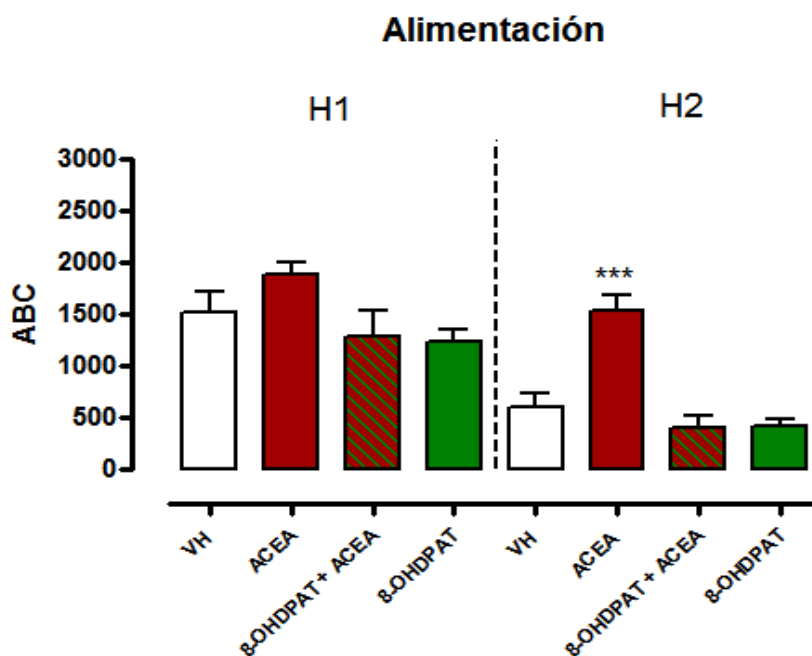


Figura 38. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para alimentarse. Vehículo (VH, n= 6), ACEA (0.25 μ g; n=7), 8-OHDPAT (0.1 μ g; n= 5) o 8-OHDPAT y ACEA (n= 5). Factor tratamiento ($F_{(3,19)}= 14.90$; $p<0.0001$); factor hora de registro ($F_{(3,19)}= 43.21$; $p< 0.0001$); *post hoc* de Bonferroni *** $p<0.01$ en la H2

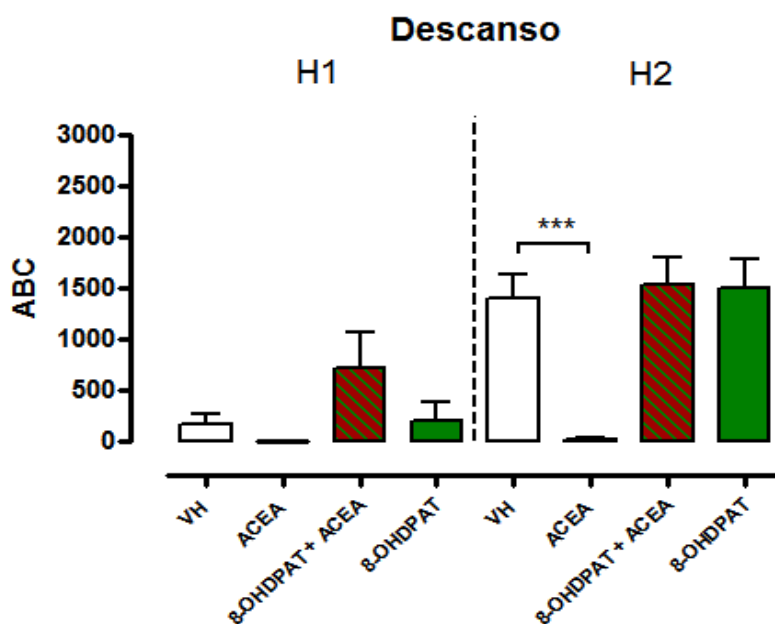


Figura 39. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para descansar. Vehículo (VH, n= 6), ACEA (0.25 μ g; n=7), 8-OHDPAT (0.1 μ g; n= 5) o 8-OHDPAT y ACEA (n= 5). Interacción (hora registro x tratamiento) ($F_{(3, 38)}= 5.165$; $p<0.001$) Factor tratamiento ($F_{(3,19)}= 13.34$; $p<0.0001$); factor hora de registro ($F_{(3,19)}= 37.45$; $p< 0.0001$); *post hoc* de Bonferroni *** $p<0.001$ en la H2.

