

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

**REGULACIÓN CANABINÉRGICA DE LAS CONDUCTAS
APETITIVAS**

TESIS

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas

Presenta

Edgar Jesús Soria Gómez

Tutor Principal

Dr. Oscar Próspero García

Cotutores

Dr. Raúl A. Aguilar Roblero

Dr. Javier Velázquez Moctezuma

México, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Existe evidencia acerca de la participación del sistema canabinérgico en la regulación de las conductas apetitivas, particularmente en la ingestión de alimento. Por ejemplo, se ha mostrado que la administración de un endocanabinoide, el 2-AG, directamente al núcleo accumbens shell (NAcS) de ratas, estimula la ingestión de alimento, activando, potencialmente, a núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación de la ingestión de alimento. El principal objetivo de este trabajo es evaluar el efecto orexigénico de los endocanabinoides anandamida y oleamida, así como del AA5HT (un inhibidor de la degradación de los endocanabinoides) y del OMDM-1 (un inhibidor de la recaptura de anandamida) cuando son administrados en el NAcS; y observar si estos tratamientos afectan la actividad hipotalámica. Por otra parte, la oleamida puede interactuar con otros sistemas de neurotransmisión como el serotoninérgico para regular la conducta alimenticia. Decidimos probar si dicha interacción ocurre en el NAcS administrando en conjunto este endocanabinoide y fármacos serotoninérgicos. Todas las administraciones se realizaron al inicio de la fase de oscuridad en ratas alimentadas *ad libitum* y se cuantificó la ingestión de alimento durante las cuatro horas siguientes, midiendo cada hora. En otros grupos los mismos fármacos fueron utilizados pero noventa minutos después los cerebros de las ratas tratadas fueron procesados para desarrollar inmunohistoquímica contra c-Fos en núcleos hipotalámicos. En grupos adicionales se cuantificaron los niveles de los endocanabinoides en el núcleo accumbens (NAc) y en el hipotálamo después de la administración del AA5HT y del OMDM-1. Los resultados indican que todos los tratamientos canabinérgicos en el NAcS estimulan la ingestión de alimento e incrementan la inmunoreactividad a c-Fos en el hipotálamo. Estos efectos fueron revertidos por la co-administración del antagonista del receptor a canabinoides 1, el AM251. Sin embargo, también detectamos que la oleamida puede ejercer un efecto anorexigénico cuando actúa a través de los receptores 5HT_{2c}. También, se demostró

que el AA5HT y el OMDM-1 incrementan los niveles de los endocannabinoides en el núcleo accumbens. Adicionalmente, mostramos que la hiperfagia inducida por la privación de alimento se reduce y bloquea por la administración del AM251 en el NAcS, y observamos cambios en el RNAm del CB1 en NAc de ratas privadas de alimento. En conjunto, estos datos respaldan la participación del sistema canabinérgico en el núcleo accumbens shell sobre la conducta alimenticia, así como una relación funcional entre dicho núcleo y los núcleos hipotalámicos reguladores de la ingestión de alimento. Esto abre importantes avenidas para el tratamiento de trastornos alimenticios con fármacos que faciliten o bloqueen al sistema canabinérgico.

ABSTRACT

There is evidence about the role of the cannabinergic system in the regulation of appetitive behaviors, particularly feeding behavior. For example, it has been shown that the administration of the endocannabinoid 2-AG into the rat nucleus accumbens shell (NAcS) stimulates food intake, potentially activating hypothalamic nuclei involved in the regulation of feeding behavior. The main objective of this work is to evaluate the orexigenic effect of the endocannabinoids anandamide and oleamide, as well as the inhibitor of endocannabinoid degradation, the AA5HT, and the inhibitor of anandamide re-uptake, the OMDM-1, when are administered into the NAcS; and to observe if these treatments modify the hypothalamic activity. Furthermore, oleamide could regulate feeding behavior affecting others neurotransmitters systems, specifically, the serotonergic system. To explore this, we decide to co-administer oleamide and serotonergic drugs into the NAcS and evaluate food ingestion. All experiments were performed at the dark onset and the food intake quantified during four hours. In other groups, the same drugs were used but ninety minutes after infusions, the brains were processed for c-Fos immunohistochemistry on hypothalamic nuclei. In additional groups, it was quantified endocannabinoids levels in the nucleus accumbens and in the hypothalamus after AA5HT and OMDM-1 infusions into the NAcS. The results indicate that all cannabinergic treatments in the NAcS stimulate feeding behavior and activate hypothalamic nuclei involved in the control of energy balance. The CB1 antagonist, AM251, prevented such effects. We also show that oleamide can exert an anorexigenic effect acting via 5HT2c receptors. Moreover, the AA5HT and OMDM-1 increase endocannabinoid levels in the

nucleus accumbens. Additionally, we found that the food deprivation-induced hyperphagia was blocked by the AM251 into the NAcS, and we observed changes in CB1-RNA in food-deprived rats. Summarizing, these data support the participation of the NAcS-cannabinergic system on food intake regulation, as well as the functional relationship between the nucleus accumbens and hypothalamic nuclei involved in feeding behavior.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mi familia:

A mi padre, **Jesús Antonio Soria Hernández**, que vive y siempre vivirá en mí.

A mi madre, **Josefina Gómez Vargas**, que sin su amor y apoyo incondicional yo no sería lo que soy. Gracias por la vida.

A mi adorada, hermosa y siempre amada **María del Carmen González Marín**. Gracias por compartir todo conmigo y hacerme crecer a diario. Tú me haces mejor persona y estoy seguro que la vida nos dará muchas más alegrías juntos. Cualquier problema empequeñece si estamos juntos.

A mi hermano, **Marco Antonio Soria Gómez**, por compartir la sangre y por esos momentos tan divertidos.

A mis tíos y tías; José, Carmen, Dolores, Lourdes, Guadalupe, Estela, Beatriz, y a mi abuela Josefina, que mucha de mi felicidad se la debo a ellos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina y a la Facultad de Psicología. Es para mí un orgullo formar parte de esta Institución y siempre buscare retribuir lo que me ha dado.

A mis cotutores, el **Dr. Raúl Aguilar Roblero** y el **Dr. Javier Velázquez Moctezuma**.

Al **Dr. Oscar Próspero García**, por contribuir enormemente a mi formación y brindarme la oportunidad de divertirme en su laboratorio. Gracias por la constante guía en mi carrera.

A todo el **Grupo de Neurociencias**, los que están y los que estuvieron. Muy especialmente a **Marina Cisneros** por ser una fuente de inspiración para vivir y a **Marianela**, que parte de su trabajo está plasmado en éste escrito.

Al Profesor **Tim C. Kirkham** por todos sus consejos y por hacer de mi estancia en Liverpool algo memorable.

A mis amigos:

A **Corinne Montes y Pavel Rueda**. Ustedes han sido parte fundamental en mi desarrollo; su conocimiento y trabajo me han hecho un mejor investigador. Siempre agradeceré su presencia en mi vida personal y laboral. Espero contar con ustedes siempre.

A **Bety, Charly, Corinne, David, Erandi, Ernesto, Ixchel, Jessica, Lupis, Natalia, Pablo, Pavel, Raymundo, Zeidy**. De verdad que he tenido mucha suerte en encontrarlos. Sentirlos a mi lado (aunque estén lejos) me motiva día a día. Me siento absolutamente orgulloso de su amistad.

A todos los anteriores: es un honor caminar sobre los hombros de gigantes.

Este trabajo se realizó con el apoyo de las becas del CONACyT; y los donativos 49797 del CONACyT a OPG.

ÍNDICE

I.	Título	
II.	Resumen	
III.	Agradecimientos y Dedicatorias	
IV.	Índice	
1.	Introducción1
1.1	Conductas Apetitivas1
1.2	Ingestión de Alimento3
1.2.1	Regulación hipotalámica de la ingestión de alimento6
1.2.2	Sistema de la motivación-recompensa: énfasis en el Núcleo Accumbens	...22
1.2.2.1	Fisiología del Núcleo Accumbens	...22
1.2.2.2	El Núcleo Accumbens y la Motivación-recompensa...	30
1.3	Sistema Canabinérgico	...40
1.3.1	El sistema canabinérgico y la ingestión de alimento	...46
1.3.2	El sistema canabinérgico en el núcleo accumbens	...51
2.	Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos	...55

3. Método	...58
3.1 Sujetos	...58
3.2 Aparatos	...58
3.3 Fármacos	...59
3.4 Anticuerpos y oligonucleotidos	...60
3.5 Procedimientos generales	...61
3.6 Procedimientos experimentales	...69
4. Resultados	...75
5. Discusión y Conclusiones	...89
6. Referencias	..100
7. Anexos	..144

*"La fixité du milieu intérieur est la condition
d'une vie libre et indépendante"*

Claude Bernard

*"Nature has placed mankind under the
governance of two sovereign masters, pain
and pleasure."*

Jeremy Bentham

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Conductas apetitivas

Las conductas motivadas son aquellas que un sujeto despliega cuando se dirige a una meta y se pueden dividir en conductas apetitivas y aversivas. Las primeras nos ayudan a conseguir el reforzador¹ y como consecuencia, la recompensa². Las segundas nos ayudan a tener la recompensa al alejarnos del estímulo nocivo. Cómo se puede deducir, estas conductas son esenciales para la supervivencia, necesitamos reconocer qué estímulos son buenos para nosotros y cuáles malos. De no ser así, un organismo que no sepa cuál es su depredador o que no reconozca estímulos o factores nocivos estará destinado a la extinción. Lo mismo pasaría si no tuviéramos identificadas las fuentes de energía necesarias para vivir. Desde este punto de vista podemos decir que una *recompensa* es algo por el cual un animal (incluido el humano) trabaja. Aquí, el término *trabajo* se refiere a ejecutar una conducta arbitraria (llamada respuesta operante) con el fin de obtener la *recompensa* (Rolls, 2005).

En este trabajo nos enfocamos en revisar las conductas apetitivas, como por ejemplo la ingestión de drogas de abuso, la conducta sexual y especialmente la ingestión de alimento. La primera, claro ejemplo de un reforzador artificial, y las dos restantes reforzadores naturales.

El cómo la obtención del reforzador y la recompensa afecta la conducta fue descrito a finales del siglo antepasado por el psicólogo Edward L. Thorndike en la famosa Ley del Efecto (Revisado en Staddon, 2005) que dice:

¹ Aquel estímulo que aumenta la probabilidad de ocurrencia de una respuesta.

² Es la sensación de bienestar o “placer” que se tiene cuando se consigue o consume el reforzador.

Cualquier respuesta ante un estímulo que produzca un estado de satisfacción o de placer en una situación en particular es más probable que ocurra cuando se presente la situación nuevamente. Complementariamente, las respuestas que producen un efecto no-placentero o molesto son menos probable que ocurran en dicha situación.

Ahora sabemos que este fenómeno es mucho más complicado de lo que parece, sin embargo la Ley del Efecto mantiene, parcialmente, su patencia. El avance en paralelo de las ciencias de la conducta y otras ciencias como las neurociencias ha hecho posible un mejor entendimiento acerca de los mecanismos del sistema nervioso central que se encargan de codificar las relaciones entre la conducta, reforzadores y recompensas. Antes de pasar a las áreas del cerebro involucradas con lo anterior tomaremos un espacio para describir cómo el alimento funge como reforzador.

1.2 INGESTIÓN DE ALIMENTO

Al hablar de ingestión de alimento no podemos dejar de lado las aportaciones conceptuales y experimentales de dos grandes fisiólogos como lo son Claude Bernard y Walter Cannon. El primero hablando de la constancia del medio interno (internal milieu) y el segundo bautizándola como Homeostasis, y proponiendo la existencia de servomecanismos que la mantienen (Cannon, 1932; Revisado en Gross, 1998 y en Schulkin, 2003). Así, podemos decir que *Homeostasis es la constancia del medio interno*. Entonces el organismo echa a andar diversos mecanismos biológicos y conductuales (servomecanismos o mecanismos de retroalimentación sugeridos por Walter Cannon) para mantener el equilibrio a diferentes niveles, re-estableciendo un nivel determinado (set point). Para algunos, la simpleza del concepto es limitada e insuficiente para entender cómo el organismo afronta los cambios en el medio externo que repercuten en su medio interno. Debido a esto, se han acuñado otros conceptos como Alostasis o Reostasis (Schulkin, 2003) que a diferencia de la Homeostasis plantean procesos dinámicos en donde no existen “set points” o puntos de equilibrio claros sino “equilibrios” emergentes. Sin embargo, en donde coinciden las ideas es en la respuesta coordinada para mantener la estabilidad interna.

En los mamíferos, incluyendo los humanos, la ingestión de alimento es una conducta reguladora del aporte energético cuya función primordial es la de respaldar la continua demanda energética (ej. glucosa, lípidos) de los tejidos corporales, sin que se llegue a sobrecargar al sistema. Desde esta perspectiva la ingestión de alimento depende del ciclo hambre-saciedad que implica a los mecanismos biológicos y los ambientales (factores sociales, hora del día,

costo, entre otros) que hacen que un determinado organismo reestablezcan la constancia del medio interno.

Como es evidente, la ingestión de alimento tiene que ser una conducta altamente regulada tanto central como periféricamente ya que prácticamente todo el organismo se beneficia del alimento que consumimos. Y son más que conocidos los diferentes padecimientos que resultan de un desequilibrio entre la energía que se consume y la que se gasta, el más frecuente es la obesidad, ya que se ha estimado que en México, 1 de cada 4 habitantes tiene problemas de obesidad. Sin embargo, una de las más dramáticas enfermedades asociadas con la reducción en la ingestión de alimento es la anorexia. Los descubrimientos que se han realizado en las décadas pasadas han identificado moléculas señalizadoras que afectan la ingestión de alimento y que son críticas para el balance energético. Los modelos murinos (modelos en ratones) han resultado ser sumamente exitosos para estudiar la obesidad humana. Esto indica que existe una homología sustancial entre los mamíferos en la organización funcional de los sistemas reguladores del peso corporal. Aunado a esto, la identificación de moléculas que controlan la ingestión de alimento ha generado nuevos blancos para el desarrollo de drogas que se usan para combatir la obesidad y otros desórdenes relacionados (Clifton, 2000).

Durante la historia se han creado teorías para explicar cómo es que ocurre esta regulación; proponiendo reguladores homeostáticos que controlan el balance energético. Así podemos hablar de la teoría lipostática desarrollada por Kennedy en 1953, en donde propone que diversas señales circulantes que son generadas en proporción a los almacenes de grasa de nuestro cuerpo afectan la ingestión de alimento y el gasto de energía de manera coordinada

para regular el peso corporal (Kennedy, 1953). Por otra parte, la hipótesis glucostática de la ingestión de alimento establece que dicha conducta es disparada cuando baja la concentración de glucosa en sangre. Postulando al cerebro como el detector de dichos cambios (Mayer, 1953; Bernstein & Grossman, 1956; Astrup & Raben, 1996). Y así, podemos mencionar la existencia de muchas otras hipótesis y teorías enfocadas en explicar cómo se genera el hambre, todas ellas verdaderas en parte y complementarias en conjunto (ver Mayer & Thomas, 1967). Destacan las teorías del “origen central” y de la “sensación general” en donde se habla de una estructura a nivel central responsable de censar los cambios energéticos del organismo. Estas teorías se fundamentaban en experimentos donde se mostraba que sujetos que tenían removido el estómago de manera quirúrgica continuaban experimentando sensaciones de hambre y mantenían estable su consumo de alimento (Revisado en Mayer & Thomas, 1967). A principios del siglo XX, los estudios de Camus y Smith por separado apuntalaron al Hipotálamo como la estructura del sistema nervioso central responsable del balance energético. Mostraron que la ablación de la pituitaria no era suficiente para producir obesidad, lo que si se observaba cuando el daño alcanzaba al hipotálamo (Camus & Roussy, 1922; Smith, 1927). Estos experimentos fueron el inicio del estudio hipotalámico de la ingestión de alimento.

1.2.1 Regulación hipotalámica de la ingestión de alimento

Anatómicamente, el hipotálamo se localiza en la base del cerebro, alrededor del tercer ventrículo y en términos evolutivos es una de las estructuras más antiguas del sistema nervioso central. Estructura privilegiada, hablando en términos de la detección de los cambios energéticos. Algunos de sus núcleos quedan expuestos a las moléculas que viajan por el torrente sanguíneo ya que en dichos sitios no existe barrera hematoencefálica. De esta manera el hipotálamo es sensible a las señales provenientes de tejidos periféricos como el tejido adiposo o el tejido gastrointestinal que son reactivas ante los cambios energéticos.

Fue hasta la década de los 40s que Hetherington, Ranson y Brobeck, demostraron por vez primera que el posible regulador central de la ingestión de alimento era el hipotálamo. Observaron que las lesiones electrolíticas del hipotálamo ventromedial (VMH) de las ratas producía un síndrome hiperfágico que terminaba en obesidad (Hetherington & Ranson, 1940, 1942). Estos resultados fueron replicados en otras especies animales. Más adelante, a principios de los 50s, Anand y Brobeck identificaron al hipotálamo lateral como otro participante en la regulación de la ingestión de alimento, con una función opuesta al del VMH ya que la destrucción de esta área producía que el animal dejara de comer, se volvía hipofágico (Anand & Brobeck, 1951a, b).

Con estos descubrimientos se llegó a formular la hipótesis dual de la ingestión de alimento (Epstein, 1960; Revisado en Seeley, 2006; Teitelbaum & Stellar, 1954). La región ventromedial como el centro de la saciedad y el hipotálamo lateral como el centro del hambre. Estudios más recientes han demostrado que esta visión es limitada, ya que lesiones más específicas de

estos núcleos no producen los efectos dramáticos observados anteriormente. Se demostró por ejemplo que las lesiones del VMH eran tan extensas que dañaban la comunicación de este núcleo con otros núcleos hipotalámicos de quizá más relevancia para la regulación de la ingestión de alimento como el hipotálamo paraventricular (PVN) (Gold et al., 1977). Adicionalmente, las lesiones electrolíticas del HL no sólo dañaban a las células nativas de este núcleo sino que destruía también a las fibras *on passant* (de paso) provenientes de áreas del mesencéfalo como la sustancia negra o el área tegmental ventral (Markowska et al., 1985; Murray & Shizgal, 1996; Winn et al., 1984), núcleos implicados en la regulación motora y motivacional respectivamente. Esta podría ser la explicación de la anorexia inducida por la destrucción del HL: los animales no comían porque no podían o no querían moverse. Sin embargo, en estudios relativamente recientes, se ha observado que la ablación puntual de algunos tipos celulares presentes en el HL, particularmente aquellas células que expresan un neuropéptido llamado orexina (también conocido como hipocretina) puede producir un síndrome hipofágico de menor magnitud como el observado en el pasado (Hara et al., 2001). Este y otros descubrimientos han ligado fuertemente al HL como uno de los centros (sino es que el más importante) promotores del hambre.

Actualmente se conoce un circuito complejo intrahipotalámico funcionando a base de neuropéptidos y hormonas (orexigénicas o anorexigénicas) (**ver Tabla 1**) que se encarga de regular el balance energético. Los núcleos participantes en dicha función y que detallaremos más adelante cuando sea pertinente son: el HL, el PVN, el núcleo arqueado (ARC), el

hipotálamo dorsomedial (DMH), el VMH y el núcleo supraquiasmático (NSQ).

Figura 1.1.

Tabla 1.1 Lista de moléculas hipotalámicas más estudiadas relacionadas con el control de la ingestión de alimento.

Péptidos Orexigénicos	Péptidos Anorexigénicos
Neuropéptido Y (NPY)	Alpha-hormona estimuladora de los melanocitos (αMSH)
Proteína relacionada al gen agouti (AgRP)	Trascrito regulado por cocaína y anfetamina (CART)
Orexinas (ORX)	Hormona liberadora de corticotropina (CRH)
Hormona concentradora de melanina (MCH)	Hormona liberadora de tirotrina (TRH)

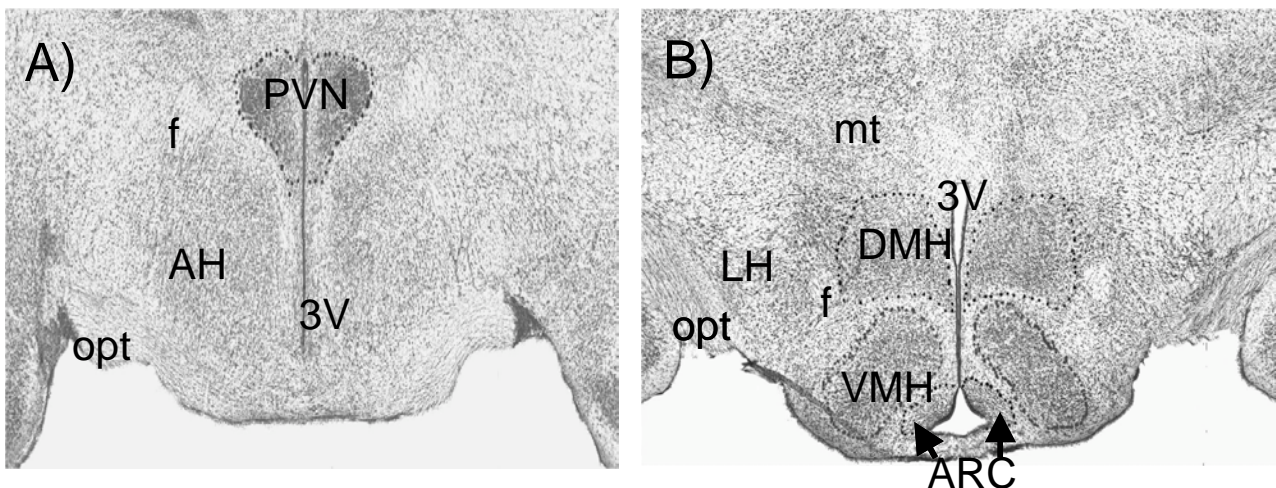


Fig. 1.1 Vista panorámica de los núcleos hipotalámicos involucrados con la ingestión de alimento. **A)** núcleo paraventricular, PVN; hipotálamo anterior, AH. **B)** hipotálamo lateral, LH; hipotálamo dorsomedial, DMH; hipotálamo ventromedial, VMH; y núcleo arcuato, ARC. f: fornix, opt: tracto óptico, mt: tracto mamilotalámico. 3V: tercer ventrículo. Tinción hecha en el laboratorio del Dr. Próspero García.