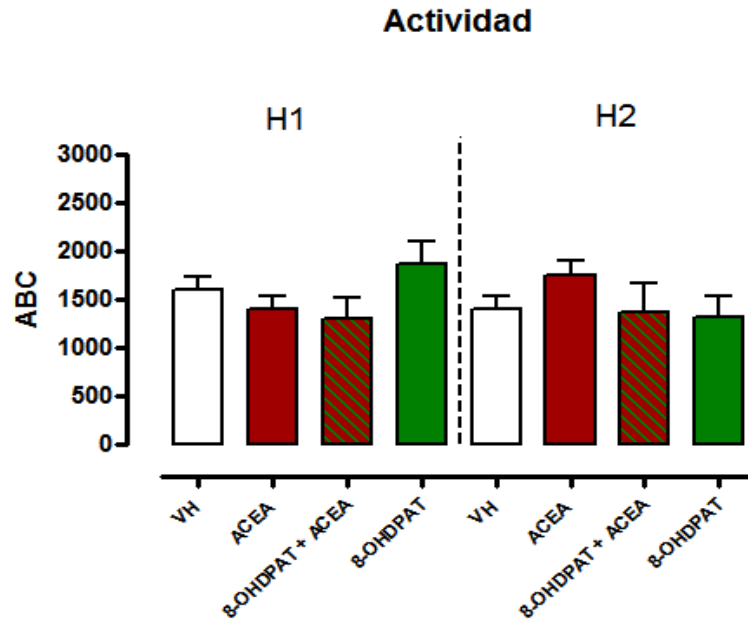


Figura 40. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para realizar otra actividad. (Vehículo VH, n=6), ACEA (0.25 μ g, n=7), 8-OHDPAT (0.1 μ g, n= 5) o 8-OHDPAT y ACEA (n= 5).

11.3

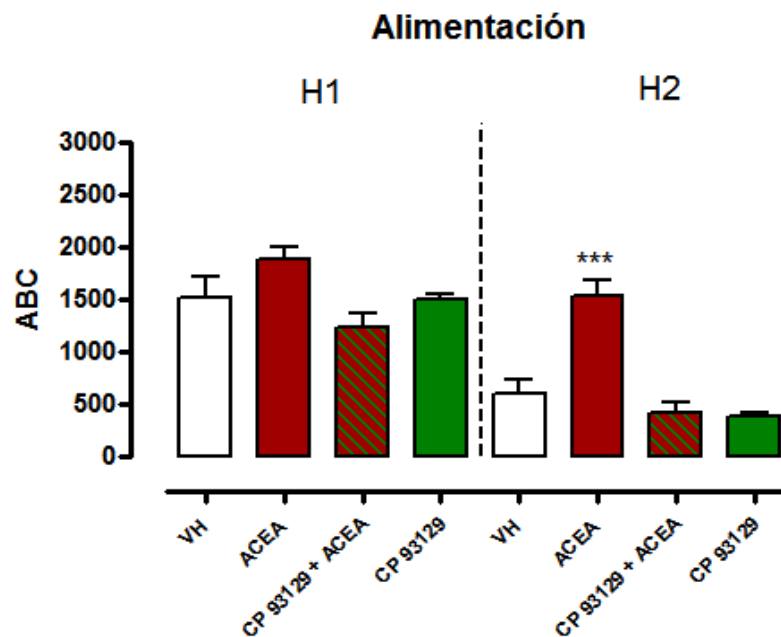


Figura 41. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para alimentarse. Vehículo (VH, n= 6), ACEA (0.25 μ g, n=7), CP 93129 (0.18 μ g, n= 4) o CP 93129 + ACEA (n= 5). Factor tratamiento ($F_{(3,18)}= 17.04$; $p < 0.0001$); factor hora de registro ($F_{(3,18)}= 59.90$; $p < 0.0001$); *post hoc* de Bonferroni *** $p < 0.001$ en la H2.

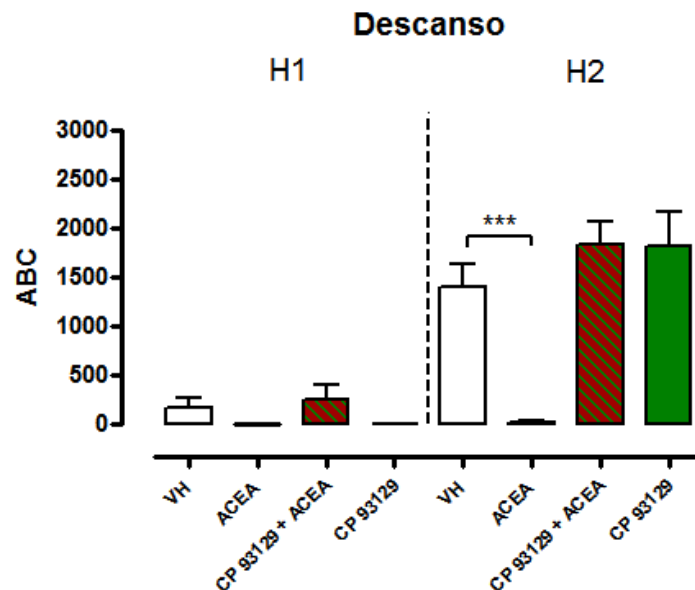


Figura 42. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para descansar. Vehículo (VH, n= 6), ACEA (0.25 μ g, n=7), CP 93129 (0.18 μ g, n= 4) o CP 93129 + ACEA (n= 5). Interacción (hora registro x tratamiento) ($F_{(3, 36)}= 13.95$; $p<0.0001$) Factor tratamiento ($F_{(3,18)}= 19.43$; $p<0.0001$); factor hora de registro ($F_{(3,18)}= 103.9$; $p< 0.0001$); *post hoc* de Bonferroni *** $p<0.001$ en la H2.

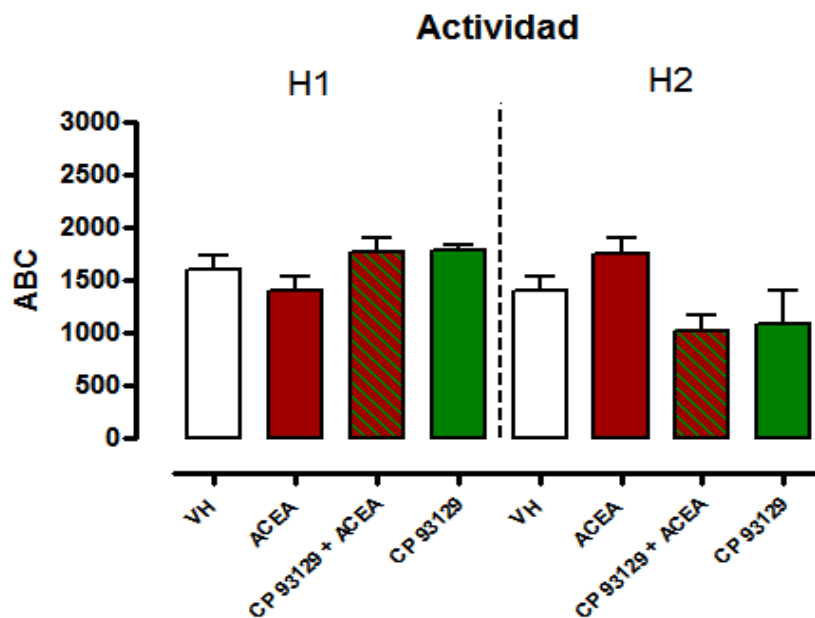


Figura 43. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para realizar otra actividad. Vehículo (VH, n= 6), ACEA (0.25 μ g, n=7), CP 93129 (0.18 μ g, n= 4) o CP 93129 + ACEA (n= 5).