El **ARC** está localizado dentro de la región hipotalámica adyacente al piso del tercer ventrículo. Está poblado por neuronas que producen moléculas orexigénicas como el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada al gen agouti (AgRP por sus siglas en inglés) (co-liberados con GABA) (Chronwall et al., 1984; Chronwall et al., 1985; Pelletier, 1990; Billington et al., 1994; Gerald et al., 1996; Broberger et al., 1998; Backberg et al., 2004; Tong et al., 2008), y péptidos anorexigénicos tales como el transcrito regulado por cocaína y amfetamina (CART por sus siglas en inglés) y la α -hormona estimuladora de melanocitos (α -MSH por sus siglas en inglés) (co-liberados con acetilcolina) (Sawchenko, 1998; Vrang et al., 1999; Schwartz et al., 2000; Cone et al., 2005; Meister et al., 2006). La actividad de estos grupos neuronales es regulada en parte por señales hormonales periféricas disparadas por la presencia o ausencia de señales energéticas (p.e. lípidos) (Hillebrand et al., 2002; Swart et al., 2002; Jobst et al., 2004). Por ejemplo, los niveles de leptina, una hormona sintetizada y liberada por los adipocitos, incrementan en el torrente sanguíneo una vez que el sujeto ha comido (Van Dijk, 2001) o la ghrelina, hormona orexigénica producida en el estómago (y en algunos sitios hipotalámicos) (Rindi et al., 2004) también actúa en el ARC (Cowley et al., 2003b). Al llegar al hipotálamo, la leptina estimula a las neuronas que producen CART/ α -MSH e inhibe a las células productoras de NPY/AgRP (Vrang et al., 1999; Cowley et al., 2001; Balthasar et al., 2004; Jobst et al., 2004; Pinto et al., 2004; Cone et al., 2005). En un elegante experimento realizado por Luquet y colaboradores (Luquet et al., 2005), se demostró la importancia de este último grupo de neuronas, ya que la destrucción selectiva de las neuronas del ARC que co-expresan NPY/AgRP producen una reducción en la ingestión de alimento y en

el peso corporal que dura por varios días. Una posible explicación, sustentada por otros datos, es que este grupo neuronal en condiciones normales, puede inhibir al grupo de neuronas anorexigénicas, CART/POMC, dentro del ARC y por tanto si no existen las primeras, el tono de saciedad dado por las últimas se mantiene por un periodo más largo (Cone et al., 2005). Sin embargo, contrario a lo que se pudiera pensar, los ratones modificados genéticamente que no producen neuropéptido Y tienen un consumo “normal” de alimento (Herzog, 2003). Lo que indica la participación de otros sistemas para compensar la ausencia de este péptido.

Las neuronas del ARC a su vez, proyectan a los llamados “núcleos hipotalámicos de segundo orden” como el PVN y al HL, y a sitios extra hipotalámicos en donde ejerce su acción orexigénica; inhibiéndolos o activándolos según sea el caso (Broberger et al., 1998; Elias et al., 1998; Kim et al., 2000; Schwartz et al., 2000; DeFalco et al., 2001; Van Dijk & Strubbe, 2003; Bouret et al., 2004; Jobst et al., 2004; Kas et al., 2004; Broberger, 2005; Tiesjema et al., 2007).

La función del **PVN** en la regulación de la ingestión de alimento ha sido demostrada desde los 70's (Atrens & Von Vietinghoff-Riesch, 1972; Gold et al., 1977). Probablemente, este núcleo esté más cerca de ser el centro de la saciedad, comparado con el VMH, ya que cómo mencionamos anteriormente una lesión del VMH que produce un síndrome hiperfágico afecta la comunicación de este núcleo con el PVN y con el ARC (Gold et al., 1973, 1977). El PVN se encuentra localizado a cada lado del techo del tercer ventrículo y las lesiones de este núcleo y áreas circunvecinas, producen casi el

mismo síndrome; hiperfagia y ganancia en el peso corporal, y también modifica la actividad periférica (Leibowitz et al., 1981; Aravich & Sclafani, 1983; Clavier et al., 1983; Tokunaga et al., 1986; Cox & Sims, 1988; Rockhold et al., 1990; Flanagan et al., 1992; Touzani & Velley, 1992; Bell et al., 2000) afectando a los sistemas de neurotransmisión opioidérgico y noradrenérgico (Shor-Posner et al., 1986a y b; Koch et al., 1995). De manera complementaria, la administración de agonistas opioidérgicos y noradrenérgicos en el PVN induce un incremento en la ingestión de alimento (McLean & Hoebel, 1983; Lichtenstein et al., 1984). También se ha mostrado que el NPY proveniente del ARC y del DMH puede modular la conducta alimenticia actuando en el PVN (Willis et al., 1984; Stanley & Leibowitz, 1984; Bai et al., 1985; Stanley et al., 1985; Jhanwar-Uniyal et al., 1993; Elias et al., 1998; Broberger et al., 1999; Kotz et al., 2000; Taylor et al., 2007), probablemente inhibiendo a las moléculas anorexigénicas presentes en dicho núcleo como a la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y a la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Pelletier, 1990; Heinrichs et al., 1993; Tempel & Leibowitz, 1993; Karydis & Tolis, 1998; Li et al., 2000; Mihály et al., 2002; Masaki et al., 2003; Sarkar & Lechan, 2003; Lechan & Fekete, 2006; Dimitrov et al., 2007). Dentro de este contexto, las señales centrales de saciedad como la α -MSH estimulan la actividad celular del PVN promoviendo de esta manera una inhibición de la ingestión de alimento (Giraud et al., 1998; Fekete et al., 2000; Wirth et al., 2001; Sarkar et al., 2002; Balthasar et al., 2005; Adan et al., 2006). Aunque parece ser que la participación de este núcleo no es esencial en mediar este efecto (Dube et al., 2006). Contrariamente, otra molécula del ARC, el AgRP, funciona como un antagonista natural de los receptores que son activados por la α -MSH, dando como resultado un aumento

en el consumo de alimento (Adan et al., 2006), probablemente modificando la comunicación del PVN con la glándula pituitaria (Fekete et al., 2002). La actividad del PVN cambia a lo largo del ciclo hambre-saciedad y con algunas manipulaciones del estado energético del organismo (ej. privación de alimento) (Sahu et al., 1988; Tokunaga et al., 1989; Kalra et al., 1991; Paez et al., 1993; Mitome et al., 1994; Choi et al., 2001; Gautron et al., 2005).

Al igual que el ARC, el PVN también integra diferentes señales periféricas provenientes de los adipocitos y del tracto gastrointestinal. La leptina es un ejemplo de los primeros y la ghrelina de los segundos, esta última una hormona producida por las células de la mucosa estomacal y que se libera justo antes de cada comida (Rindi et al., 2004). Actuando en este núcleo tales hormonas pueden inhibir o facilitar la ingestión de alimento, respectivamente (Schwartz et al., 1996; Elmquist et al., 1997; Huang et al., 1998; Powis et al., 1998; Nilni et al., 2000; Bagnasco et al., 2002; Lawrence et al., 2002; Melis et al., 2002; Currie et al., 2005; Bomberg et al., 2007). Así, el PVN es capaz de censar los cambios en la actividad metabólica de todo el cuerpo.

Una vez activado, el PVN envía proyecciones a núcleos autonómicos (simpáticos y parasimpáticos) del tallo cerebral como el núcleo de tracto solitario (NTS) o al núcleo dorsal motor del vago (DMNX), los cuáles son capaces de regular la ingesta calórica afectando a los órganos periféricos y a otros núcleos hipotalámicos como el DMH (Weiss & Leibowitz, 1985; Kirchgessner & Sclafani, 1988; Sahu et al., 1988; Portillo et al., 1996; Blevins et al., 2004). Adicionalmente, existe una conexión anatomo-funcional entre el PVN y la glándula hipófisis (Cross et al., 1969; Koisumi & Yamashita, 1972). Las neuronas productoras de CRH y TRH estimulan a la hipófisis, produciendo

la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y de tirotrópina respectivamente, dos moléculas esenciales en la regulación del metabolismo (Aizawa & Greer, 1981; Alonso et al., 1986; Rondeel et al., 1988; Taylor et al., 1990; Makino et al., 1995; Sebaai et al., 2002; Fliers et al., 2006).

Otro núcleo hipotalámico esencial para la regulación de la ingestión de alimento es el **HL** (incluyendo al área perifornical). Como vimos anteriormente, su participación fue evidenciada desde hace más de 50 años por los trabajos de Anand y Brobeck. El HL se extiende rostralmente desde el área preóptica hipotalámica hasta el área tegmental ventral (VTA), estructura que detallaremos en el siguiente capítulo. Medial al HL se encuentra el fornix y lateral a éste el tracto óptico. A través del hipotálamo lateral corre un haz de fibras ascendentes y descendentes llamado el haz prosencefálico medial (HPM), por el cual el HL recibe y envía información de las partes más rostrales y caudales del sistema nervioso central, dentro de las cuales se encuentran la corteza prefrontal (CtxPf), el núcleo accumbens (NAc), el NTS, el área postrema (AP), el VTA, etc (Fadel & Deutch, 2002; Korotkova et al., 2003), núcleos importantes en la ingestión de alimento. De hecho, De Araujo y colaboradores mostraron que existe un ensamble de actividad entre las neuronas del HL y la CtxPf durante el ciclo hambre-saciedad (De Araujo et al., 2006). Siendo esto, una de las primeras evidencias de cómo se va codificando la saciedad en el cerebro. Dentro del hipotálamo, el HL tiene eferencias hacia el PVN, el DMH y al VMH (Elias et al., 1998; Peyron et al., 1998; Yoshida et al., 2006; Murai & Akaike, 2005).

En el HL se expresan un par de péptidos llamados orexinas (ORX) (**Figura 1.2**) y la hormona concentradora de melanina (MCH) (Skofitsch et al., 1985; Zamir et al., 1986; Broberger et al., 1998; De Lecea et al., 1998; Peyron et al., 1998). Las primeras se localizan casi exclusivamente en esta área y fueron descubiertas independientemente pero de manera simultánea en 1998 por Sakurai y De Lecea (Sakurai et al., 1998; De Lecea et al., 1998). Actualmente se conocen dos tipos de ORX, la A y la B, que se unen a dos tipos de receptores, los 1 y los 2, por los cuales ejercen su acción fisiológica (Voisin et al., 2003). Las neuronas que producen ORX tienen características muy especiales, son capaces de detectar cambios en los niveles de glucosa, aumentan su actividad cuándo la concentración de glucosa disminuye (Cai et al., 2001; Yamanaka et al., 2003; Jobst et al., 2004; Burdakov et al., 2005), condición que se presenta cuando un individuo se encuentra en ayuno. En este último caso también se ha encontrado un aumento del ARN mensajero (ARNm) de la prepro-orexina (la proteína de la cuál se obtiene la ORX) en el HL (Cai et al., 2001; Burdakov & Alexopoulos, 2005). Las células orexinérgicas también son capaces de detectar cambios periféricos a través de moléculas orexigénicas y anorexigénicas (Toshinai et al., 2003).

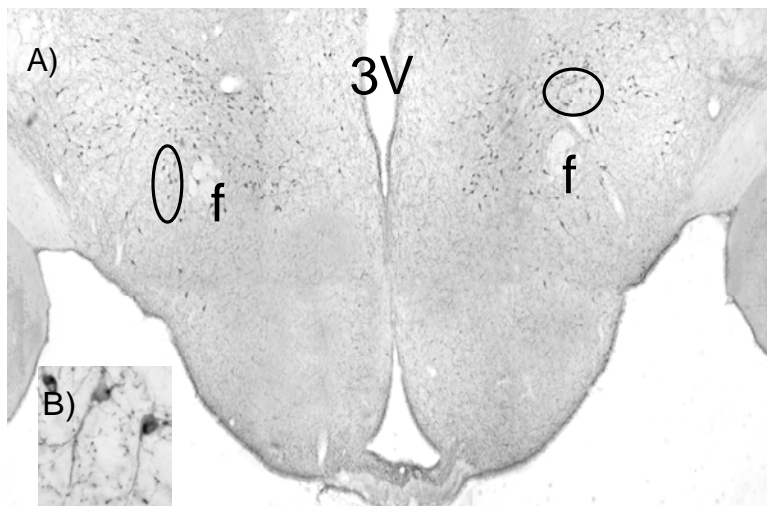


Fig. 1.2 A) Inmunohistoquímica para la ORX-A en el hipotálamo de la rata. Nótese la expresión específica en el HL y la región perifornical. Las elipses negras muestran ejemplos de la inmunoreactividad orexinérgica. **B)** Amplificación de las neuronas positivas a ORX-A.

Se ha mostrado que la administración central de este péptido estimula la ingestión de alimento en ratas con alimento ad libitum (Sakurai et al., 1998; Edwards et al., 1999; Sweet et al., 1999; Thorpe et al., 2005), actuando en distintos sitios intra-hipotalámicos como el ARC, el PVN, el DMH y el VMH (Dube et al., 1999; Backberg et al., 2002; Muroya et al., 2004) y en áreas extra-hipotalámicas, principalmente en el NAc (Thorpe & Kotz, 2005), que como veremos más adelante, es un núcleo involucrado en los procesos de recompensa, parte esencial del circuito de la motivación.

A pesar de estos datos, la función de las ORXs como señales del hambre ha sido cuestionada debido al hecho que los ratones que no expresan el gen que codifica para la preproORX (como consecuencia, no producen ORX) presentan un peso corporal normal (Willie et al., 2001). Adicionalmente, el patrón de expresión del ARN mensajero de las ORX no coincide con los periodos de alimentación de la rata, como lo hacen otras moléculas como la leptina (Stutz et al., 2007). Pero estas moléculas reaccionan a los cambios energéticos agudos ya que una privación de alimento es capaz de aumentar los niveles del ARNm de los receptores a ORX así como de la prepro-ORX (Karteris et al., 2005). Se puede sugerir entonces que la participación del sistema orexinérgico en la regulación de la ingestión de alimento puede ir más allá de ser “sólo” un sensor energético y reaccionar ante otro tipo de estímulos alimenticios como por ejemplo, diferentes tipos de dietas, en particular aquellas que son altamente apetitosas, como consecuencia muy recompensantes (Nair et al., 2008). Otros experimentos apuntalan al sistema orexinérgico como regulador de la parte activadora de la ingestión de alimento; se puede observar un aumento en la actividad locomotora en la fase de búsqueda de la ingestión

de alimento y cuando el organismo está privado de alimento (Mileykovskiy et al., 2005). Yamanaka y colaboradores mostraron que dicha actividad no se presenta en los ratones que no producen orexinas (Yamanaka et al., 2003). La hipótesis de que el sistema orexinérgico es más un regulador de la actividad motora más que del hambre, es respaldada por las proyecciones de las neuronas orexinérgicas a la corteza cerebral, al locus coeruleus, a los núcleos del rafe (Eggerman et al., 2001; Hagan et al., 1999; Haj-Dhmane & Shen, 2005; Murai & Akaike, 2005; Yoshida et al., 2006); estructuras claramente implicadas en el mantenimiento de la vigilia. Ahora bien, la actividad inducida por estas estructuras tiene que ser dirigida hacia una meta, para esto, las ORX pueden actuar en el sistema de la motivación-recompensa; en el VTA y en el NAc (Baldo et al., 2003; Harris et al., 2005; Thorpe & Kotz, 2005; Berridge & España, 2006; Borgland et al., 2006). En general podríamos decir, citando a Takeshi Sakurai que *el sistema orexinérgico se encarga de censar los ambientes internos y externos del organismo* (Sakurai, 2007), y probablemente ser uno de los principales mensajeros encargados de que una determinada respuesta se presente.

Como mencionamos anteriormente, las neuronas MCHérgicas presentes en el HL (y en la zona incerta) son importantes reguladoras de la conducta alimenticia y el balance energético (Pereira Da Silva et al., 2003; ver Nahon, 2006). Dicha función fue por primera vez elucidada en 1996 por el grupo de Maratos-Flier en Boston. Mostraron que el ARNm de la MCH se encontraba elevado en los ratones *ob/ob*³. Este efecto se repetía cuando se privaba de

³ Esta cepa de ratones se usaba como un modelo de obesidad. Posteriormente se identificaría que estos roedores eran incapaces de producir la hormona leptina (Zhang et al., 1994).

alimento a ambas cepas, a los normales y a los *ob/ob*. Indicando que la MCH reaccionaba ante un reto energético y que probablemente es modulada por señales de saciedad como la leptina o la α -MSH (Qu et al., 1996; Tritos et al., 1998; Cowley et al., 2003; Jobst et al., 2004; Gavrilu et al., 2005; Harthoorn et al., 2005). La MCH ejerce sus efectos fisiológicos a través de un par de receptores acoplados a una proteína G (receptores metabotrópicos), los MCHR1 y los MCHR2, siendo el 1 el principal mediador de los efectos sobre la ingestión de alimento (ver Saito et al., 2000). Al igual que con las ORX, se pudo determinar que la administración central (aguda y crónica) de la MCH y de otros agonistas del MCHR1 producía hiperfagia y una alza en el peso corporal (Qu et al., 1996; Della-Zuana et al., 2002; Morens et al., 2005) probablemente actuando en núcleos hipotalámicos como el PVN, el ARC, el DMH y el HL interactuando con moléculas orexigénicas (ej. NPY y ORX) y anorexigénicas (ej. CART y α -MSH) (Tritos et al., 1998; Guan et al., 2002; Abbott et al., 2003; Rao et al., 2008). También es posible que el efecto hiperfágico de la MCH se deba a que ésta actúe en sitios extra-hipotalámicos como el NAc (Georgescu et al., 2005; Guesdon et al., 2009). Otra evidencia que apoya la participación de la MCH en la regulación de la conducta alimenticia es que los ratones modificados genéticamente que no producen este péptido ni su receptor presentan bajo peso corporal y una ingesta de alimento disminuida (Alon & Friedman, 2006; Shimada et al., 1998; Marsh et al., 2002). Esto llevó a desarrollar y probar algunos fármacos que bloquean el sistema de la MCH; demostrando que tanto la inactivación genética como la farmacológica del MCHR1 reduce la ingestión de alimento (Morens et al., 2005; Kowalski et al., 2006; Mendez-Andino & Wos, 2007).

Fuera del HL, en otro núcleo conocido como el **DMH**, las ORX y otros péptidos parecen estar regulando de igual forma la ingestión de alimento. La participación del DMH en la conducta alimenticia ha sido demostrada primordialmente por los trabajos de Bernardis y Bellinger en la década de los 70s, en los que mostraron que las lesiones de este núcleo producía un síndrome parecido al observado con las lesiones del HL y del VMH (dependiendo del estado energético previo a la lesión) (Bellinger et al., 1979, 1999; Bellinger & Bernardis, 2002). De hecho, el DMH se comunica recíprocamente con el VMH y con HL, influenciando su actividad y como consecuencia a la ingestión de alimento (Luiten & Room, 1980). La actividad del DMH, a su vez, es modulada por señales periféricas involucradas en el consumo y gasto de energía como la grelina, la leptina, y la colecistocinina (CCK) (Chen et al., 2008; Kobelt et al. 2008). Así, la administración intra DMH de esta última, reduce el consumo de alimento aparte de regular a la baja el ARNm del NPY (Chen et al., 2008), un péptido orexigénico, cuyos niveles de expresión en el DMH aumentan ante una privación de alimento (Bi et al., 2007). Adicionalmente, la administración de CCK produce una activación de núcleos involucrados en la saciedad como el PVN (Chen et al., 2008). De manera contraria a lo observado con la CCK, la infusión del AGRP produce un incremento en la ingestión de alimento (Wirth & Giraud, 2001). Es importante recordar que el AGRP, producido en el ARC, es un importante regulador de la homeostasis energética, y que su mecanismo de acción es bloquear a los receptores a melanocortina 4 (MC4-R), cuyo agonista endógeno es el factor de saciedad α -MSH, que al igual que el AGRP afecta a las neuronas del DMH (Singru et al., 2005). Estos datos dejan ver que la comunicación entre el ARC y

el DMH puede ser esencial para la modulación energética. Otras moléculas que se expresan en el DMH importantes para la ingestión de alimento son la CRH, la MCH y las mismas orexinas (Dube et al., 1999; Nambu et al., 1999; Backberg et al., 2002; Abbott et al., 2003; Kawaguchi et al., 2005).

En los últimos años se ha desarrollado un debate sobre la participación del DMH como un núcleo regulador de los ritmos circadianos, ya que existen datos contradictorios (Chou et al., 2003; Gooley et al., 2006; Mieda et al., 2006; Landry et al., 2007). Los ritmos son susceptibles a la sincronización por diversos estímulos; es decir, que un “sincronizador” es capaz de cambiar el ritmo de un determinado proceso biológico (como el sueño). Entre estos sincronizadores, la luz es el más importante. Para que pueda llevarse este proceso es necesaria la integridad deL **NSQ**, el reloj maestro. Sin embargo, hay otros estímulos que parecen salir del domino del supraquiasmático, la ingestión de alimento es el mejor ejemplo, sino es que el único. Dentro de este contexto, los grupos liderados por Clifford B. Saper y por Masashi Yanagisawa (el mismo que descubrió las ORX) han demostrado que la actividad del DMH se sincroniza por la restricción de alimento. En estos animales, justo antes de la entrega del alimento se puede observar un incremento en la actividad locomotora, la temperatura corporal y la vigilia. Dicho incremento es bloqueado por lesiones del DMH (Gooley et al., 2006; Mieda et al., 2006). Sin embargo, otros autores no han podido replicar estos resultados (Landry et al., 2007) por lo que la discusión continúa.

Como es evidente, se ha realizado un esfuerzo significativo para identificar las áreas cerebrales, en especial, en esta parte, regiones

hipotalámicas involucradas en la regulación de la ingestión de alimento. Sin embargo, existen aún pocos datos que muestren los mecanismos intracelulares participantes en dicha conducta. Actualmente, se ha identificado a la proteína cinasa dependiente de adenosin monofosfato (AMPK), la AMPK, como un componente central en el balance energético. La AMPK se activa cuando hay niveles bajos del adenosin trifosfato (ATP), la señal energética por excelencia; es decir, cuando el organismo necesita energía. A nivel hipotalámico, se ha mostrado que las señales de saciedad (ej. leptina) inhiben a esta proteína, mientras que las señales promotoras del hambre (ej. ghrelina) la activan (para una revisión mas amplia de este tema ver Williams et al., 2006 o Carling, 2005). Así, por ejemplo, tenemos que la leptina y la insulina activan a otra proteína cinasa, la PI3K, en las neuronas del ARC que producen POMC pero estas mismas moléculas producen lo contrario en las neuronas productoras del NPY/AGRP. Indicando que la activación de la PI3K es necesaria para la saciedad (Xu et al., 2005). También se ha involucrado a la cascada de las MAP cinasas. Por ejemplo, se ha mostrado un incremento en los niveles del ERK fosforilado (activo) en el PVN de ratas privadas de alimento (Morikawa et al., 2004).

Recapitulando, podemos decir que el hipotálamo es un complejo de núcleos encargados, entre otras funciones, de la regulación homeostática de la ingestión de alimento, detectando los cambios energéticos periféricos (y algunos centrales como en el caso de la glucosa) y comunicando la situación al resto del cerebro para que una conducta se ejecute (**Figura 1.3**). Pero, parafraseando a Clifford Saper (Saper et al., 2005): *Si la alimentación fuera*

controlada solo por mecanismos homeostáticos, muchos de nosotros estaríamos en nuestro peso ideal, y la gente consideraría a la conducta alimenticia como la respiración o la eliminación, una parte necesaria pero poco emocionante de nuestra existencia. Sin embargo, los humanos pagamos grandes cantidades de dinero por una buena comida (algo que indica que la comida en si misma es recompensante) y casi cualquier mamífero comerá mas allá de sus necesidades homeostáticas si se le presenta un alimento muy apetitoso. Por esto es muy importante conocer la otra parte de la regulación de la ingestión de alimento, aquella en donde participa el núcleo accumbens.

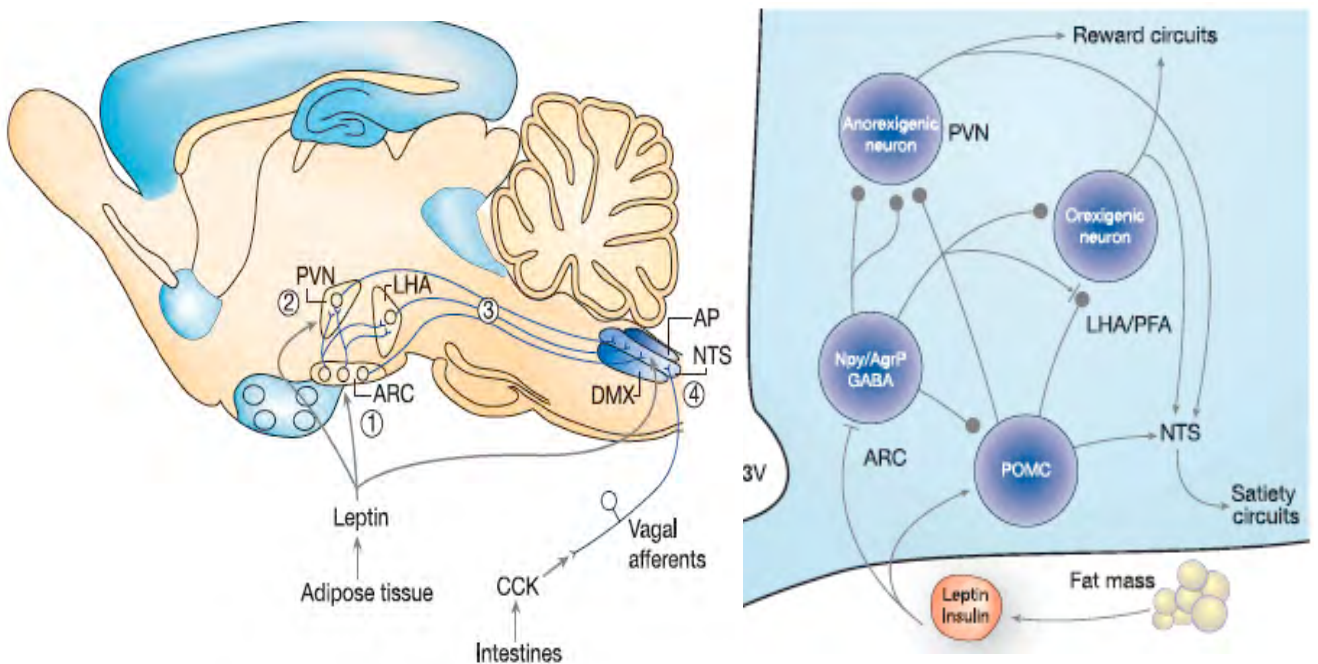


Fig. 1.3 Representación de un corte sagital (izq) y uno coronal (der) de los circuitos hipotálamicos reguladores de la ingestión de alimento con las moléculas características de cada núcleo. A destacar las proyecciones del PVN y del HL hacia los centros que controlan los procesos de recompensa en el panel de la derecha. Adipose tissue, tejido adiposo; AgrP, gen relacionado a la proteína agoutio; AP, área postrema; ARC, núcleo arcuato; CCK, colecistocinina; DMX, núcleo dorsal motor del vago; Insulin, insulina; intestines, intestinos; Leptin, leptina; LHA, lateral hypothalamic area; NPY, neuropeptido Y; NTS, núcleo del tracto solitario; PFA, perifornical área; POMC, proopiomelanocortina; PVN, hipotálamo paraventricular. ; Reward circuits, corcuitos de recompensa; satiety circuits, circuitos de saciedad. Imágen tomada de Morton et al., 2006.

1.2.2 Sistema de la motivación recompensa: énfasis en el núcleo accumbens

1.2.2.1 Fisiología del núcleo accumbens

El NAc, es una región cerebral que se encuentra en la parte ventral-anterior (alrededor de 2 mm posterior a Bregma), en la rata. El NAc forma parte del estriado ventral, y de la llamada amígdala extendida (Alheid, 2003), junto con el globo pálido ventral (PV), las islas de calleja (ICj) y parte del tubérculo olfativo (OT), como contraparte al estriado dorsal (formado por el núcleo caudado y el núcleo putamen en los humanos; y en los roedores y otros mamíferos el núcleo caudado-putamen). De manera más general, y de acuerdo al patrón de comunicación que tiene (detallado mas adelante), el NAc se considera parte del cerebro límbico anterior. Ventral al NAc podemos encontrar al PV y a las ICj; hacia la región ventrolateral se localiza la corteza piriforme (Pir); dorsal al NAc se ubica el núcleo caudado-putamen, y en la región dorsomedial los ventrículos laterales y el septum.

Anatómicamente, el NAc se divide en tres subterritorios con características muy particulares: el NAcS, el núcleo accumbens core (NAcC) y el polo rostral (menos estudiado). El primero localizado en la parte ventromedial del núcleo y el segundo en la región dorsolateral (**Figura 4**) (Meredith, 1999; Meredith et al., 1989; Meredith et al., 1996; Voorn et al., 2004; Záborszky et al., 1985). En este trabajo nos enfocaremos en la fisiología del NAcS, ya que el NAcC esta más relacionado con las funciones del estriado dorsal, es decir, con el control motor. Es mas, la complejidad neuroquímica y

citoarquitectónica es mucho mas compleja en el NAcS que en el NAcC (Prensa et al., 2003), como veremos adelante.

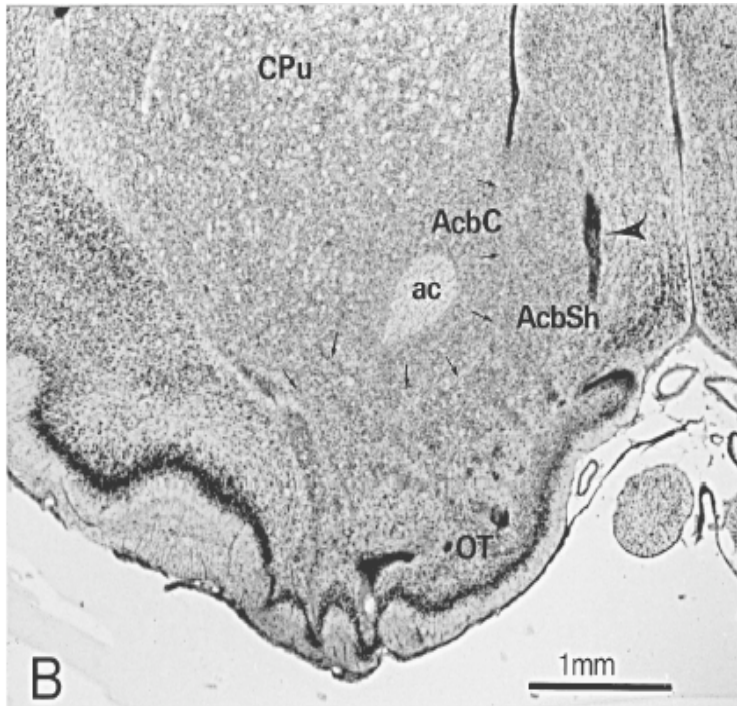
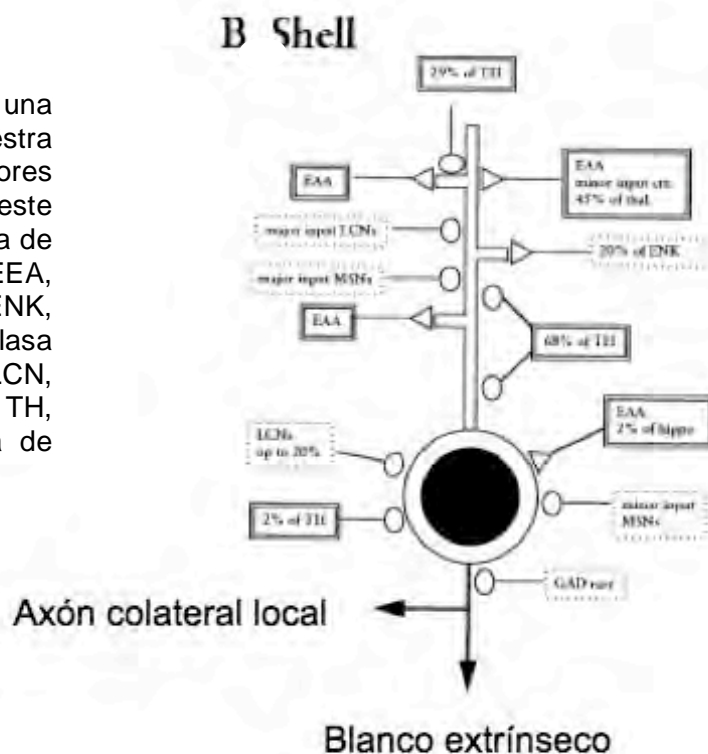


Fig 4 Segmentación anatómica del NAc en un corte coronal de cerebro de rata. Las flechas indican el borde entre el core y el shell. ac, comisura anterior; AcbC, Núcleo accumbens core; AcbSh, núcleo accumbens shell; CPu, núcleo caudado putámen; OT, tuberculo olfativo. Tomado de Groenewegen et al., 1999.

Las células principales (de proyección) del NAc (así como las de todo el estriado) son las llamas espinosas de mediano tamaño (MSNs; por sus siglas en inglés), que son neuronas GABAérgicas y forman alrededor del 90% de toda la población celular de este núcleo. El 10% restante son interneuronas colinérgicas y GABAérgicas que están modulando la actividad de las MSNs (Kawaguchi et al., 1995; Meredith et al., 1989; Prensa et al., 2003; Taverna et al., 2004; Waalas & Fonnum, 1979). Estas, a su vez, también se autorregulan por medio de axones colaterales (Taverna et al., 2004) (**Figura 5**). Estas células también co-liberan diferentes péptidos como encefalina (ENK), sustancia P (SP), somatostatina (SMS) y NPY; así como gases (óxido nítrico) y lípidos (endocannabinoides, detallados mas adelante). De esta manera se han caracterizado hasta cuatro tipos de interneuronas y dos tipos de MSNs (Kawaguchi et al., 1995; Meredith, 1999).

Fig 1.5 Ejemplificación de una neurona del NAcS que muestra los diferentes neurotransmisores que modulan la actividad de este núcleo, así como la existencia de axones colaterales. EEA, aminoácidos excitadores; ENK, encefalina; GAD, descarboxilasa del ácido glutámico; LCN, neuronas del circuito local; TH, tirosina hidroxilasa. Tomada de Meredith, 1999.



Aferencias

El NAc recibe información de diversas áreas cerebrales; como mencionamos antes, el NAcS tiene aferencias principalmente del sistema límbico y el NAcC de las estructuras que regulan el control del movimiento. También existe comunicación directa e indirecta entre las dos regiones del NAc (Van Dongen et al., 2005). Así, el NAc recibe información glutamatérgica desde el hipocampo (la región ventral primordialmente, subiculum) a través de la fimbria fornix, desde la corteza prefrontal (principalmente de la región infralímbica y del área ventro postero lateral), desde la amígdala basolateral y del tálamo (Christie et al., 1985; French & Totterdell, 2003; Kelley et al., 2005; Meredith et al., 1990; Nakano et al., 1999; Swanson, 1982; Vertes, 2004; Voorn et al., 2004; Waalas & Fonnum, 1979 Yim & Mogenson, 1982). Adicionalmente, tiene aferencias aminérgicas a través del HPM: dopaminérgicas (DA co-liberada con CCK) principalmente del VTA y en menor medida desde la sustancia nigra pars reticulata (Beckstead et al., 1979; Dahlstrom & Fuxe, 1964; Fallon & Moore, 1978; Haglund et al., 1979; Koob et al., 1975; Lanca et

al., 1998; Pasquier et al., 1977; Sombers et al., 2009; Voorn et al., 2004; Waalas & Fonnum, 1979). El NAcS también es innervado por fibras serotoninérgicas provenientes de los núcleos del rafe (NR) (Brown & Molliver, 2000; Moore et al., 1978; Pasquier et al., 1977) y por noradrenalina desde el locus coeruleus (LC) y del NTS (Delfs et al., 1998; Farley & Hornykiewicz, 1977; Pasquier et al., 1977; Swanson & Hartman, 1975).

Cabe resaltar, para importancia del presente trabajo, que el hipotálamo, específicamente la región lateral y el área preóptica (APo), envía información GABAérgica y orexinérgica, respectivamente, hacia el NAcS (Chiba & Murata, 1985; Peyron et al., 1998).

El patrón de actividad de las células del NAc es muy particular, presentan dos estados de actividad: un “down-state” o estado bajo y un “up-state” o estado alto. Caracterizados por diferentes potenciales de membrana, el primero de -61 a -94 mV y el segundo de -71 a -40 mV (O’Donnell & Grace, 1995; O’Donnell et al., 1999; Wilson & Kawaguchi, 1996; Yim & Mogenson, 1988), dependiendo del tipo de neurona, por ejemplo, las neuronas del NAcS son menos excitables que las del NAcC (O’Donnell & Grace, 1993), pero las interneuronas son aún más excitables (Taverna et al., 2007). Entonces, las neuronas que se encuentren en un down-state tendrán menos probabilidad de disparar, lo contrario ocurre con las que se encuentren en un up-state.

La actividad del NAc es diferencialmente modulado por las estructuras que lo innervan. Principalmente, la DA del VTA y el glutamato proveniente de la corteza frontal, del hipocampo y de la amígdala. Así, se ha demostrado que la DA disminuye la excitabilidad del NAc (O’Donnell & Grace, 1995), potencialmente a través de la modulación de las entradas excitadoras a este

núcleo (Charara & Grace, 2003). Sin embargo, dicha modulación es mucho más compleja de lo que se puede leer, depende de varios factores como los tipos de receptores activados⁴, de los sitios de acción de los neurotransmisores (si es en la pre- o post-sinapsis), o que tipo celular es el que está siendo innervado (Goto & Grace, 2005; Hjelmstad, 2004). Se ha mostrado que la actividad glutamatérgica hipocampal puede, de igual manera, estimular al NAc y modular a la alza la actividad dopaminérgica del VTA (a través de una potencial inhibición del PV) (Floresco et al., 2001a y b), y de alguna forma producir que el NAc responda menos eficientemente a la estimulación amigdalina, mientras que la actividad de esta última facilita la estimulación del NAc por parte del hipocampo (Mulder et al., 1998). Patricio O'Donnell proponen al hipocampo como el principal responsable de la excitación del NAc por las siguientes razones: la estimulación del hipocampo hace que las neuronas del NAc cambien a un estado alto (mayor probabilidad de disparo), en este estado, el NAc es capaz de responder a la estimulación de la corteza frontal o de la amígdala (O'Donnell & Grace, 1995; Goto & Grace, 2008; Goto & O'Donnell, 2001). Indicando que la integración de la información límbica y cortical se procesa al nivel de una sola neurona. La convergencia de esta información puede traer como consecuencia la ocurrencia de diversos eventos de plasticidad sináptica como la potenciación a largo plazo (LTP) o la depresión a largo plazo (LTD), ambos involucrados en el aprendizaje y la memoria (Goto & Grace, 2008).

⁴ La DA puede actuar a través de dos familias de receptores de las cinco descritas, la familia D1 y la familia D2, los primeros acoplados a una proteína G excitadora y los segundos a una proteína G inhibidora.

Eferencias

Ya que la información se integra en el NAc, este puede proyectar a diversas áreas como al VTA, la sustancia negra, el globo pálido (la región ventral, PV) (Kalivas et al., 1993; Nauta et al., 1978; Walaas & Fonnum, 1980); a regiones hipotalámicas como el APo, el HL y el DMH (Groenewegen et al., 1984; Kita & Oomura, 1982; Mogenson et al., 1983; Powell & Leman, 1976; Sano & Yokoi, 2007; Usuda et al., 1998); a regiones del tallo cerebral como al área parabraquial (Usuda et al., 1998), al complejo habenular, al tálamo, a la corteza frontal (Lecourtier & Nelly, 2007; Powell & Leman, 1976). La **figura 1.6** muestra el patrón de aferencias y eferencias del NAc con algunas funciones asociadas.

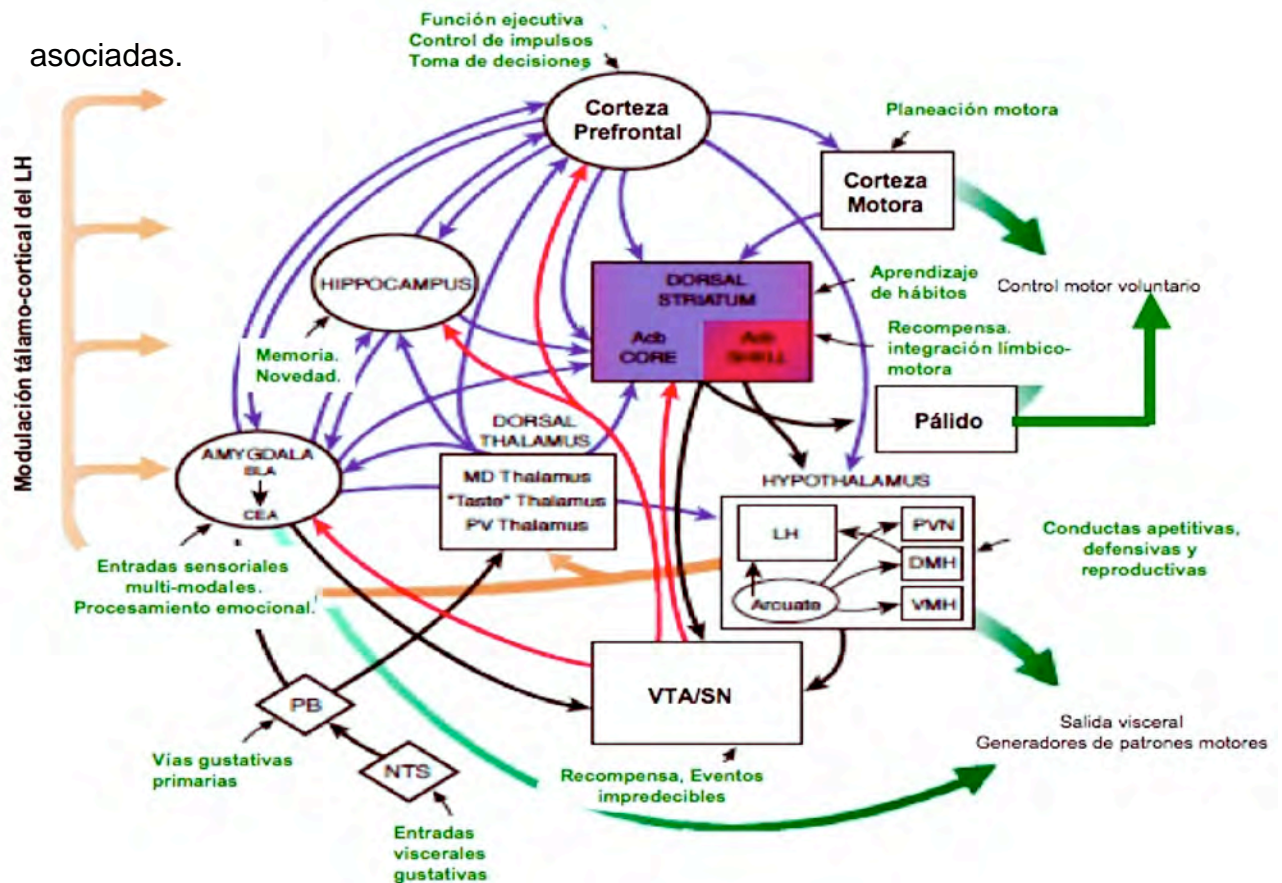


Fig 1.6 Patrón de aferencias y eferencias del NAc principalmente aquellas relacionadas con la motivación y la ingestión de alimento. Las flechas azules indican transmisión glutamatergica, las rojas transmisión dopaminérgica y la negras muestran vías GABAérgicas. Las señales gustativas primarias surgen del NTS y del PB, y posteriormente se codifican en otras estructuras. Aquí se observa el papel central que tiene el NAc en integrar diferentes señales límbicas para después ser transformadas en respuestas motoras, siguiendo la idea de Mogenson, que propone al NAc como una interfase límbico-motora. Imagen tomada de Kelley et al., 2005.