11.4

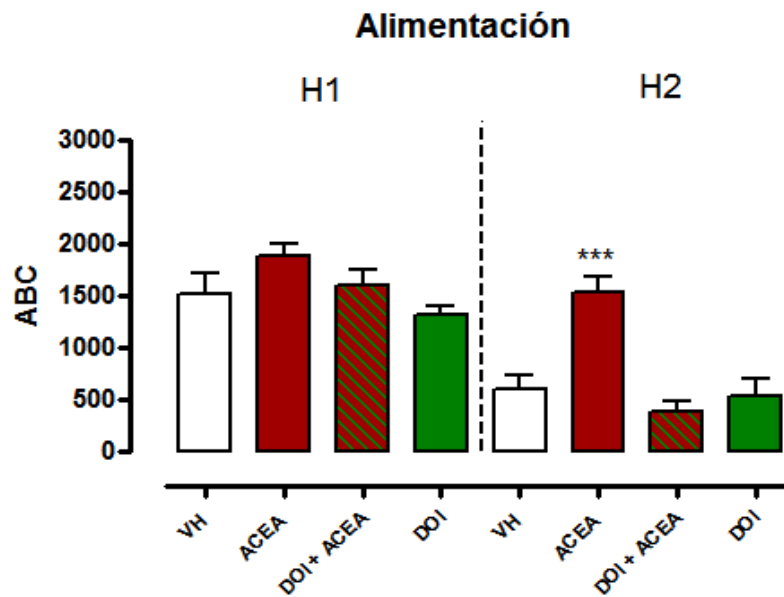


Figura 44. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para alimentarse. Vehículo (VH, n= 6), ACEA (0.25 μ g, n=7), DOI (0.1 μ g, n= 4) o DOI + ACEA (n= 5). Interacción (hora de registro x tratamiento) ($F_{(3, 36)}= 3.061$; $p<0.05$) Factor tratamiento ($F_{(3,18)}= 12.86$; $p<0.0001$); factor hora de registro ($F_{(3,18)}= 55.90$; $p< 0.0001$); *post hoc* de Bonferroni *** $p<0.001$ en la H2.

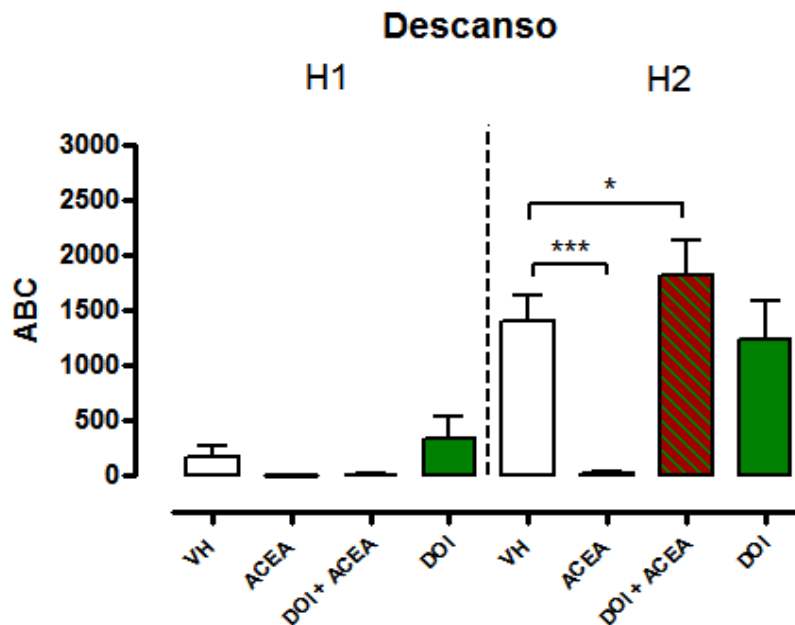


Figura 45. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para descansar. Vehículo (VH, n= 6), ACEA (0.25 μ g, n=7), DOI (0.1 μ g, n= 4) o DOI + ACEA (n= 5). Interacción (hora registro x tratamiento) ($F_{(3, 36)}= 13.62$; $p<0.0001$). Factor tratamiento ($F_{(3,18)}= 16.49$; $p<0.0001$); factor hora de registro ($F_{(3,18)}= 77.57$; $p< 0.0001$); *post hoc* de Bonferroni *** $p<0.001$; * $p<0.05$ en la H2.