Como puede observarse, el NAc es un componente central del sistema límbico. El NAc integra las señales límbicas y corticales, y a su vez proyecta a estructuras relacionadas con el control motor como el PV o la SN. Esta organización anatómica sitúa al NAc como un sitio de integración emotivo-contextual y de planeación motora. Esto llevó a que Gordon Mogenson lo bautizara como la interfase límbico-motora del cerebro, traduciendo la motivación en acción (Mogenson et al., 1980). Hablando en términos de procesos cognitivos y conductuales, se puede decir que el NAc integra la información contextual (hipocampo) con el estado emocional (amígdala) y la saliencia y el valor de un determinado estímulo (VTA y corteza frontal, respectivamente), esto último puede estar matizado por el estado interno del organismo (hipotálamo). Ya que se ha dado la integración es necesario el despliegue conductual (globo pálido, sustancia negra y corteza frontal) acorde a la situación, en otras palabras, generar conductas dirigidas hacia una meta. Todo esto con el fin último de que un determinado organismo puede adaptarse exitosamente a su medio ambiente siempre cambiante.

Así, recapitulando la primera parte de este escrito, decimos que el NAc media la respuesta ante estímulos motivacionales (reforzadores), como el alimento, haciendo posible el despliegue de conductas que traen como consecuencia el consumo del reforzador y la obtención de la recompensa. Aunque, como dice Cyriel Pennartz, (aumentando la complejidad del NAc): *el NAc es una colección de ensambles neuronales con diferentes connotaciones funcionales y conductuales... los cuales no proyectan monolíticamente a sus estructuras blanco. Se propone que cada ensamble es capaz de generar una salida, la cuál es transferida a un conjunto de estructuras características para dicho ensamble, y entonces se pueda producir una conducta que esté específicamente ligada a este*

ensamble. Por esto, podemos llamar a este complejo de estructuras como el sistema de la motivación-recompensa, o de manera más general de la flexibilidad conductual (Goto & Grace, 2005, 2008; Mogenson et al., 1980; Pennartz et al., 1994; Tzschentke, 2000). Como veremos adelante, este sistema es el principal afectado en diversos trastornos psiquiátricos como la adicción a las drogas de abuso o la esquizofrenia (Goto & Grace, 2008). Es por esto que resulta fascinante el estudio del núcleo accumbens. A continuación veremos las evidencias conductuales que refuerzan lo dicho anteriormente, pero principalmente enfocados en como este sistema regula a la ingestión de alimento.

1.2.2.2 El núcleo accumbens y la motivación-recompensa

Quizá el neurotransmisor mas famoso involucrado en la motivación es la DA, principalmente la que se produce en el VTA y se libera en el NAcS (la vía mesolímbica). Siendo estas dos estructuras parte del llamado sistema cerebral de la recompensa (SCR) o incluso llamado “el sistema del placer”. Este calificativo fue otorgado gracias a los experimentos seminales de James Olds y Peter Milner en la década de los 50’s y que abrieron toda una avenida de investigación tratando de explicar como el cerebro genera el placer; a ésto se le llama, la Neurobiología de la Recompensa.

En 1954, James Olds y Peter Milner, inspirados por las técnicas de implantación y estimulación de Rudolph Hess, Penfield y Magoun, descubrieron que las ratas aprendían a regresar a los sitios de su ambiente en donde se les había dado estimulación eléctrica directa al área septal del cerebro. La observación de una preferencia de lugar aprendida sugirió a Olds y Milner que la estimulación era reforzante, lo que subsecuentemente confirmaron ya que podían entrenar a ratas para presionar una palanca, que era contingente con la estimulación (auto-estimulación eléctrica intracraneal, ICSS por sus siglas en inglés) del área septal e incluso las ratas eran capaces de pasar por una reja electrificada para alcanzar la palanca que les permitía auto-estimularse (**Figura 1.7**). A partir de estas observaciones se postuló que la estimulación en el área septal podía servir como un “reforzador” y que activaba circuitos cerebrales relevantes para la búsqueda de incentivos naturales como la comida y el contacto sexual (Olds & Milner, 1954; Olds, 1958). Fue la primera demostración junto con los estudios de lesión y estimulación hipotalámica de los sistemas cerebrales que controlan la motivación.

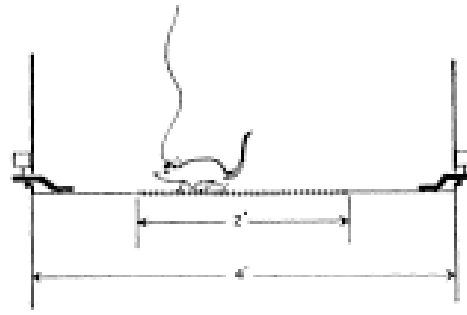
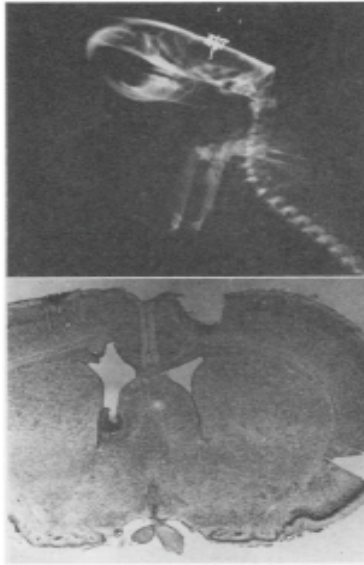


Fig 1.7 La imagen de la izquierda muestra el sitio de implantación del electrodo de auto-estimulación usado por Olds y Milner. El panel superior es un dibujo de uno de los dispositivos usados en el experimento. Las ratas son capaces de soportar estímulos aversivos con tal de autoestimularse. Tomado de Olds, 1958.

Posteriormente, se demostró que el sitio de estimulación eléctrica era el HPM y que dicha estimulación producía una liberación de DA en el NAc y en la corteza prefrontal (Cheer et al., 2006; Fiorino et al., 1993; Gratton et al., 1988; Keene, 1976; Matthews, 1977; Olds & Olds, 1969; Rolls, 1971, 1975, 2005; Rolls & Cooper, 1973; Zarevics & Setter, 1979). También se observó que la administración de agonistas dopaminérgicos facilitaban la ICSS, mientras que los antagonistas la disminuían (Gallistel, 1986; Zarevics & Setter, 1979). Otros reforzadores artificiales como las drogas de abuso también tienen su sustrato cerebral en el sistema de la recompensa. La mayoría de las drogas de abuso (alcohol, opiáceos, cocaína, anfetaminas, nicotina y cannabinoides) producen un aumento en la liberación de DA en el NAc (especialmente en el NAcS), ya sea por acción directa en este núcleo o afectando al VTA (Di Chiara & Imperato, 1988; Nestler, 2005; Pich et al., 1997; Pontieri et al., 1995; Wise, 1987; Tanda et al., 1997). Este efecto también es producido por los reforzadores naturales como el alimento (particularmente un alimento apetitoso) o el sexo (Bassareo & Di Chiara, 1999; Becker et al., 2001; Martel &

Fantino, 1996; Taber & Fibiger, 1997; Tsai et al., 2006). Adicionalmente, Regina Carelli demostró que en el NAc existen neuronas que sólo se activan con el consumo de cocaína y otras sólo con el alimento (Carelli, 2000), probablemente por una acción diferencial de la DA en el NAc. Todos estos datos, en conjunto con otros tantos en la literatura, llevaron a formular la “hipótesis dopaminérgica de la recompensa”, que postula a este neurotransmisor como el responsable de la sensación subjetiva de placer asociada con los reforzadores positivos (artificiales y naturales) (Marsden, 2006; Spanagel & Weiss, 1999; Wise, 2008). Sin embargo, existen opositores a esta hipótesis fundamentados en estudios más detallados acerca de la participación de la DA en estos procesos. El conocer esto nos brinda un mejor entendimiento de cómo funciona el NAc. Las evidencias principales vienen de estudios en donde se muestra que no sólo los reforzadores positivos provocan una mayor actividad de las células del VTA y como consecuencia mayor liberación de DA en el NAc, sino que los negativos también (Brischoux et al., 1999; Kalivas & Duffy, 1995; Leknes & Tracey, 2008; Saal et al., 2003; Ventura et al., 2007). Esto coincide con los estudios que muestran que en el NAc existe una interacción entre el sistema glutamatérgico y el dopaminérgico para procesar los estímulos positivos y negativos, dependiendo del sitio del NAc que se estudie (de rostral a caudal, respectivamente) (Faure et al., 2008). Otros trabajos demuestran que la DA (mesolímbica) es necesaria para la detección de la “saliencia”⁵ del estímulo y para la predicción de la recompensa (Berridge, 2006; Bunzeck & Düzzel, 2006; Schultz, 1998; Tobler et al., 2005). Otro dato

⁵ La saliencia se refiere a que tan relevante es un estímulo para el organismo. Es decir, si es un estímulo es novedoso o si tiene ciertas características físicas que lo hacen sobresalir en un ambiente determinado.

que respalda esto es que los ratones genéticamente modificados que no producen DA presentan una preferencia normal por la sucrosa, pero trabajan menos por ella (Matson-Cannon & Bseikri, 2004). Un fenómeno similar ocurre con el alimento cuando se bloquea farmacológicamente al sistema dopaminérgico (Barbano & Cador, 2005; Nowend et al., 2001; Salamone et al., 2002). De hecho, el bloqueo de los receptores D1 y D2 en el NAcS no modifica la ingestión de alimento en ratas saciadas (Baldo et al., 2002). Involucrando de esta manera al sistema mesolímbico, mas que con la recompensa, con la conducta de búsqueda de la recompensa, lo que devela otra función; la del aprendizaje (Berridge & Robinson, 1998; Hnasco TS et al., 2005; Ikemoto & Panksepp, 1999; Owesson-White et al., 2008; Wise, 2004). Con respecto a esto, algunos experimentos, usando técnicas de biosensores por ejemplo, han observado una liberación de DA en el NAc con los estímulos que predicen la entrega del reforzador (droga de abuso o alimento), como una luz o un sonido, provocando la búsqueda de la recompensa (Cheer , 2007; Phillips et al., 2003; Roitman et al., 2004; Schott et al., 2008; Yun et al., 2004).

En el modelo de la “sensibilización-incentivo” de Kent Berridge y Terry Robinson (Berridge & Robinson, 1993, 1998, 2008), se proponen dos procesos, independientes pero complementarios, responsables de la motivación: el “wanting” (o deseo por) y el “liking” (o gusto por, netamente subjetivo). Desde este punto de vista, el sistema mesolímbico es el responsable del “wanting”, involucrando, como se vio anteriormente, a la saliencia de los estímulos y al aprendizaje, y como consecuencia a la predicción de los reforzadores. En otras palabras, en un contexto determinado un organismo está expuesto a una infinita variedad de estímulos con diferentes características físicas que los

hacen más o menos atractivos (saliencia) para el sujeto en cuestión. La DA mesolímbica se encargaría de señalar esa saliencia y de dirigir la conducta guiada por ese particular estímulo. Así también, la obtención del reforzador puede ser asociada con estímulos ambientales que en un futuro le servirán al animal para anticipar su conducta y adaptarse efectivamente a su medio ambiente (aunque algunas veces esto se vuelve poco adaptativo como en el caso de la adicción a las drogas de abuso). Es decir, el animal aprende que cuando se presenta un estímulo A entonces ocurre B. Todo esto por acción de la DA en el NAc. Existen muchos trabajos en la literatura que se encargan de describir esto a detalle (Berridge, 2006; Berridge y Robinson, 1993, 1998; Cannon & Bseikri, 2004; Carelli, 2004; Lisman & Grace, 2005; Schultz, 1998; Wise, 2004, 2005).

En pocas palabras podemos decir que la función de la DA está más ligada con la motivación que con la recompensa. Esta última guarda una íntima relación con el “liking” en el modelo de Berridge-Robinson y tiene que ver más con fenómenos locales en el NAc, principalmente la región shell, como por ejemplo liberación de opioides. Aquí nos centraremos en el reforzador natural por excelencia y que es el pertinente para este trabajo, el alimento.

Existen datos que indican que la inhibición de grupos neuronales dentro del NAcS es necesaria para que se presente la recompensa (**Figura 1.8**). Esto ha sido estudiado por diversos métodos desde farmacológicos hasta los electrofisiológicos. El grupo de Howard Fields ha mostrado que justo cuando la rata está consumiendo un alimento apetitoso se produce una inhibición en una zona del NAcS, mientras que antes del consumo de este alimento otra serie de neuronas se excita, iniciando y dirigiendo la conducta (probablemente por

acción dopaminérgica o glutamatérgica) (Taha & Fields, 2005, 2006). Esto ocurre también en un modelo de auto-administración de cocaína y en un condicionamiento de preferencia de lugar, en donde un espacio particular es asociado con la entrega de un reforzador. Posteriormente, se presentarán la inhibición del NAcS cuando el animal se encuentre en el compartimiento condicionado (German & Fields, 2007; Schramm-Sapyta et al., 2006).

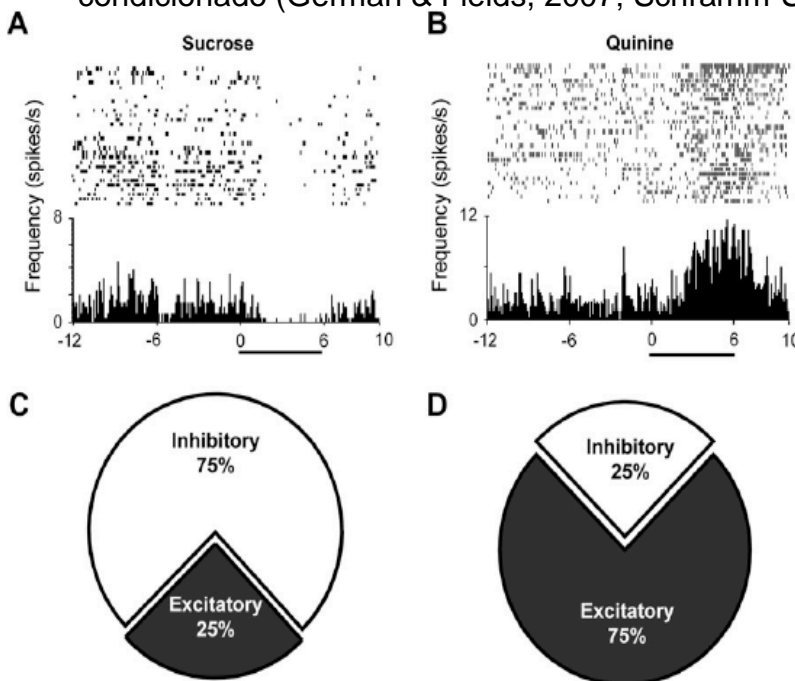


Fig 1.8 Registro electrofisiológico de las neuronas del NAcS ante dos estímulos gustativos representados como frecuencia de disparo (A y B). Ante un estímulo recompensante (sucrosa) las células del NAcS presentan un mayor porcentaje (75%) de inhibición (C) y presentan mayor excitación (D) ante un estímulo aversivo (quinina). Las líneas debajo del histograma indican el momento en que fue dado el estímulo. Es importante mencionar que en este paradigma las ratas no tenían que trabajar por la recompensa.

En esta misma línea, la inhibición farmacológica del NAcS produce un aumento en la ingestión de alimento en condiciones *ad libitum*; es decir, en condiciones en donde los animales no tienen que trabajar por éste. La administración de agonistas GABAérgicos o antagonistas glutamatérgicos en el NAcS estimula la ingestión de alimento (Faure et al., 2008; Hanlon et al., 2004; Reynolds & Berridge, 2001, 2002; Stratford, 2005; Stratford & Kelley, 1999; Stratford et al., 1998; Zheng et al., 2003); y el bloqueo de la actividad GABAérgica previene la hiperfagia inducida por un déficit energético (Kandov et al., 2006). Otros estudios muestran que la lesión del NAcS produce un aumento en el consumo de alimento en ratas que fueron privadas de alimento

(Johnson et al., 1996; Trojnar et al., 2007). Indicando que el aumento del tono inhibitor en el NAcS es necesario para que se presente la conducta alimenticia. La inhibición del NAcS puede estimular la ingestión de alimento en al menos dos formas muy probablemente complementarias: 1) afectando estructuras extra-accumbales como el PV, el VTA o el hipotálamo, y en esta última activando neuronas orexigénicas e inhibiendo las anorexigénicas, ver figura 6. (Stratford, 2005; Stratford & Kelley, 1999; Trojnar et al., 2007; Zheng et al., 2003). Al ser el NAc una estructura GABAérgica, mientras esté activa puede inhibir a otras estructuras. Pero cuando el NAc permanece silente las estructuras blanco se desinhiben provocando una excitación, en este caso, de los circuitos extra-accumbales que controlan la ingestión de alimento. Principalmente aquéllos que controlan la motivación por comer, como el VTA o el hipotálamo. **2)** De manera paralela o serial (aún por determinarse) el NAcS también codifica la palatabilidad de los alimentos; es decir, que tan apetitosos le parecen al organismo. Recordemos que un alimento con alto contenido energético (mayor cantidad de carbohidratos o grasas) tiende a ser mayormente preferido por los animales. Claro que esto tiene que estar acompañado con una textura y sabor aceptable para el organismo en cuestión.

Para la regulación de este último proceso se ha involucrado la participación del sistema opioidérgico (principalmente a las encefalinas y a los receptores μ) (Hayward et al., 2002, 2006; Leknes & Tracey, 2008; Peciña, 2008; Peciña et al., 2006), que también es un sistema inhibitor. Al igual que con los agonistas GABAérgicos, la administración de fármacos con acción opioidérgica en el NAcS facilita el consumo de alimento (en especial del paladable), cuyo efecto es bloqueado por los antagonistas opioidérgicos

(Bodnar et al., 1995; Hanlon et al., 2004; Kelley et al., 1996, 2000; MacDonald et al., 2003; Olszewski & Levine, 2007; Ragnauth et al., 2000; Sahr et al., 2008; Ward et al., 2006; Will et al., 2003; Zheng et al., 1998). Por otra parte, la infusión de agonistas opioidérgicos aumentan el impacto hedónico (el “liking”) de los alimentos paladables (Peciña, 2008; Peciña & Berridge, 2000; Will et al., 2003), medido por medio de la prueba de reactividad a los sabores que consiste en cuantificar reacciones faciales ante estímulos gustativos apetitosos o aversivos (**Figura 1.9**) (Berridge, 2003; Grill & Norgren, 1978).

Reacciones hedónicas (dulce)



Reacciones aversivas (amargo)

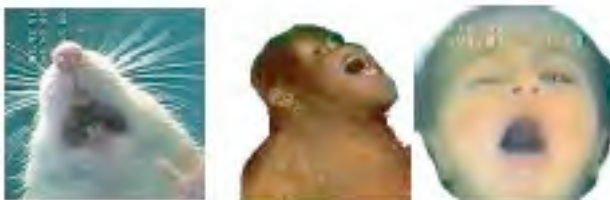


Fig 1.9 Reacciones faciales en diferentes especies ante la presentación de estímulos apetitosos (dulce, panel superior), calificadas como reacciones hedónicas; y aversivos (amargo, panel inferior) calificadas como reacciones aversivas. Esta prueba se ha usado para determinar si un determinado sistema de neurotransmisión participa o no en el “liking” del modelo de Berridge. Tomado de Peciña et al., 2006.

Ayudado por esta técnica Kent Berridge y colaboradores identificaron los “sitios clave” (hot spots) (**Figura 1.10**) en donde diversos tratamientos farmacológicos (opioidérgicos y GABAérgicos) en el NAcS de ratas producían reacciones conductuales positivas (movimientos linguales, masticatorios y faciales) asociadas con el consumo de un alimento apetitoso, aparte de una disminución en las reacciones aversivas provocadas por un alimento desagradable (Peciña et al., 2006; Peciña & Berridge, 2005; Reynolds & Berridge, 2002; Richardson et al., 2005; Smith & Berridge, 2007).

Contraste hedónico vs aversivo vs ingestión

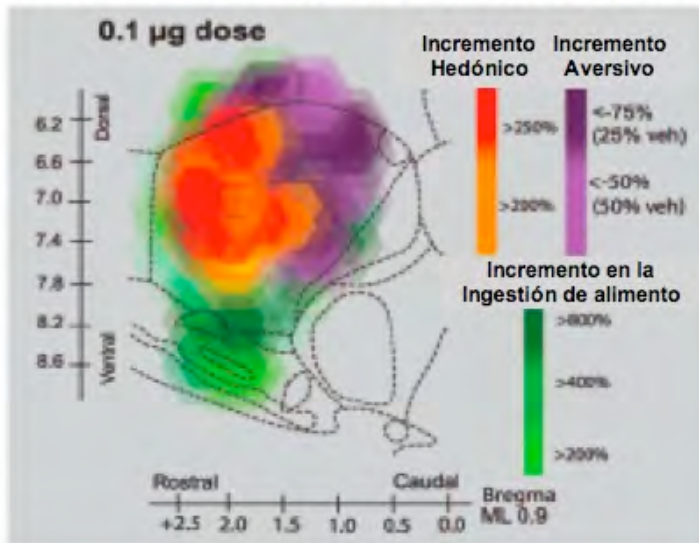


Fig 1.10 La imagen muestra los sitios dentro del NAcS (aquí representado en un corte sagital) en donde fármacos GABAérgicos y opioidérgicos incrementan el impacto hedónico de los alimentos (de naranja a rojo) y estimulan el consumo del mismo (de verde claro a verde oscuro). Tomado de Peciña et al., 2006.