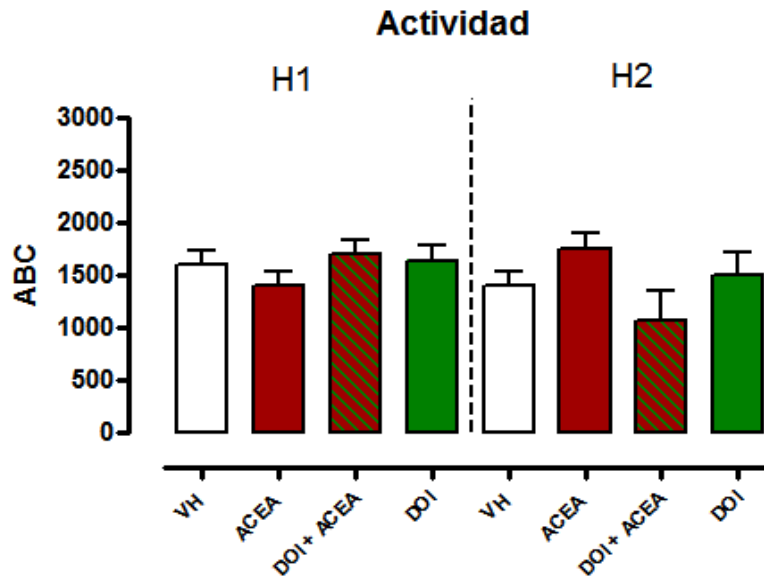


Figura 46. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para realizar otra actividad. Vehículo (VH, n= 6), ACEA (0.25 μ g, n=7), DOI (0.1 μ g, n= 4) o DOI + ACEA (n= 5).

11.5

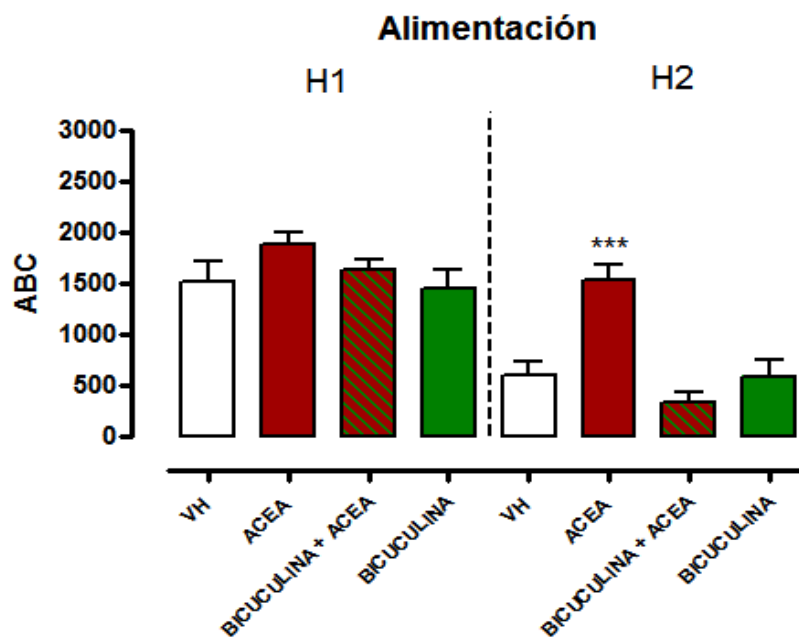


Figura 47. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para alimentarse. Vehículo (VH, n= 6), ACEA (0.25 μ g, n=7), bicuculina (0.20 μ g, n= 5) o bicuculina + ACEA (n= 4). Interacción (hora de registro x tratamiento) ($F_{(3, 36)} = 3.18$; $p < 0.05$). Factor tratamiento ($F_{(3, 18)} = 11.0$; $p < 0.0001$); factor hora de registro ($F_{(3, 18)} = 58.02$; $p < 0.0001$); *post hoc* de Bonferroni *** $p < 0.001$ en la H2.

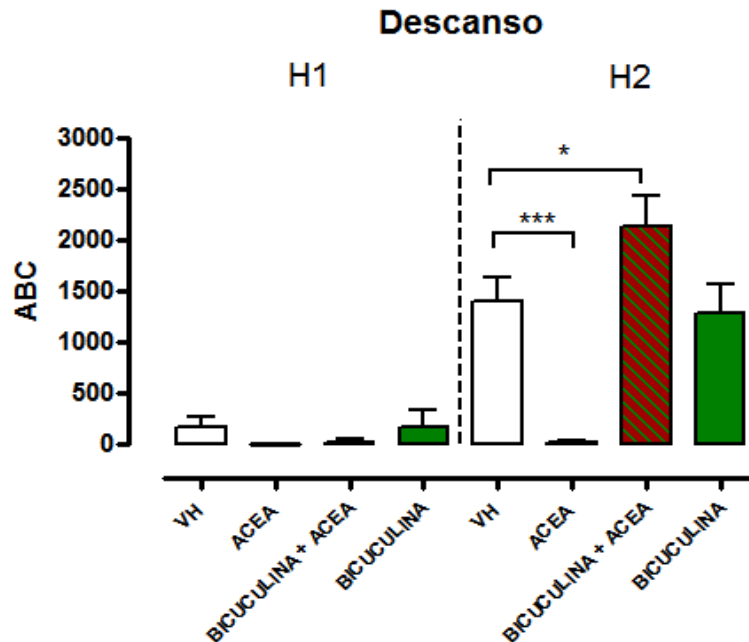


Figura 48. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para descansar. Vehículo (VH, n= 6), ACEA (0.25 μ g, n=7), bicuculina (0.20 μ g, n= 5) o bicuculina + ACEA (n= 4). Interacción (hora registro x tratamiento) ($F_{(3, 38)}= 13.77$; $p<0.0001$). Factor tratamiento ($F_{(3,19)}= 16.63$; $p<0.0001$); factor hora de registro ($F_{(3,19)}= 90.56$; $p< 0.0001$); *post hoc* de Bonferroni *** $p<0.001$; * $p<0.05$ en la H2.

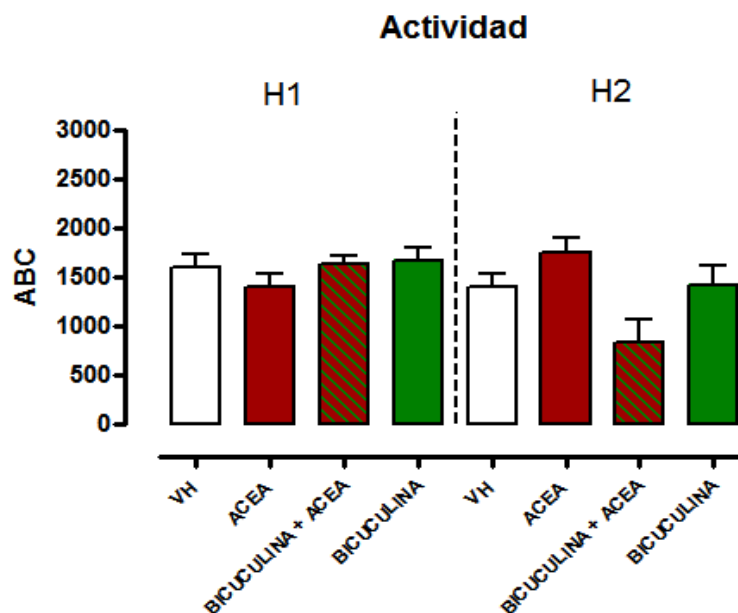


Figura 49. Medias \pm el EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro H1 y H2 (hora 1 y hora 2) del tiempo que los sujetos emplearon para realizar otra actividad. Vehículo (VH, n= 6), ACEA (0.25 μ g, n=7), bicuculina (0.20 μ g, n= 5) o bicuculina + ACEA (n= 4).