Adicionalmente, estos tratamientos son capaces de afectar la actividad de otras estructuras involucradas con la regulación homeostática de la ingestión de alimento (Smith & Berridge, 2007; Will et al., 2003). Lo que apoya de fuerte manera la participación del sistema opioidérgico (así como del GABAérgico) del NAcS en los procesos de la recompensa alimenticia, estableciendo una relación funcional entre los sistemas hedónicos (o de recompensa) y homeostáticos que controlan la conducta alimenticia. Existen otros sistemas de neurotransmisión en el NAc que pueden participar en modular esta relación, como el colinérgico y el serotoninérgico (Hajnal et al., 2002; Jean et al., 2007; Pratt & Blackstone, 2009; Pratt & Kelley, 2004). En particular, se ha destacado la participación del sistema colinérgico del NAc en el procesamiento de la memoria de los sabores (Ramírez-Lugo et al., 2006). También péptidos hipotalámicos (orexigénicos y anorexigénicos) pueden afectar la ingestión de alimento actuando en el NAcS, como lo son las ORX o la MCH, aunque también el CART y la CRH (Guesdon et al., 2009; Jean et al., 2007; Thorpe & Kotz, 2005; Yang et al., 2005). Finalmente, en los últimos veinte años se ha descrito un sistema que parece despuntarse como uno de

los más importantes reguladores de la conducta alimenticia, afectando sus dos facetas, la homeostática y la hedónica, este es el sistema canabinérgico (SC).

1.3 EL SISTEMA CANABINÉRGICO

El sistema canabinérgico lo componen los llamados canabinoides endógenos o endocanabinoides (eCB), los receptores a canabinoides 1 y 2 o CB1 y CB2 respectivamente, actualmente se postula la existencia de un tercer receptor a canabinoides (Ryberg et al., 2007), y las enzimas encargadas de la síntesis y degradación de los eCB. También se ha propuesto la existencia de un transportador para los eCB (Glazer et al., 2005).

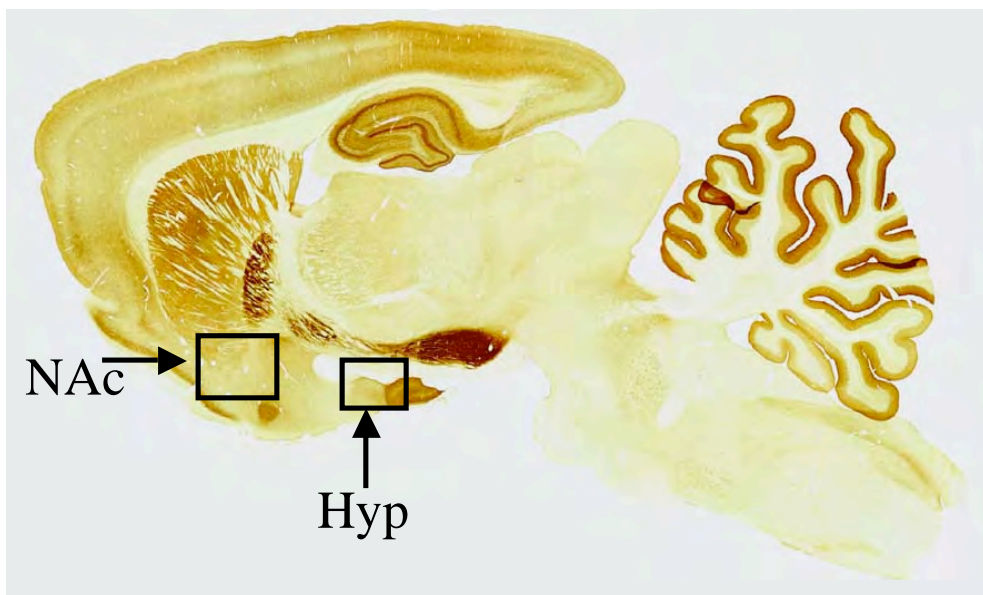


Fig 1.11 Inmunohistoquímica para el CB1 en un corte sagital cerebro de rata. Las regiones mas oscuras indican mayor presencia del receptor. Aquí destacamos inmunoreactividad en el núcleo accumbens (NAc) y el hipotálamo (Hyp).

Este sistema lleva su nombre gracias a la planta *Cannabis sativa*, mejor conocida como marihuana (la droga ilegal de uso más frecuente en nuestra sociedad). El principal componente psicoactivo de la marihuana es el Δ^9 -tetrahydrocannabinol o THC que fue aislado en los 60's por Rafael Mechoulam (Mechoulam, 1970). Esta molécula ejerce sus efectos a través de los receptores a canabinoides 1 y 2 (de ahí el nombre del sistema canabinérgico); el primero descubierto por Devane y cols., (Devane et al., 1988),

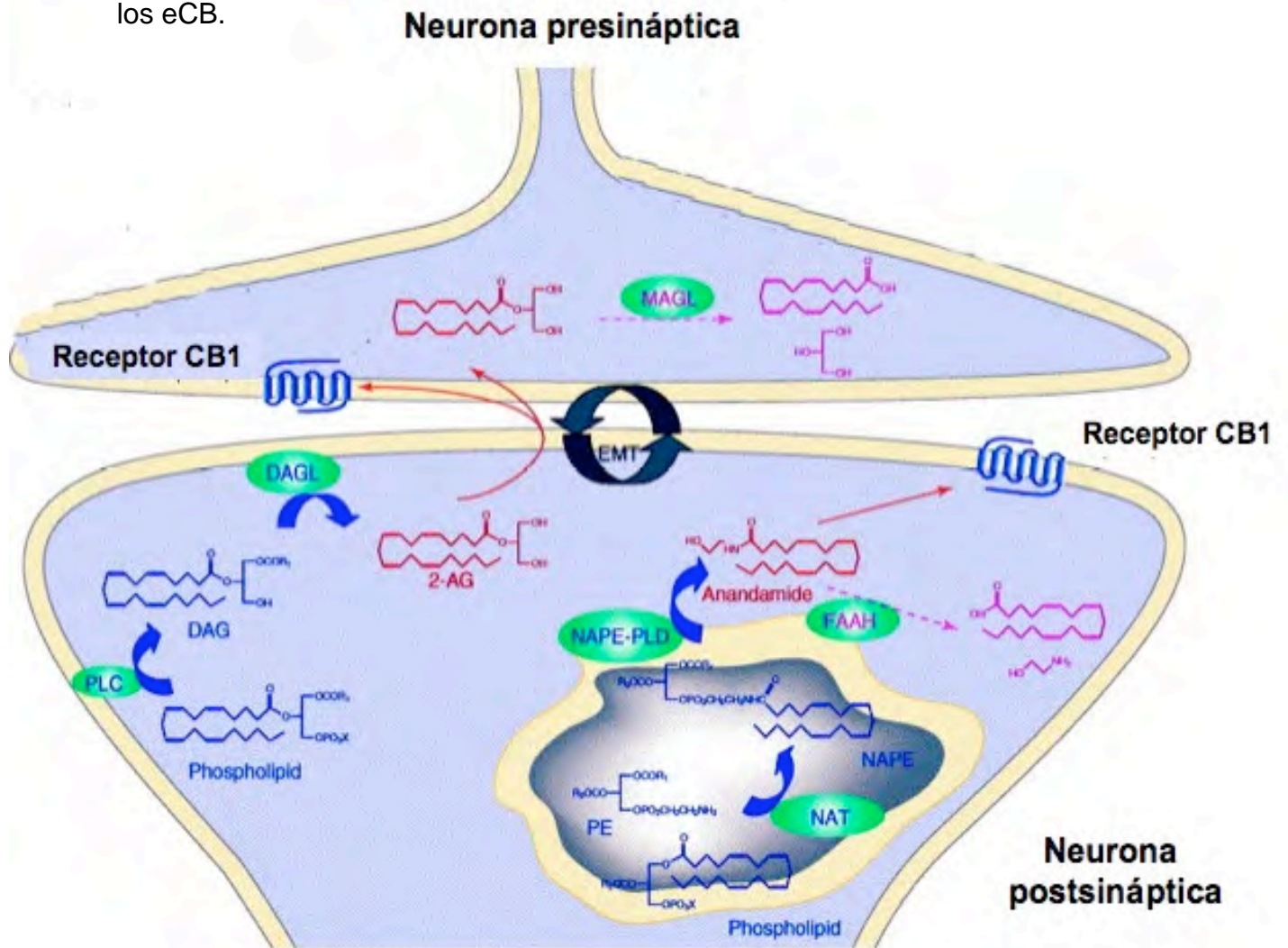
posteriormente clonado por Matsuda y cols. (Matsuda et al., 1990); y el segundo por Munro y cols., (Munro et al., 1993). El CB1 se expresa principalmente en el sistema nervioso central (**Figura 1.11**) (aunque también en la periferia) y el CB2 se encuentra principalmente en el sistema inmunológico (aunque también en el sistema nervioso central).

Dada esta distribución, en este trabajo nos enfocaremos en el CB1. Este receptor es metabotrópico de siete dominios transmembranales acoplado a una proteína G inhibidora (Gi), la cual inhibe a la adenilato ciclasa y bloquea los canales de calcio importantes para que se presente la despolarización y una posible liberación del neurotransmisor, aparte de afectar la actividad de los canales rectificadores de potasio (los GIRK). También se ha determinado que el CB1 puede activar a la cascada de segunda mensajería de las MAP cinasas e interfiere con la señalización de otros receptores metabotrópicos (Childers, 2006; Demuth & Molleman, 2006; Guo & Ikeda, 2004; Howlett & Fleming, 1984; Howlett et al., 1986; Mackie, 2008; Mcallister et al., 1999; Schickler & Kathmann, 2001; Valjent et al., 2001; Vásquez & Lewis, 1999). El CB1 se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro, inclusive se ha llegado a decir que es el receptor metabotrópico más abundante en el sistema nervioso central (Piomelli, 2003). Se expresa en la corteza cerebral, el hipocampo, el cerebelo, el núcleo caudado-putamen, el globo pálido, el tálamo, la sustancia negra, el complejo habenular, el tallo cerebral, la amígdala, el hipotálamo, el área tegmental ventral y en el núcleo accumbens. Estas últimas tres estructuras involucradas en la ingestión de alimento como se mencionó en capítulos pasados, (ver figura 11; Dove-Pettit et al., 1998; Fusco et al., 2004; Herkenham et al., 1990; Hermann et al., 2002; Katona et al., 2001; Marsicano & Lutz, 1999;

Mcdonald & Mascagni, 2001; Mailleux & Vanderhaeghen, 1992; Nyíri et al., 2005; Ong & Mackie, 1999; Svízenská et al., 2008; Tsou et al., 1997; Wittmann et al., 2007).

Los ligandos endógenos de estos receptores son los eCB. Actualmente se han descrito 6 de estas moléculas (Bisogno, 2008). Son de naturaleza lipídica derivados del ácido araquidónico, un componente estructural de las membranas celulares. De estos 6 sobresalen la araquidonil etanolamida o anandamida (ANA), descubierta en 1992 (Devane et al., 1992); el 2-araquidonil glicerol o 2-AG, descubierto en 1995 (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995); y la octadecenoamida u oleamida (OLE) en el mismo año (Cravatt et al., 1995). Los eCB no son almacenados en vesículas como otros neurotransmisores (GABA, ACh) sino que son producidos a demanda. Esto quiere decir que se producen al instante en el que el sistema lo requiera; se sintetizan en respuesta a la despolarización y a la consecuente entrada de calcio (Bisogno, 2008; Diana & Bregestovski, 2005; Schlicker & Kathmann, 2001). Adicionalmente, se ha probado que la activación de los receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGLUR) pueden estimular la síntesis de eCB (Kreitzer & Malenka, 2005; Maejima et al., 2001). Es importante decir que se sintetizan a partir de ácido araquidónico, un elemento constituyente de la membrana celular que como recordaremos es una bicapa lipídica. La ANA se produce de la hidrólisis de N-araquidonil-fosfatidiletanolamida catalizada por una fosfolipasa D. El 2-AG tiene dos vías de síntesis, una independiente de la acción de fosfolipasa C y posiblemente a través de la acción del diacilglicerol (DAG). La otra vía involucra directamente a la fosfolipasa C (Basavarajappa, 2007; Bisogno, 2008; Cadas et al., 1997; Devane & Axelrod, 1994; Di Marzo et

al., 1994; Nyilas et al., 2008; Mechoulam et al., 1998). La **figura 1.12** muestra una “sinapsis canabinérgica”, y los mecanismos de síntesis y degradación de los eCB.



TRENDS in Pharmacological Sciences

Fig 1.12 Sinapsis canabinérgica. Mecanismos de síntesis y degradación de los eCB. DAG, diacilglicerol; DAGL, diacilglicerol lipasa; EMT, transportador membranar de los eCB; FAAH, hidrolasa de los ácidos grasos amidados; MAGL, monoacilglicerol lipasa; NAPE-PLD, *N*-araquidonil-fosfatidiletanolamina; NAT, *N*-acil transferasa; PE, fosfatidil etanolamina; PLC, fosfolipasa C; PLD, fosfolipasa D. Di Marzo, 2006.

Los endocannabinoides fueron considerados únicamente como mensajeros retrógrados (**Figura 1.13**). Es decir, se sintetizan en la neurona postsináptica y tienen su acción en la neurona presináptica, aunque ahora se sabe que también ejercen efectos en la neurona postsináptica. Dependiendo del circuito neuronal, los endocannabinoides pueden activar o inhibir la

neurotransmisión activando a los receptores a cannabinoides (Felder et al., 1993). Se piensa que la despolarización de la membrana postsináptica, y la consecuente entrada de calcio, de las neuronas es clave para la síntesis y liberación de los endocannabinoides, los cuales difunden a la membrana presináptica en donde se unen al CB1, lo que causa una inhibición de las señales glutamatergicas o GABAérgicas, haciendo que se presenten fenómenos como los de la supresión de la inhibición inducida por la despolarización (DSI) o la supresión de la excitación inducida por la despolarización (DSE) (Diana & Bregestovski, 2005; Földy et al., 2006; Katona et al., 2006; Kreitzer & Regehr, 2001; Maejima et al., 2001; Máttyás et al., 2008; Ohno-Shosaku et al., 2001; Riegel & Lupica, 2004; Wilson & Nicoll, 2001).

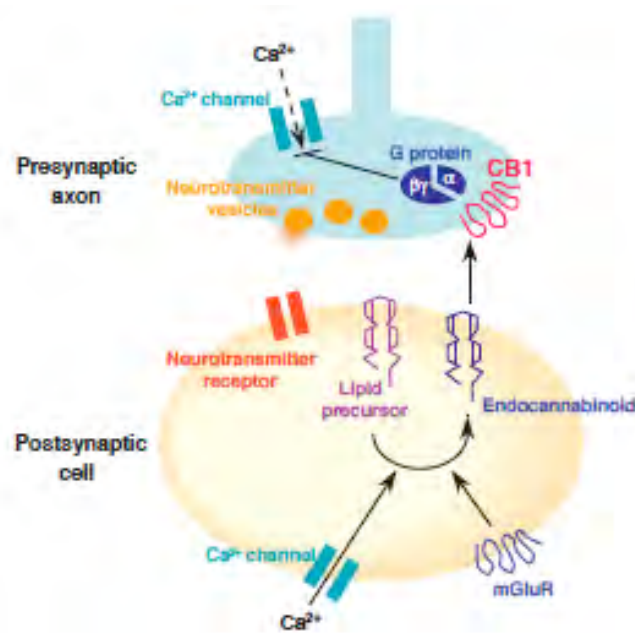


Fig 1.13 Los eCB se sintetizan en la postsinapsis ante la entrada de calcio o estimulación de receptores metabotrópicos; y actúan en la presinapsis modulando la liberación del neurotransmisor a través de la activación del CB1. Tomado de Wilson & Nicoll, 2002.

También se ha demostrado que los eCB pueden actuar intracelularmente modulando la actividad de algunos canales iónicos (Chemin et al., 2006; Hamson et al., 1998; Van der Stelt & Di Marzo, 2005). La vida media de los endocannabinoides en el espacio extracelular es limitado (algunos minutos) por un rápido proceso de eliminación que consiste de una recaptura

específica dentro de la célula a través de un mecanismo de transporte (aún por determinarse) (Beltramo et al., 1997; Fegley et al., 2004; Glaser et al., 2003, 2004; Hillard & Jarrahan, 2003; Kaczocha et al., 2004; Moore et al., 2005) y una subsiguiente degradación por la amida hidrolasa de los ácidos grasos (FAAH) que se encarga de eliminar a la ANA y a la OLE, aunque también puede reaccionar con el 2-AG (Bisogno, 2008; Di Marzo et al., 1994; Goparaju et al., 1998; Lichtman et al., 2002; McKinney & Cravatt, 2005). La principal enzima que degrada a este último es la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Bisogno, 2008; Dinh et al., 2002; Saario & Laitinen, 2007).

Aparte del CB1 y CB2 los eCB son capaces de actuar a través de otros sistema de neurotransmisión como el serotoninérgico (Boger et al., 1998; Huidobro-Toro & Harris, 1996; Xiong et al., 2008), el GABAérgico (Lees et al., 1998) o el sistema vaniloide (Di Marzo et al., 20008; Zygmunt et al., 1999).

El sistema canabinérgico se ha relacionado con diversas funciones del sistema nervioso central en las que destacan el control motor (Zimmer et al., 1999), los procesos de aprendizaje y memoria (Brenowitz & Regehr, 2005; Rueda-Orozco et al., 2008a y b), la neuroprotección (Marsicano et al., 2003; Monory et al., 2006), la analgesia (Agarwal et al., 2007; Meng et al., 1998; Zimmer et al., 1999), la regulación del stress (Di et al., 2003; Patel et al., 2005), el control de las respuestas emocionales (Lutz, 2009; Marsicano et al., 2002) y de los procesos de recompensa, principalmente aquellos relacionados con el alimento como veremos a continuación.

1.3.1 Regulación canabinérgica de la ingestión de alimento

En 1999 Williams y Kirkham mostraron por vez primera que la administración aguda de ANA de forma sistémica producía una marcada hiperfagia en ratas, mediada por la activación del CB1 (Williams & Kirkham, 1999). Resultados que fueron replicados por nuestro laboratorio, adicionando el efecto hiperfágico de la OLE (Martínez-González et al., 2004). Estos datos aunados a otros como que el Δ 9-THC produce un aumento en el consumo de alimento en humanos y en animales de laboratorio, y que diversos antagonistas canabinérgicos como el SR141716A (Rimonabant) y el AM251, provocan el efecto inverso es evidencia clara acerca de la potencial función de los endocannabinoides en la ingesta de alimento (Chambers et al., 2006, 2007; Gardner & Mallet, 2006; Hao et al., 2000; Hodge et al., 2008; Horwill et al., 2007; Jbilo et al., 2005; Ravinet-Trillou et al., 2002; Rowland et al., 2001; Sink et al., 2007; Verty et al., 2004; Wiley et al., 2005; Williams & Kirkham, 2002). Inclusive, en la actualidad, el rimonabant se apuntala como una de las drogas más efectivas contra la obesidad en los humanos (Després et al., 2005; Pagotto & Pasquali, 2005). Adicionalmente se ha demostrado que los ratones modificados genéticamente que no expresan el CB1 (CB1^{-/-}) presentan una reducción en su consumo de alimento diario así como una baja en el peso corporal (Cota et al., 2003; Di Marzo et al., 2001). Estos hechos no solo se pueden explicar por la acción de eCB a nivel central sino que, debido a su amplia distribución en todo el organismo, sus efectos periféricos son esenciales para la regulación de la conducta alimenticia. Sin embargo, me enfocaré en la participación del sistema canabinérgico a nivel central que es lo pertinente para el presente trabajo, pero a continuación enlisto una serie de excelentes

trabajos relacionados con la función periférica del sistema canabinérgico en la regulación de la ingestión de alimento y del metabolismo energético: Caspasso & Izzo, 2008; Cota et al., 2003; Di Marzo et al., 2008; Engeli et al., 2005; Gómez et al., 2002; Juan-Picó et al., 2005; Kunos, 2007; Matias et al., 2006, 2008; Osei-Hyiaman et al., 2005, 2008.

El hipotálamo es la estructura en el sistema nervioso central clásicamente relacionada con la ingesta de alimento; como vimos anteriormente, en esta estructura convergen señales orexigénicas como el NPY, MCH, ORX, grelina, entre otras; y de saciedad como leptina, CART, alpha-MSH o la CRH; a la vez que el sistema canabinérgico ha sido descrito en esta misma región (Wittmann et al., 2007), manteniendo una estrecha relación con los péptidos hipotalámicos. El ARNm del CB1 ha sido detectado en el hipotálamo co-expresándose con neuropéptidos como el CART, MCH y la preproorexina (Cota et al., 2003, **ver figura 1.14**).

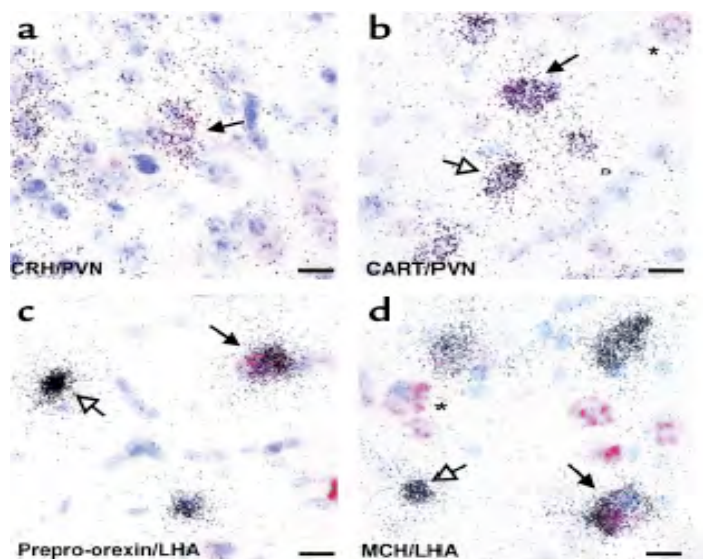


Fig 1.14 Co-localización del ARNm para el CB1 con péptidos hipotalámicos. Los puntos negros indican la expresión del CB1. Las flechas señalan la co-localización. CART, transcrito regulado por cocaína y anfetamina; CRH, hormona liberadora de corticotropina; MCH, hormona concentradora de melanina; LHA, hipotálamo lateral; PVN, núcleo paraventricular. Tomado de Cota et al., 2003.

En los ratones $CB1^{-/-}$ se observó un incremento significativo en los niveles del ARNm de CRH en el PVN, y una marcada reducción en el mensajero de CART en el HL, comparados con la cepa silvestre (Cota et al.,

2003). Con relación a este efecto, se ha descrito que los eCB inhiben las entradas excitadoras al PVN, inhibiendo probablemente a las células productoras de CRH o de TRH (Deli et al., 2009; Di et al., 2009; Malcher-López et al., 2006). Osei-Hyiaman demostró que la disminución de la ingesta de alimento producida por el rimonabant no se presenta en los ratones que no expresan CART y que los animales nulos a la FAAH tienen niveles bajos de este péptido en áreas hipotalámicas y en el NAc (Osei-Hyiaman et al., 2005). Otras señales de saciedad pueden ser afectadas por la transmisión canabinérgica, en particular las de la POMC- α MSH y leptina. Existen datos que indican que los eCB pueden inhibir a las células del ARC positivas a POMC (Ho et al., 2007), aunque hay otros que indican lo contrario, que los eCB regulan a la baja las entradas GABAérgicas en este tipo celular (Hentges, 2007; Hentges et al., 2005). Di Marzo y colaboradores, en el 2001, se dieron a la tarea de estudiar la interacción entre el sistema canabinérgico y leptina. Encontraron un aumento en los niveles hipotalámicos de ANA y 2-AG en los ratones que no expresan los genes que codifican para leptina y su receptor (*ob/ob* y *db/db*, respectivamente). Además, observaron que la administración de leptina disminuye las concentraciones hipotalámicas de estos dos eCB (Di Marzo et al., 2001). Otros estudios han determinado que la relación eCB-leptina para el control de la ingestión de alimento puede presentarse en el HL (Jo et al., 2005) y en el PVN (Malcher-López et al., 2006). O incluso en el VMH, en donde la infusión de ANA incrementa el consumo de alimento (Jamshidi & Taylor, 2001) y donde la expresión del CB1 puede ser afectada por moléculas encargadas de la regulación de la homeostasis energética (Kim et al., 2008). Pero no sólo los eCB afectan la ingestión de alimento regulando a la baja las señales de

saciedad, sino que influyen de gran manera en el actividad de los circuitos hipotalámicos orexigénicos. Principalmente, los eCB desinhiben a las neuronas del HL (Jo et al., 2005) que producen MCH (Huang et al., 2007) pero parece inhibir a las neuronas orexinérgicas (Huang et al., 2007). En todo caso, la función de los eCB en esta área esta por demostrarse. En el PVN convergen señales anorexigénicas y orexigénicas como el NPY o la ghrelina. El efecto hiperfágico de esta última hormona depende de la señalización canabinérgica en el PVN y de señales intracelulares como la AMPK, como lo demostró Tucci y Kola (Kola et al., 2005, 2008; Tucci et al., 2004). Esto coincide con el estudio que muestra que la administración de THC directamente en este núcleo hipotalámico incrementa el consumo de alimento (Verte et al., 2005). Se puede inferir entonces que la ghrelina estimula la liberación de eCB en el PVN, y estos a su vez inhiben las entradas excitadoras a este núcleo. Este efecto también puede presentarse por el aumento en la liberación de NPY inducido por los cannabinoides (Lamber et al., 2005). Es decir, al ser el NPY un péptido inhibidor de la actividad celular, puede bloquear las señales de saciedad en el PVN.

Los cambios energéticos también pueden modificar la expresión del sistema canabinérgico en el hipotálamo. Se ha observado en ratas restringidas de alimento, estado donde las señales de saciedad se encuentran a la baja, un aumento en las concentraciones de 2AG pero no de ANA en el hipotálamo, lo que sugiere un efecto diferencial de ambos endocannabinoides y una posible interacción con señales de saciedad (Kirkham et al., 2002). Sin embargo, no se han observado cambios en la densidad del CB1 en el hipotálamo de ratas sometidas a una dieta hipercalórica (paladable), lo que sí ocurre en áreas

extrahipotalámicas involucradas en los procesos de motivación/recompensa, como el núcleo accumbens (Harrold et al., 2002, **ver figura 1.15**). Esto sugiere que el sistema canabinérgico puede modular diferentes aspectos de la conducta alimenticia actuando en diversas áreas del sistema nervioso central. A continuación veremos brevemente las evidencias existentes sobre la relación del sistema canabinérgico y el sistema de la recompensa.

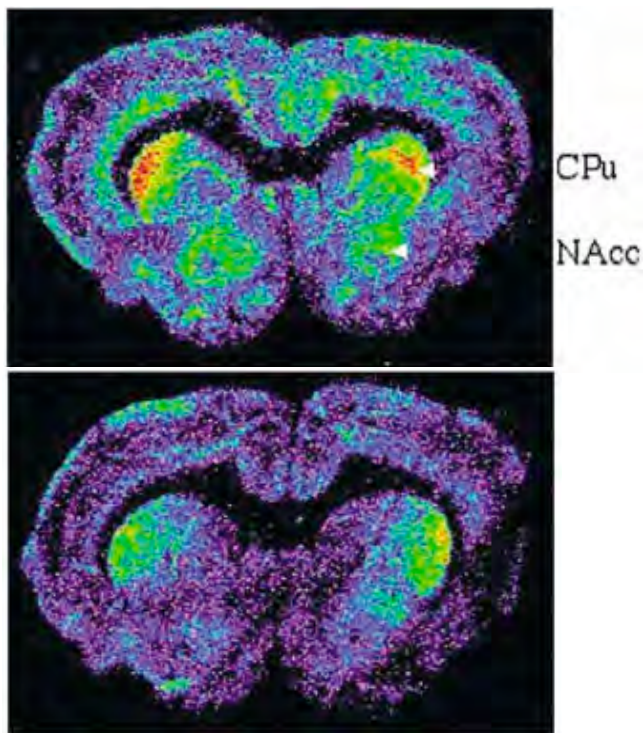


Fig 1.15 Cortes coronales al nivel del NAc de cerebros de ratas que fueron sometidas a una dieta balanceada (arriba) y aquellas a las que se les dio una dieta hipercalórica. Lo que se observa es una regulación a la baja (colores mas oscuros) de los niveles del CB1 en el NAc y en la corteza frontal, usando la técnica de binding. La flecha blanca superior indica el estriado dorsal y la flecha inferior muestra el estriado ventral (NAc) **Harrold et al., 2002.**

1.3.2 El sistema canabinérgico en el núcleo accumbens

Como se mencionó anteriormente, el sistema canabinérgico se expresa en el núcleo accumbens (Lupica et al., 2004; Martín et al., 2008; Mátyás et al., 2007; Pickel et al., 2004; Robbe et al., 2001), modulando su actividad electroquímica (Cheer et al., 2006; Robbe et al., 2003; Szabo et al., 1999, **ver figura 1.16**). Se ha demostrado que los canabinoides aumentan la liberación de DA (French et al., 1997; Solinas et al., 2006; Tanda et al., 1997) e inhiben la transmisión glutamatérgica y GABAérgica en el NAc (Manzoni & Bockaert, 2001; Narushima et al., 2006a, b; Robbe et al., 2001). Modulando estos tres sistemas de neurotransmisión, el sistema canabinérgico participa en la generación de fenómenos plásticos en el NAc como la LTD para la cuál este sistema se considera imprescindible (Gerdeman et al., 2002; Kreitzer & Malenka, 2005; Robbe et al., 2002, 2003). Se ha propuesto que la LTD pueda ser esencial en el desarrollo de las adicciones (Gerdeman et al., 2003), involucrando de manera directa a los eCB en esta enfermedad (De Vries & Schoffelmeer, 2005; Sipe et al., 2002).

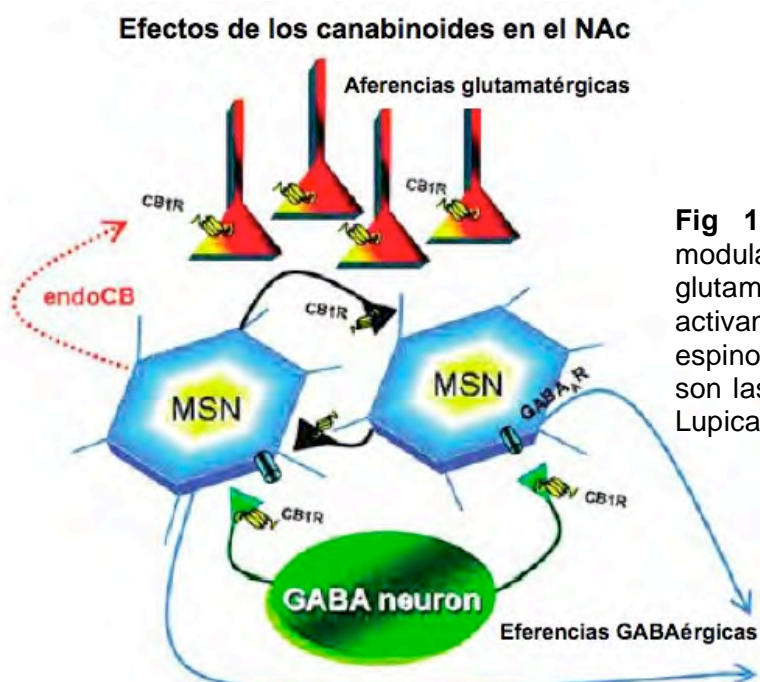


Fig 1.16 Los eCB en el NAc modulan la transmisión glutamatérgica y la GABAérgica activando a los CB1. MSN, células espinosas de mediano tamaño, que son las células principales del NAc Lupica et al., 2004.

En este sentido, un elegante trabajo realizado por el grupo de Loren Parsons, demuestra por vez primera que dos drogas de abuso, el etanol y la heroína, provocan un aumento en las concentraciones de ANA y 2-AG en el NAc (Caillé et al., 2007). Otros han probado que el antagonismo canabinérgico en el NAc parece bloquear las propiedades reforzantes de las drogas de abuso, así como la recaída a la adicción (Alvarez-Jaimes et al., 2007; Azizi et al., 2008; Caillé et al., 2007; De Vries et al., 2001; Shoaib, 2008; Thieman et al., 2008; Wang et al., 2002; Xi et al., 2006), probablemente a través de la inhibición de la liberación de DA inducida por las drogas (Cheer et al., 2007). Un dato esencial que apoya esto es que los propios cannabinoides pueden ser reforzantes. Es decir, que los animales trabajan para autoadministrarse estas drogas directamente en el NAc o en el AVT (Zangen et al., 2006).

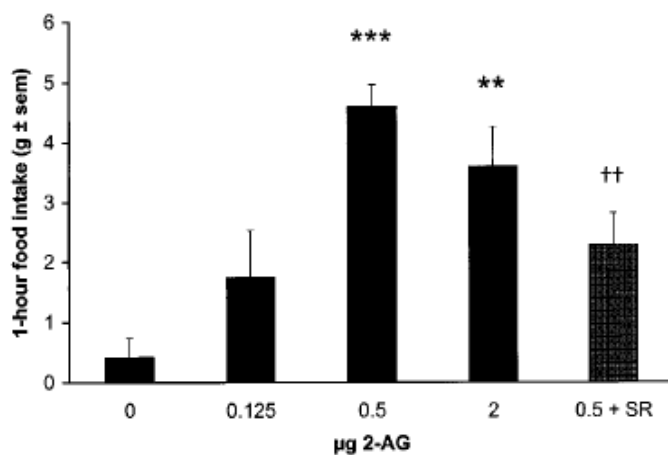
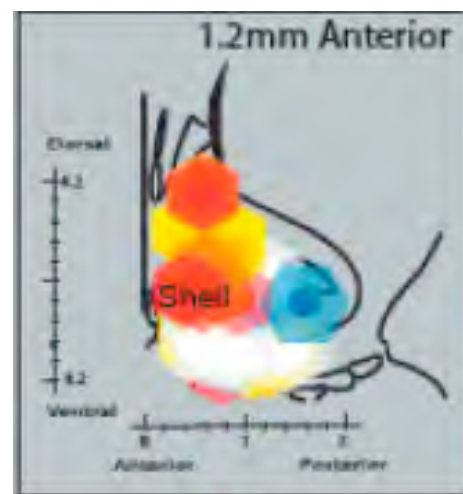


Fig 1.17 La infusión intra-NAcS del 2-AG estimula la ingestión de alimento en ratas (arriba). La ANA en el NAcS incrementa el impacto hedónico de un alimento paladeable. En el panel de la derecha se muestran los sitios del NAcS en donde el eCB produce esto. Colores cálidos muestran el mayor efecto y los colores fríos indican una disminución del efecto. Tomado de Kirkham et al., 2002; Smith et al., 2008.



Endocannabinoid
Hotspot

Con referencia a los reforzadores naturales, específicamente el alimento, se han llevado a cabo análisis conductuales detallados indicando que los eCB pueden modular el “wanting” y el “liking” (en el modelo de Berridge y Robinson). Los agonistas y antagonistas cannabinérgicos incrementan o reducen, respectivamente, la cantidad de trabajo que un animal hace para obtener alimento, así como la cantidad ingerida (Abraham et al., 2005; Duarte et al., 2004; Escartín-Pérez et al., 2009; Gallate & McGregor, 1999; Gessa et al., 2006; Minet et al., 2008). Al igual que con las drogas de abuso, el rimonabant bloquea la liberación de DA inducida por un alimento paladable (Melis et al., 2007). Adicionalmente, los ratones CB1-/- exhiben bajos niveles de respuesta ante los estímulos alimenticios “dulces” comparados con los ratones de la cepa silvestre (Sanchis-Segura et al., 2004). Sugiriendo que uno de los sitios de acción de los eCB para modular la ingestión de alimento es el NAc. Sin embargo, sólo existe un par de estudios en la literatura que apuntalan esto. Kirkham y colaboradores, demuestran por primera vez que el 2-AG estimula la ingestión de alimento mediado por el CB1 cuando se administra directamente al NAcS (Kirkham et al., 2002). En este mismo estudio encuentran que la restricción de alimento produce un incremento en los niveles de ANA y 2-AG en el cerebro límbico anterior (un área que contiene al NAc) (Kirkham et al., 2002). Por otro lado, y publicado en manera paralela al presente trabajo, el grupo de Kent Berridge observó que la infusión de ANA en el NAcS aumenta el impacto hedónico de una solución de sucrosa, es decir, afecta el proceso del “liking” (Mahler et al., 2007). **Ver figura 1.17.** De manera similar a lo que pasa con el THC (Higgs et al., 2003), los eCB parecen incrementar la ingesta de alimento, al menos en parte, incrementando la

paladeabilidad de los alimentos. Compartiendo, de esta manera, con el sistema opioidérgico la responsabilidad de generar la sensación de placer. De hecho ha sido demostrada una relación funcional de estos dos sistemas en la regulación de la sensación subjetiva de recompensa (Kirkham & Williams, 2001). Pero, como es claro, se necesita de un mayor esfuerzo para entender cómo es que el sistema canabinérgico regula la ingestión de alimento a través del sistema de motivación-recompensa.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ingestión de alimento esta ampliamente regulada por sistemas homeostáticos y motivacionales-hedónicos, en donde destacan en su regulación estructuras como el hipotálamo y el núcleo accumbens, respectivamente. Sin embargo, existen muy pocos estudios donde se trate de establecer una relación anatomo-funcional entre estas dos estructuras que resulte en la modulación de la ingestión de alimento. Como se ha mencionado, esta regulación puede ser mediada por diversas moléculas que se expresan en estas áreas, desde neuropéptidos, hormonas y prácticamente todos los neurotransmisores. Inclusive, en los últimos años, se ha destacado la participación del sistema canabinérgico como uno de los moduladores más importantes de la conducta alimenticia, ya que su amplia distribución en el organismo sugiere (y se ha demostrado) que puede intervenir en las dos facetas de esta conducta esencial para la supervivencia. Siendo la regulación canabinérgica “homeostática” de la ingestión de alimento la más estudiada. Por esta razón, decidimos investigar la función del sistema canabinérgico en el núcleo accumbens (regulación hedónica) sobre la modulación de la conducta alimenticia, y si dicha modulación afecta la actividad hipotalámica (regulación homeostática).

HIPÓTESIS GENERAL

El sistema canabinérgico en el núcleo accumbens shell regula la ingestión de alimento y produce una activación hipotalámica.

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- 1. La activación de los receptores CB1 en el núcleo accumbens shell, con anandamida y oleamida, produce un aumento en el consumo de alimento.
1.1 La activación de los receptores 5HT2 en el núcleo accumbens shell con oleamida reduce la ingestión de alimento.
- 2. La anandamida y la oleamida en el núcleo accumbens shell producen una activación de los núcleos hipotalámicos reguladores de la ingestión de alimento.
- 3. La inhibición de la inactivación de anandamida y la oleamida en el núcleo accumbens shell produce un aumento en la ingestión de alimento y una activación hipotalámica.
- 4. La hiperfagia inducida por la privación de alimento es mediada por los receptores CB1 en el núcleo accumbens shell.

OBJETIVOS

Determinar si:

1.1 la administración de anandamida y la oleamida en el núcleo accumbens shell estimula la ingestión de alimento.

1.2 el bloqueo de los receptores CB1 en esta misma estructura previene los efectos inducidos por estos tratamientos.

1.3 el bloqueo de los receptores serotoninérgicos 5HT2 previene el efecto inducido por oleamida.

2.1 la administración de anandamida y la oleamida en el núcleo accumbens shell produce una activación (medida por la expresión de c-Fos, un marcador de actividad celular) del hipotálamo lateral, núcleo arcuato, núcleo dorsomedial hipotalámico y núcleo paraventricular hipotalámico.

2.2 el bloqueo de los receptores CB1 en el núcleo accumbens shell previene los efectos inducidos por estos tratamientos.

3.1 la administración del AA5HT (inhibidor de la degradación de los cannabinoides endógenos) y del OMDM-1 (inhibidor de la recaptura de anandamida) en el núcleo accumbens shell aumenta la ingestión de alimento y la actividad hipotalámica.

3.2 el bloqueo de los receptores CB1 en el núcleo accumbens shell previene los efectos inducidos por estos tratamientos.

4.1 la administración del antagonista al CB1 en el núcleo accumbens shell bloquea la hiperfagia inducida por la privación de alimento.

4.2 esta condición modifica los niveles del ARNm para el receptor CB1 en el núcleo accumbens y en el hipotálamo.

3. MÉTODO

3.1 Sujetos

Se utilizaron un total de 472 ratas macho de las cepas Wistar y Lister-Hooded, entre 250 y 300 gramos de peso, para todos los experimentos. Las ratas permanecieron alojadas en jaulas individuales en un bioterio con temperatura constante y controlada (23° C) y un ciclo invertido de luz-oscuridad 12-12. Las luces se encienden a las 20:00. Todos los experimentos se realizaron en las primeras cuatro horas de la fase de oscuridad, de 8:00 am a 12:00 pm.

3.2 Aparatos

Para la conducta:

- Sistema de circuito cerrado para la observación conductual
- Bomba de micro-administración (KD-Scientific modelo 200)
- Jeringas Hamilton 10 µl.
- Bascula OHAUS CS-200 con capacidad de 200gx0.1g.

Para la biología molecular:

- Vortex (Diagger, VortexGenie 2)
- Balanza analítica (OHAUS AS200)
- Olympus PHmetro (Corning-Pinnacle 530PHmeter)
- Agitador (Barnsted/Thermoline mod. S-130815)
- Agitador (Hoeter Pharmacia Biotech, mod. PR70-115V)
- Bomba de perfusión (Portable Master Flex, L/S Sampling Pump, Cole-Parmer Instrument Company)
- Criostato (Leica mod. cm 1510-3).

- Horno de hibridación (Thermolyne, mod. 17600)
- Ultracentrifuga (Sorvall, mod. Super T21)
- Microscopio (BX41)
- Cámara para microscopio (Evolution VF color, MediaCybernetics)

Software

- Image-Pro Plus (MediaCybernetics)
- SigmaStat

3.3 Fármacos

- Araquidoniletanolamida, Anandamida (Sigma-Aldrich inc.). Agonista de los receptores a cannabinoides 1 y 2 (CB1 y CB2), agonista de los receptores vaniloides (TRPV1). Dosis utilizadas: 0.1, 1.0, 10 µg.
- Cis-9,10-octadecenoamida, Oleamida (Sigma-Aldrich). Agonista del CB1. Agonista de los receptores serotoninérgicos 5HT2A y 5HT2C. Dosis utilizadas: 0.1, 1.0, 10 µg.
- 1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N1-piperidinil-1H-pirazol-3-carboxamida, AM251 (Cayman Chemical inc.). Antagonista selectivo del CB1. Dosis utilizadas: 1.6, 4.8, 9.6 µg.
- 5-(4-bromofenil)-1-(2, 4-diclorofenil)-4-etil-N-(1-piperidinil)-1H-pirazol-3-carboxamida. SR147778, Surinabant (Sigma-Aldrich). Antagonista selectivo del CB1. Dosis utilizadas: 1.6 µg.
- AA5HT. Inhibidor de la degradación de los endocannabinoides (amablemente donado por el Dr. Vincenzo Di Marzo. Director del Endocannabinoid Research Group, Nápoles, Italia). Dosis utilizadas: 1.0 µg.

- OMDM-1 (También donado por el Dr. Vincenzo Di Marzo). Inhibidor de la recaptura de anandamida. Dosis utilizadas: 1.0 µg.
- Naloxona hidroclicorada (Tocris Bioscience). Antagonista de los receptores opioidérgicos. Presenta mayor afinidad por los receptores µ. Dosis utilizadas: 2.0 µg.
- Ketanserina (Tocris Bioscience). Antagonista de los receptores 5HT_{2A/2C}. Dosis utilizadas: 1.0, 2.0, 4.0 µg.
- SB 242084 (Tocris Bioscience). Antagonista selectivo de los receptores 5HT_{2C}. Dosis utilizadas: 0.1, 0.5, 1.5 µg.
- Todos los fármacos fueron diluidos en un vehículo (VEH) compuesto por dimetil sulfoxido (DMSO) al 30%, Tween 80 al 0.2% en PBS.

3.4 Anticuerpos y Oligonucleotidos

- Anticuerpo contra c-Fos (Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpo contra el receptor CB1 (Chemicon, Millipore).
- Anticuerpo contra el receptor 5HT_{2c} (Santa Cruz Biotechnology)
- Oligonucleotidos complementarios para las bases 4-51, 349-396, y 952-999 del receptor CB1 (Sigma-Aldrich, México).

3.5 Procedimientos generales

3.5.1 Cirugía

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de: Ketamina 66 mg/Kg, Xilazina 0.26 mg/Kg y acepromazina 1.3 mg/Kg. Posteriormente, fueron implantadas estereotáxicamente con cánulas de acero inoxidable (23G) en los núcleos cerebrales de interés. Las coordenadas para el NAcS fueron: AP +2.0, L \pm 1.0, DV -6.0. Para el HL: AP -2.56, L \pm 2.0, DV -7.0. Para el PVN: AP -1.80, L \pm 0.4, DV -7.0.

3.5.2 Infusiones

Las administraciones se realizaron al inicio de la fase de oscuridad (9:00 am) mientras se restringía manualmente de movimiento temporalmente al animal. Todos los animales fueron habituados a éste procedimiento dos días antes del comienzo de los experimentos, para disminuir el estrés que pudiera ocasionarles. Para las infusiones, se usó un inyector (30G) que sobresalía 1mm mas allá de la cánula guía. Todos los fármacos fueron administrados en un volumen de 1.0 μ l por lado (0.2 μ l/min). Al finalizar los cinco minutos, los inyectores se dejaban por un 1 minuto extra para evitar un potencial reflujo y después ser retirados.

3.5.3 Perfusión

Al finalizar los experimentos, las ratas fueron perfundidas transcárdialmente con paraformaldehído (PFA) al 4% y PBS 0.2 M, y los cerebros extraídos para el posterior análisis histológico de la posición de las

cánulas mediante la técnica de violeta de cresilo. La **figura 3.1** muestra los sitios de implantación en el NAcS. Los animales que estuvieron mal implantados fueron descartados del análisis estadístico.

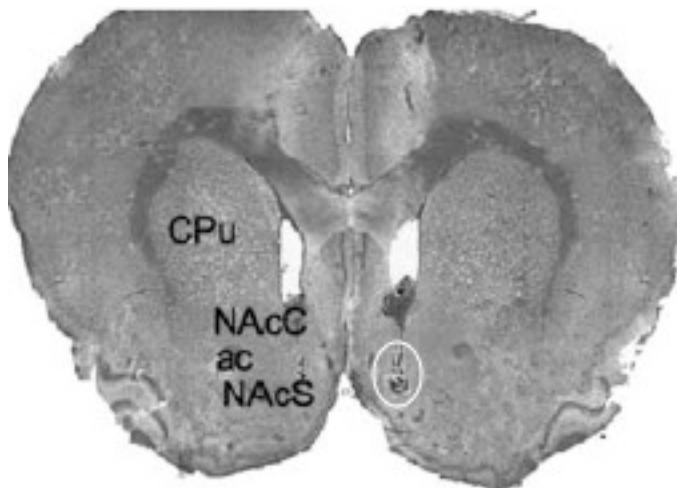


Fig 3.1 Fotomicrografía representativa de los sitios de inyección (ovalo blanco) en el NAcS. ac, comisura anterior; CPu, caudado-putamen; NAcC, núcleo accumbens core; NAcS, núcleo accumbens shell.

3.5.4 Evaluación de la ingestión de alimento

Inmediatamente después de la administración de los fármacos, se les dejó a las ratas una cantidad pesada de alimento, siempre alrededor de 50 g. Estimamos la cantidad de alimento ingerido por el animal calculando la diferencia entre el peso original del alimento y el peso del alimento que quedaba. Dicho cálculo se corregía cuando se encontraban restos de alimento en la caja. Las mediciones se hicieron durante 4 horas, midiendo cada hora. Algunos animales fueron sometidos a una privación de alimento durante 24 horas comenzando en la fase de oscuridad. Al término de este periodo se realizó el mismo protocolo de evaluación del consumo de alimento mencionado arriba. En la **Figura 3.2 A** se esquematizan los tiempos del procedimiento.

3.5.5 Evaluación conductual de la ingestión de alimento

Para este procedimiento se usó un diseño de contrabalanceo (cuadrado latino) es decir, todas las ratas recibieron todos los tratamientos espaciados por dos días, para permitir el metabolismo del fármaco en cuestión. Al término de las infusiones, se colocaron a las ratas en tanques de observación durante 30 minutos con una cantidad pesada de comida (**Figura 3.2 D**). En dicho lapso, los animales fueron videograbados para su posterior análisis conductual. Las siguientes conductas fueron evaluadas: alimentación (la rata come activamente), locomoción (horizontal y vertical), acicalamiento, inactividad (la rata no mueve ninguna de sus cuatro extremidades) y el rascado.

3.5.6 Inmunohistoquímica para c-Fos

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico y perfundidas noventa minutos posteriores a cada administración (**Figura 3.2 B**). Se extrajeron los cerebros y se dejaron 24h en PFA, después en sacarosa al 18% y finalmente al 30%, todo esto a 4°C. Después los cerebros fueron seccionados en cortes coronales (50 μm) al nivel del hipotálamo con la ayuda de un criostato. Para cada corte que se tomó para la inmunohistoquímica contra c-Fos, otro inmediatamente adyacente fue colectado para la tinción de Nissl. Esto permite determinar con mayor confianza los límites de los núcleos hipotalámicos de interés.

Los cortes fueron incubados a temperatura ambiente con 0.075% de H_2O_2 en PBS durante 20 min para bloquear la peroxidasa endógena. Posteriormente los cortes fueron bloqueados en 5% de suero normal de cabra

en PBS con 0.3% de Triton X-100 (TPBS). Después se incubaron durante 24 h a 4°C con el anticuerpo contra c-Fos (1:2000), desarrollado en conejo. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con TPBS (10 min por lavado), y se les dejó en el anticuerpo secundario biotinilado (1:200) durante 1 h. Nuevamente se hicieron tres lavados y después los cortes se dejaron en el complejo AB (avidina-biotina) por 1 h más. Al término de este tiempo, los últimos tres lavados fueron hechos y la inmunohistoquímica fue revelada con la reacción de diaminobencidina-peroxidasa. Para detener la reacción los cortes fueron sumergidos en PBS. Todo este procedimiento se realizó mientras el tejido estaba agitándose levemente.

Los cortes fueron observados con un microscopio (Olympus BX41) y se capturaron imágenes de las áreas de interés con una cámara digital de 12-bits a una magnificación de 4x para una resolución panorámica y de 10x para el conteo del c-Fos. Las imágenes se visualizaron en una pantalla de computadora usando el software Image-Pro Plus, que nos permitió detectar y marcar la inmunoreactividad a c-Fos (F-ir) en células individuales. El conteo de la F-ir se obtuvo de manera bilateral en dos secciones cerebrales de cada región para el análisis subsiguiente. Las células fueron contadas en el área nuclear determinada por la sección de Nissl correspondiente.

3.5.7 Cuantificación de ANA y 2-AG

Noventa minutos después de los tratamientos, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y se extrajeron rápidamente sus cerebros. El NAc y el hipotálamo fueron obtenidos por disección regional en hielo e inmediatamente congelados con hielo seco. El tejido fue almacenado a -80°C

hasta que fuera usado. El proceso subsiguiente fue realizado en el laboratorio del Dr. Vincenzo Di Marzo y puede ser consultado en el **Anexo 2**.

3.5.8 Doble inmunofluorescencia

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico y perfundidas inmediatamente. Se extrajeron los cerebros y se dejaron 24h en PFA, después en sacarosa al 18% y finalmente al 30%, todo esto a 4°C. Después los cerebros fueron seccionados en cortes coronales (30 µm) al nivel del núcleo accumbens con la ayuda de un criostato. Los cortes se incubaron por 1h en 10% de suero normal de burro (SNB); preparado en PB 0.1M pH 7.4 con 0.3% de Triton X-100 y 0.05% de azida de sodio (AS). A continuación, se incubaron durante 48 horas a 4°C en una mezcla de los anticuerpos (Anti-5HT_{2c} y anti-CB1) diluidos 1:200 en SNB. Después de este periodo todo el procedimiento se realizó en un cuarto con luz roja. Se realizan tres lavados (10 min c/u) con PB 0.1M para que posteriormente el tejido se deje incubando por **4h** en una mezcla de dos anticuerpos secundarios acoplados a distintos fluoróforos, el primero a fluoresceína (coloración verde) y el segundo a rodamina (coloración roja) (FITC-conjugated donkey anti-rabbit IgGs” y “TRITC-conjugated donkey anti-goat IgGs) diluido 1:100 en SNB. Finalmente, se realizan tres lavados en PB 0.1M (10 min c/u) y los cortes se colocan en laminillas gelatinizadas y se cubren con ayuda de un medio de montaje con DAPI, un fluoróforo (coloración azul) que marca exclusivamente núcleos celulares. Los cortes fueron observados con un microscopio (Olympus BX41) y se capturaron imágenes de las áreas de interés con una cámara digital de 12-bits a una magnificación de

10x. Las imágenes se visualizaron en una pantalla de computadora usando el software Image-Pro Plus.

3.5.9 Hibridación *in situ*

Las ratas fueron perfundidas y se extrajeron los cerebros para ser procesados primero por PFA, y luego sacarosa al 18% y al 30%. Los cerebros fueron seccionados a 15 μm con la ayuda de un criostato, y las cortes inmediatamente colectados en los portaobjetos para almacenarse a -70°C con desecante hasta el inicio de la hibridación. Se tomaron cuatro secciones a nivel hipotalámico y del núcleo accumbens, las principales áreas de interés del presente trabajo.

Antes de iniciar ya con el protocolo de la hibridación, los cortes se tienen que descongelar y lavar con PBS, solución tratada de trietanolamina con anhídrido acético y se deshidratan pasándolos por diversas concentraciones de alcohol (70, 80, 95 y 100%), después en cloroformo y finalmente en alcohol al 100 y al 95%. Se deja secar el tejido a temperatura ambiente.

Se mezclaron los tres oligonucleotidos complementarios para las bases 4-51, 349-396, y 952-999 del receptor CB1 como en el procedimiento de Burdyga et al., 2004, y se realizó el marcaje radiactivo de la mezcla y su subsiguiente purificación para evitar el pegado inespecífico de la radioactividad. La marca purificada se disuelve en un buffer de incubación. Alrededor de 100 μl de esta solución se expanden sobre cada laminilla y se cubren con parafilm. Las laminillas se dejan incubando en una cámara húmeda dentro de un horno de hibridación a 42°C de 15 a 18 horas. Al finalizar este lapso, se retira el parafilm y se lavan 5 veces en un buffer, los primeros 3 a 60°C , 20 min c/u, y

los dos restantes a temperatura ambiente, 1h c/u. Después se deshidratan con alcohol al 70 y al 95%, dejándose secar a temperatura ambiente.

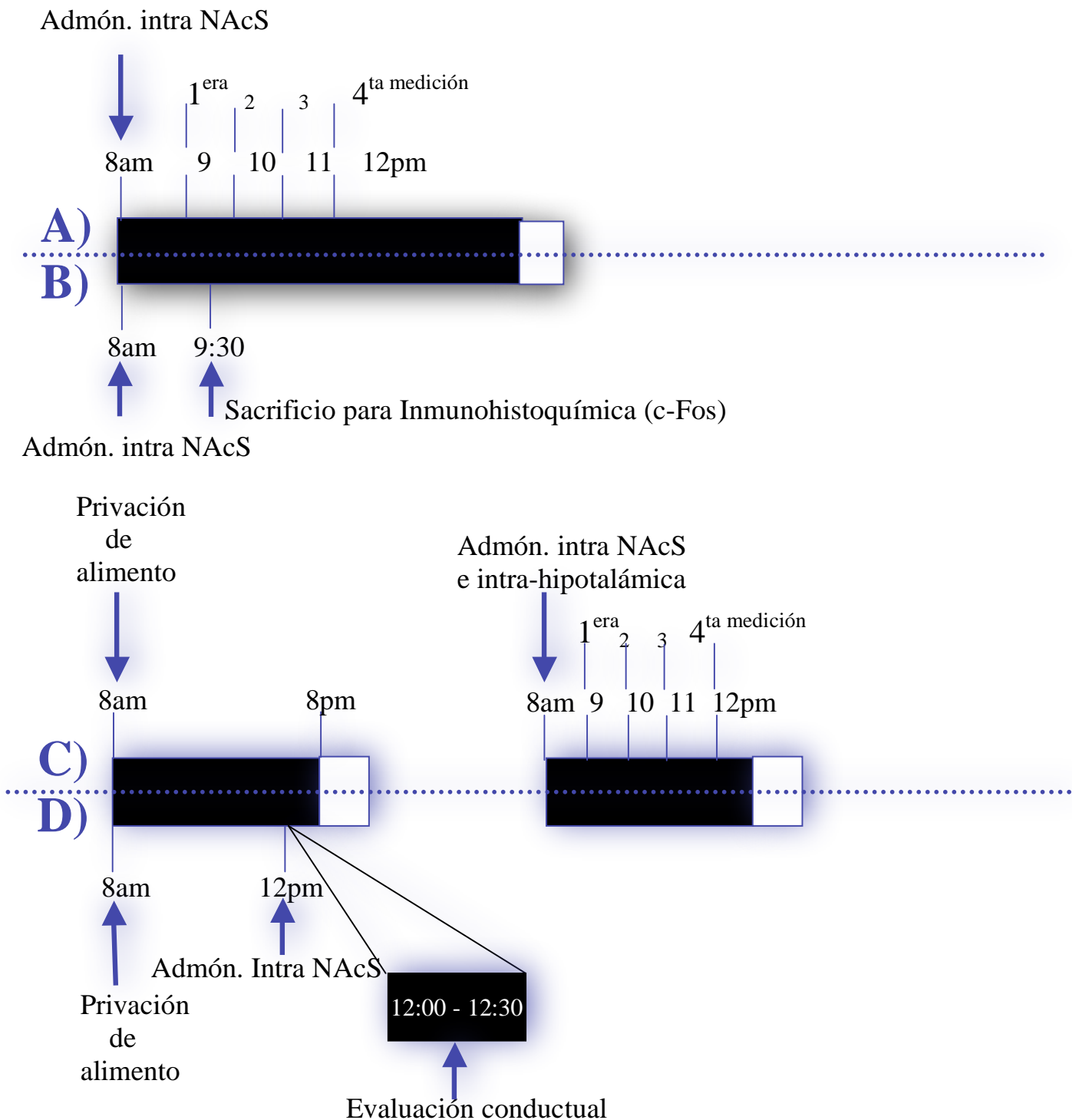
Para el revelado se utiliza papel fotográfico Kodak BIOMAX MR-1 de 8 X 10". Este procedimiento se realiza siempre en un cuarto oscuro con la ayuda de una luz roja Kodak GBX-2 con un foco de 7.5 o 15 watts. Las laminillas se pegaron dentro de un fólter de cartoncillo y este a su vez se colocó en un cassette de revelado. Al lado de las laminillas se colocan marcadores de radioactividad Amersham. Se acomodó una hoja de BIOMAX dentro del fólter y se cierra el cassette, dejándolo así durante 3 semanas a 4°C. Después de la incubación se abrió el cassette y se extrajo el papel BIOMAX en el cuarto oscuro y se sumerge en el revelador Kodak GBX por 5 min a 20°C, sin agitar; después se enjuaga con agua corriente por 30 s y se pasa al fijador Kodak GBX por 5 o 10 min, agitando levemente. Al sacar la placa del fijador se enjuaga con agua de 5 a 10 min. Y finalmente se deja secando colgada.

Posteriormente, la placa revelada se coloca en un transiluminador para poder adquirir la imagen con ayuda de una cámara digital acoplada a una computadora. Las imágenes fueron analizadas con el programa Image-Pro Plus. Primero, se tomó el valor de intensidad relativa del fondo de la imagen, es decir, en donde no hubiera tejido, para después hacer una diferencia con los valores de intensidad de las áreas cerebrales de interés, que en este caso fueron el hipotálamo y el núcleo accumbens. La HIS se realizó en el laboratorio del Dr. Raúl Aguilar Roblero en el Instituto de Fisiología Celular.

3.5.10 Análisis estadístico

Para todos los experimentos se uso una ANOVA de una vía seguida por una prueba *post hoc* de Bonferroni. Salvo en el apartado 4.7 en donde se uso una prueba T de Student para cada estructura cerebral analizada.

Figura 3.2



3.6 Procedimientos experimentales

3.6.1 Administración intra-NAcS de ANA y OLE: Evaluación de la ingestión de alimento. El número de sujetos experimentales para cada grupo fue de 10 (N=10). Para abordar el **objetivo 1.1**, y determinar si los agonistas cannabinérgicos en el NAcS producían un efecto hiperfágico, en este experimento administramos de manera independiente tres diferentes dosis de ANA y de OLE en el NAcS. Los grupos fueron 1) ANA 0.1 µg; 2) ANA 1.0 µg; 3) ANA 10.0 µg; 4) OLE 0.1 µg; 5) OLE 1.0 µg; 6) OLE 10.0 µg; y 7) VEH, 30% DMSO, 69.8 % PBS, 0.2 % Tween 80. Inmediatamente después de la administración se realizó la cuantificación de la ingestión de alimento (apartado **3.5.4**). Para determinar si el efecto conductual de las dosis mas potentes de ANA y OLE era dependiente de la activación del CB1 (**objetivo 1.2**), se preparó un “cóctel” mezclando dichas dosis (independientemente) con el AM251 a una dosis equimolar a la dosis de ANA 1.0 µg, que en este caso fue de 1.6 µg (por lado). Los grupos fueron los siguientes: 8) AM251 1.6 µg; 9) ANA 1.0 µg + AM251 1.6 µg; 10) OLE 1.0 µg + AM251 1.6 µg.

Como se detallará en los resultados, encontramos que el tratamiento OLE 1.0 µg + AM251 1.6 µg produjo una reducción en la ingestión de alimento. Dado que este eCB puede afectar otros sistemas de neurotransmisión, específicamente el serotoninérgico, propusimos que el efecto anorexigénico de la OLE es mediado por una activación de los receptores serotoninérgicos 5HT_{2A} y 5HT_{2C}, este último el principal responsable de la inhibición de la ingestión de alimento inducida por la serotonina y probablemente afectando al sistema de la recompensa (Gerogetti & Tecota, 2004; McMahon et al., 2001;

Trifunovic & Reilly, 2006; Yan, 2000). Para demostrar esta interacción (**objetivo 1.3**), se utilizaron dos antagonistas serotoninérgicos, la Ketanserina (KTS) y el SB 242084 (SB), administrados solos o en combinación con el AM251 u/y OLE. El primero bloquea a los 5HT_{2A} y a los 5HT_{2C}, aunque tiene mayor afinidad por los 5HT_{2A}; el segundo bloquea específicamente a los 5HT_{2C}. Se usaron tres diferentes dosis por fármaco, para la KTS: 1.0, 2.0 y 4.0 µg. Para el SB: 0.1, 0.5 y 1.5 µg. El objetivo de estas curvas dosis-respuesta fue encontrar una dosis inocua de los antagonistas para posteriormente utilizarla para tratar de bloquear los efectos de la OLE. Los grupos fueron los siguientes: 11) KTS 1.0 µg; 12) KTS 2.0 µg; 13) KTS 4.0 µg; 14) SB 0.1 µg; 15) SB 0.5 µg; 16) SB 1.5 µg; 17) OLE 1.0 µg + KTS 2.0 µg + AM251 1.6 µg; 18) OLE 1.0 µg + KTS 2.0 µg; 19) OLE 1.0 µg + SB 1.5 µg; 20) OLE 1.0 µg + SB 1.5 µg + AM251 1.6 µg. Todo el procedimiento para la evaluación de la ingestión de alimento se mantuvo igual como en los puntos pasados. Adicionalmente, realizamos una doble inmunofluorescencia (apartado **3.5.8**) para determinar si el receptor CB1 y el receptor 5HT_{2c} co-existían en el NAcS.

3.6.2 Administración intra-NAcS de ANA y OLE: Evaluación de la expresión de c-Fos en el hipotálamo. El número de sujetos experimentales para cada grupo fue de 5 (N=5). Para determinar si el efecto hiperfágico de la ANA y de la OLE puede ser asociado a un cambio en la actividad hipotalámica (**objetivo 2.1**) administramos en el NAcS estos dos eCB a las dosis que produjeron el mayor efecto en la consumo de alimento. Adicionalmente, para demostrar que los cambios en la actividad hipotalámica son mediados por una activación del CB1 en el NAcS (**objetivo 2.2**) administramos a la ANA y a la

OLE en combinación con el AM251. Los grupos fueron los siguientes: 1) ANA 1.0 µg; 2) OLE 1.0 µg; 3) VEH, 30% DMSO, 69.8 % PBS, 0.2 % Tween 80; 4) AM251 1.6 µg; 5) ANA 1.0 µg + AM251 1.6 µg; 6) OLE 1.0 µg + AM251 1.6 µg.

Noventa minutos posteriores a cada administración las ratas fueron perfundidas y se dio inicio al protocolo de la inmunohistoquímica contra c-Fos, detallado en el apartado **3.5.6 (Figura 3.2 B)**. Los núcleos hipotalámicos analizados fueron el ARC, el HL, el PVN y el DMH.

3.6.3 Administración intra-NAcS del AA5HT y del OMDM-1: Evaluación de la ingestión de alimento y la expresión de c-Fos en el hipotálamo.

El número de sujetos experimentales para cada grupo fue de 10 (N=10), exceptuando los grupos que se utilizaron para evaluar la expresión de c-Fos y los niveles de los eCB en el NAc y en el hipotálamo, que en este caso fue de 5 sujetos por grupo (N=5). Para abordar el **objetivo 3.1 y 3.2**, y demostrar si la inhibición de la inactivación de los eCB en el NAcS, ya sea inhibiendo su degradación o su recaptura, produce efectos hiperfágicos y si estos son mediados por el CB1, en este experimento administramos de manera independiente el AA5HT y el OMDM-1, y en combinación con el AM251. Los grupos fueron los siguientes: 1) AA5HT 1.0 µg; 2) AA5HT 1.0 µg + AM251 1.6 µg; 3) OMDM-1 1.0 µg; 4) OMDM-1 1.0 µg + AM251 1.6 µg; 5) AM251 4.8 µg; 6) AM251 9.6 µg; 7) OMDM-1 1.0 µg + AM251 4.8 µg; 8) OMDM-1 1.0 µg + AM251 9.6 µg; 9) VEH, 30% DMSO, 69.8 % PBS, 0.2 % Tween 80. Como puede observarse, en el caso del OMDM-1 fue necesario usar otras dos dosis de AM251 ya que la dosis usada para bloquear el efecto del AA5HT no fue efectiva para bloquear el efecto del OMDM-1. Inmediatamente después de la

administración se realizó la cuantificación de la ingestión de alimento (apartado **3.5.4**).

Para determinar si el efecto hiperfágico del AA5HT y del OMDM-1 puede ser asociado a un cambio en la actividad hipotalámica (**objetivo 3.1**) administramos en el NAcS estos dos fármacos solos o en combinación con el AM251. Los grupos que se formaron fueron idénticos a los utilizados para la evaluación de la ingestión de alimento, exceptuando a los grupos de AM251 4.8 µg y OMDM-1 1.0 µg + AM251 4.8 µg, ya que dichos tratamientos no produjeron algún cambio en el consumo de alimento.

Noventa minutos posteriores a cada administración las ratas fueron perfundidas y se dio inicio al protocolo de la inmunohistoquímica contra c-Fos, detallado en el apartado **3.5.6 (Figura 3.2 B)**. Los núcleos hipotalámicos analizados fueron el ARC, el HL, el PVN y el DMH.

Adicionalmente, para determinar si el AA5HT y el OMDM-1 producían los cambios en la ingestión de alimento aumentando los niveles endógenos de los eCB en el NAc, decidimos administrar estos dos fármacos y noventa minutos después sacrificar a los animales para cuantificar los niveles de ANA y del 2-AG en el NAc y en el hipotálamo. Este procedimiento se detalla en el apartado **3.5.7** y en el **Anexo 2**.

3.6.4 Administración intra-NAcS e intra-hipotalámica del AM251: Evaluación de la hiperfagia inducida por la privación de alimento. El número de sujetos experimentales para cada grupo fue de 10 (N=10). Debido a que no observamos cambios significativos en la ingestión de alimento con la sola administración de las tres dosis del AM251, decidimos probar si este

efecto cambiaba modificando el estado energético del organismo (**objetivo 4.1**). Para esto, en ratas privadas de alimento (apartado **3.5.4**), el AM251 fue administrado en el NAcS, en el PVN y en el HL (que fueron en donde se encontraron cambios significativos en el HIS, como se detallara mas adelante). También se probó el efecto de un antagonista opioidérgico, la NLX, con el objetivo de comparar los efectos encontrados con el AM251. Para las administraciones en el NAcS, los grupos fueron los siguientes: 1) AM251 1.6 µg; 2) AM251 4.8 µg; 3) AM251 9.6 µg; 4) NLX 2.0 µg; 5) VEH, 30% DMSO, 69.8 % PBS, 0.2 % Tween 80. Para las administraciones en el PVN: 6) AM251 1.6 µg; 7) VEH, 30% DMSO, 69.8 % PBS, 0.2 % Tween 80. Y en el HL: 8) AM251 1.6 µg; 9) VEH, 30% DMSO, 69.8 % PBS, 0.2 % Tween 80. Inmediatamente después de la administración se realizó la cuantificación de la ingestión de alimento (apartado **3.5.4**).

Para determinar la reactividad del gen que codifica para el CB1 ante un reto energético (**objetivo 4.2**) usamos la técnica de la *hibridación in situ* (HIS) (apartado **3.5.9**), que nos permite visualizar la expresión de un determinado gen. Dos grupos de ratas (N=5), uno sin privación de alimento y otro con privación de alimento durante 24 horas (apartado **3.5.4**) fueron perfundidas y sus cerebros procesados para realizarles la HIS (apartado **3.5.9**). Los núcleos cerebrales analizados fueron el NAc y el hipotálamo.

Se realizaron otros experimentos para analizar diversas conductas asociadas a la privación de alimento y si estas son modificadas por la administración de un antagonista cannabinérgico (en éste caso fue el surinabant, SR) en el NAcS. Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Profesor Tim C. Kirkham en la Universidad de Liverpool. Para este

procedimiento se uso un diseño de cuadrado latino, es decir, todas las ratas (N=10) recibieron todos los tratamientos espaciados por dos días, para permitir el metabolismo del fármaco en cuestión. Las grupos experimentales fueron los siguientes: 1) VEH sin privación de alimento (VEH+SP); 2) VEH con privación de alimento (VEH+CP); 3) Surinabant sin privación de alimento (SR+SP); y 4) Surinabant con privación de alimento (SR+CP). A diferencia de procedimientos pasados, la privación de alimento fue de 4 horas. Al término de este periodo se realizaron todas las infusiones y posteriormente se colocaron a las ratas en tanques de observación durante 30 min. y se realizó el análisis conductual correspondiente (apartado **3.5.5**) y también se cuantificó la ingestión de alimento.

4. RESULTADOS

4.1 La ANA y la OLE en el NAcS estimula la ingestión de alimento a través del receptor CB1. Los resultados indican que en la primera hora, ANA (1.0 µg) y OLE (1.0 µg) incrementan la ingestión de alimento cerca de un 100% comparado con el VEH (**Figura 4.1a y b**). El antagonista al CB1, el AM251, bloqueó este efecto hiperfágico, e inclusive la combinación de OLE y el AM251 produjo una reducción significativa de la ingestión de alimento. Después de cuatro horas de la administración, todas las dosis de ANA y OLE, exceptuando la dosis más pequeña de OLE, incrementan significativamente el consumo de alimento comparado con el VEH. La sola administración de AM251 no modificó la ingestión de alimento. (**Figura 4.1**).

Figura 4.1

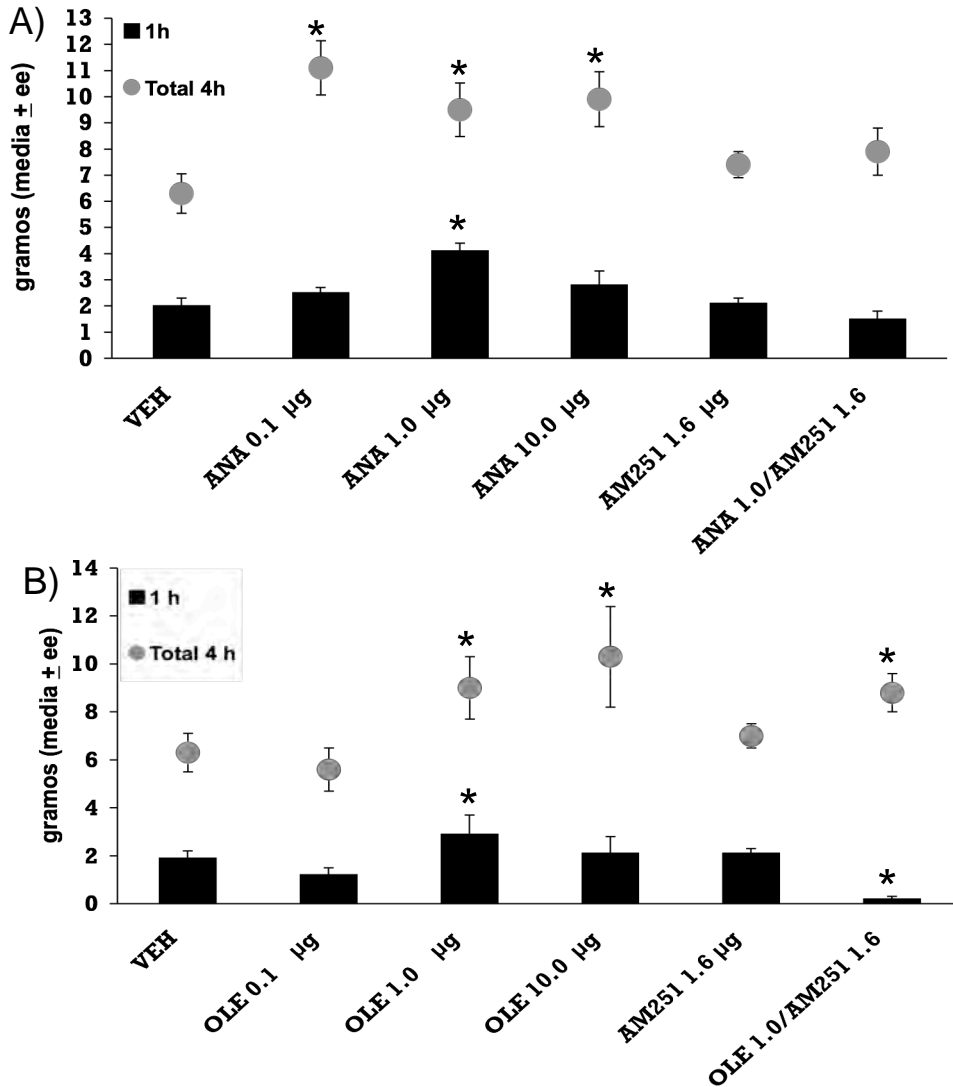


Fig 4.1 Efectos de las infusiones intra-NacS de tres dosis de ANA y OLE (0.1, 1.0 y 10.0 µg) (A y B) y del antagonista canabinérgico AM251. En la primera hora, solo las dosis de 1.0 µg de ANA y OLE incrementan la ingestión de alimento (A y B). Este efecto fue bloqueado por el AM251. La combinación de OLE+AM251 redujo significativamente el consumo de alimento, comparado con todos los tratamientos (B). En el total de 4 horas todas las dosis de ANA y las dos mayores de OLE incrementan la ingestión de alimento (A y B). * $p < 0.05$ vs el grupo VEH.

4.2 La OLE en el NAcS inhibe la ingestión de alimento a través del receptor 5HT_{2c}. Como se observa en la figura 4.1 B, la combinación de OLE y el AM251 produce una reducción significativa en la ingestión de alimento. Nosotros hipotetizamos que, al estar bloqueado el CB1 por el AM251, la OLE puede actuar a través del sistema serotoninérgico y de esta manera, provocar hipofagia. En estos experimentos observamos que tanto el bloqueo de los receptores 5HT_{2A} como el de los 5HT_{2C} en el NAcS produce un aumento en la ingestión de alimento (**Figura 4.2**). Particularmente 4.0 µg de KTS en la primera y en el total de las 4 horas; y las dosis de 0.1 y 0.5 µg del SB en las dos mediciones. Adicionalmente, mostramos que el efecto anorexigénico inducido por la combinación de OLE y AM251 es bloqueado por la co-administración de 1.5 µg de SB, pero no con la co-administración de 2.0 µg de KTS (**Figura 4.2**). Ambas dosis no provocaron algún cambio en la conducta alimenticia. Sin embargo, la combinación de OLE y KTS 2.0 µg u OLE y SB 1.5 µg no potenció el aumento en la ingestión de alimento inducido por el canabinoide (**Figura 4.2**).

4.3 El receptor CB1 y el receptor 5HT_{2c} co-existen en el NAcS. La figura 4.3 es un ejemplo de la doble inmunofluorescencia que muestra la expresión del CB1 y del 5HT_{2c} en el NAcS, en donde también se puede observar que no hay una co-localización celular.

Figura 4.2

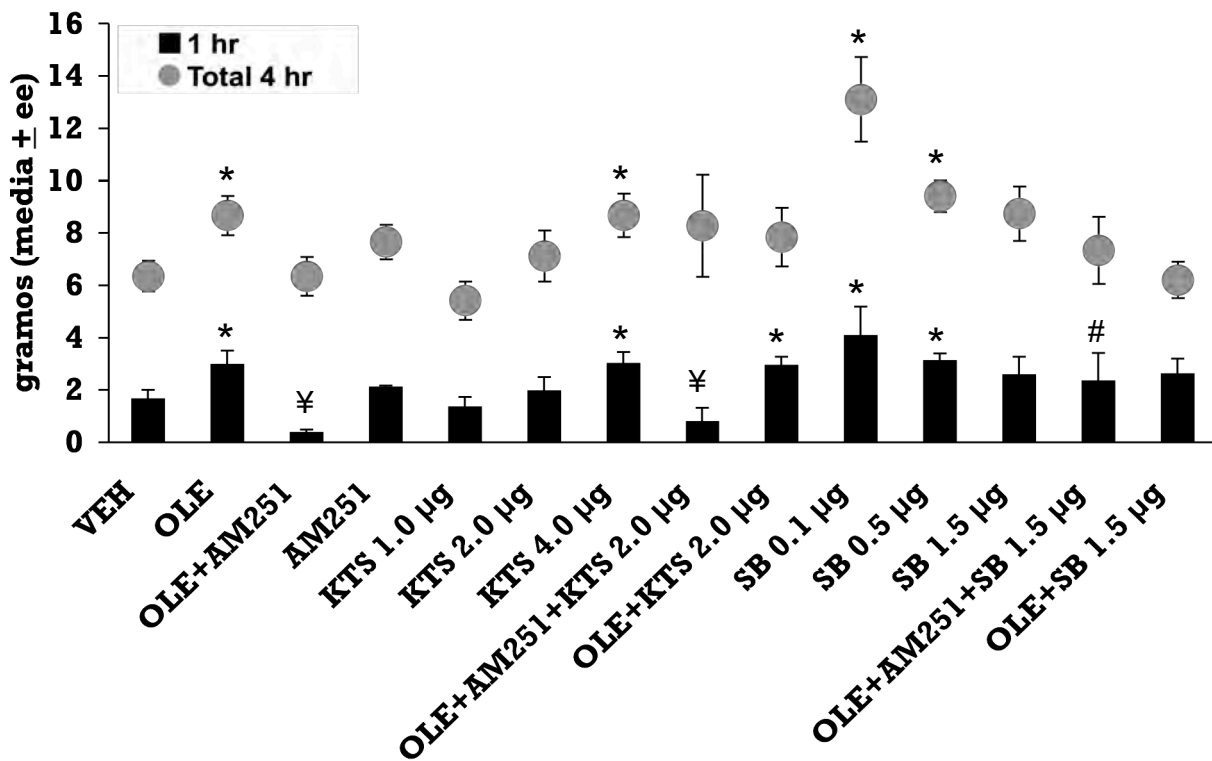


Fig 4.2 Efectos de la administración intra-NAcS de los antagonistas serotoninérgicos KTS y SB242084 sobre la ingestión de alimento. La KTS y el SB aumentan significativamente la ingestión de alimento. * $p < 0.05$ vs VEH. La combinación de OLE+AM251+KTS falla en contrarrestar la reducción en el consumo de alimento inducido por la OLE+AM251. $\neq p < 0.05$ vs VEH. Mientras que la combinación con el SB si reduce este efecto. # $p < 0.05$ vs OLE+AM251.

Figura 4.3

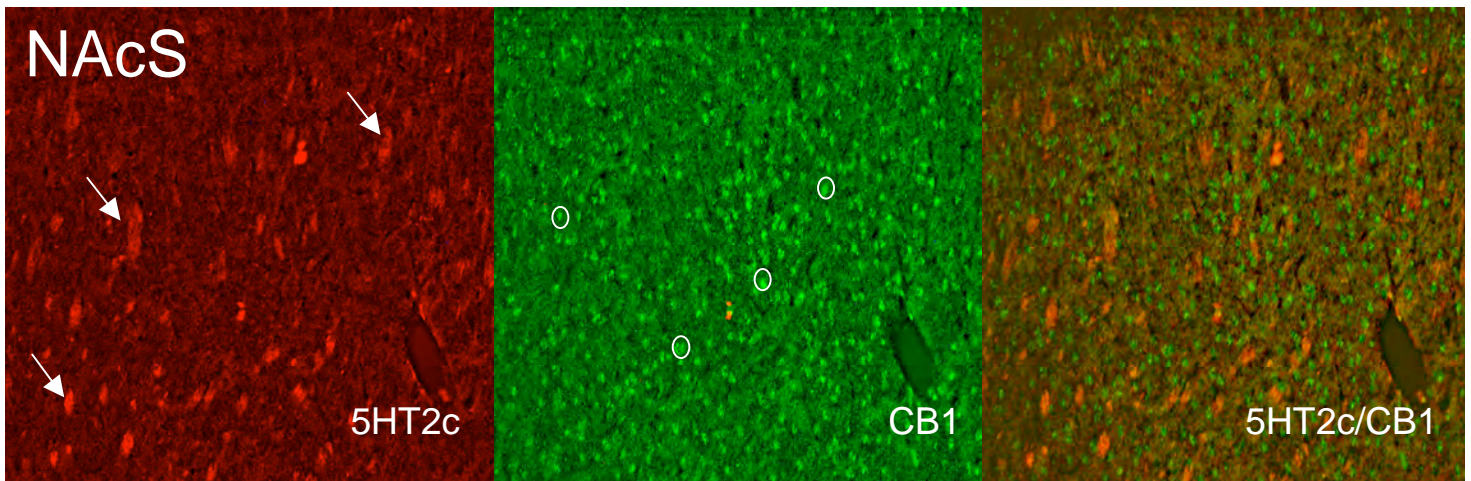


Fig 4.3 Doble inmunofluorescencia para el CB1 (verde) y el 5HT2c (rojo) en el NAcS. Las flechas blancas indican la expresión del 5HT2c y las círculos blancos indican la inmunoreactividad para el CB1. La figura de la derecha muestra la co-expresión de estos dos receptores, sin embargo no se detectó una co-localización celular.

4.4 La ANA y la OLE en el NAcS aumentan la actividad hipotalámica. Este experimento nos permitió determinar si estos dos eCB en el NAcS modificaba la actividad de los núcleos hipotalámicos reguladores de la ingestión de alimento. La **Figura 4.4** muestra microfotografías de las células F-ir en los cuatro núcleos, ARC, PVN, DMH y HL, en los cuales los tratamientos produjeron un incremento significativo en el F-ir. Los valores medios de la F-ir se muestran en la **figura 4.5**. La combinación de OLE+AM251 fue uno de los únicos tratamientos que produjeron un incremento significativo en todos los núcleos estudiados. La ANA en el NAcS incrementó las células F-ir en el PVN, en el DMH y en el HL comparados con los valores después del tratamiento con el VEH. De igual manera, este efecto fue revertido por el AM251. A pesar del hecho de que 1.6 µg de AM251 en el NAcS no produjo cambio alguno en el hipotálamo, la dosis de 9.6 µg redujo significativamente la inmunoreactividad a c-Fos en los cuatro núcleos hipotalámicos analizados. La OLE, por su parte solo, aumento significativamente la F-ir en el PVN.

Figura 4.4

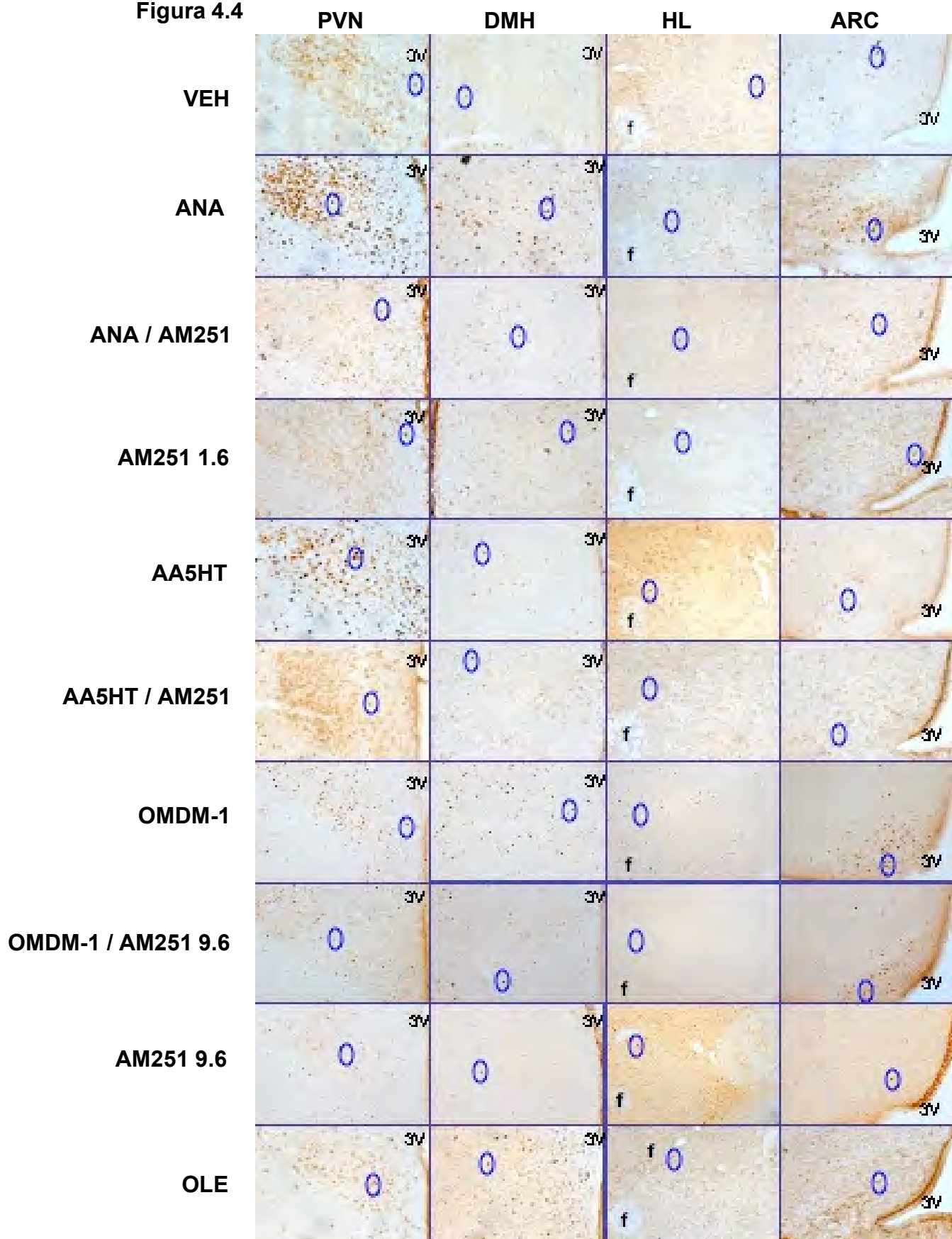


Fig 4.4 Fotografías representativas de los núcleos hipotalámicos con F-ir después de los tratamientos cannabinérgicos en el NAcS. Las elipses azules muestran ejemplos de F-ir. 3V, tercer ventrículo; f, fornix.

Figura 4.5

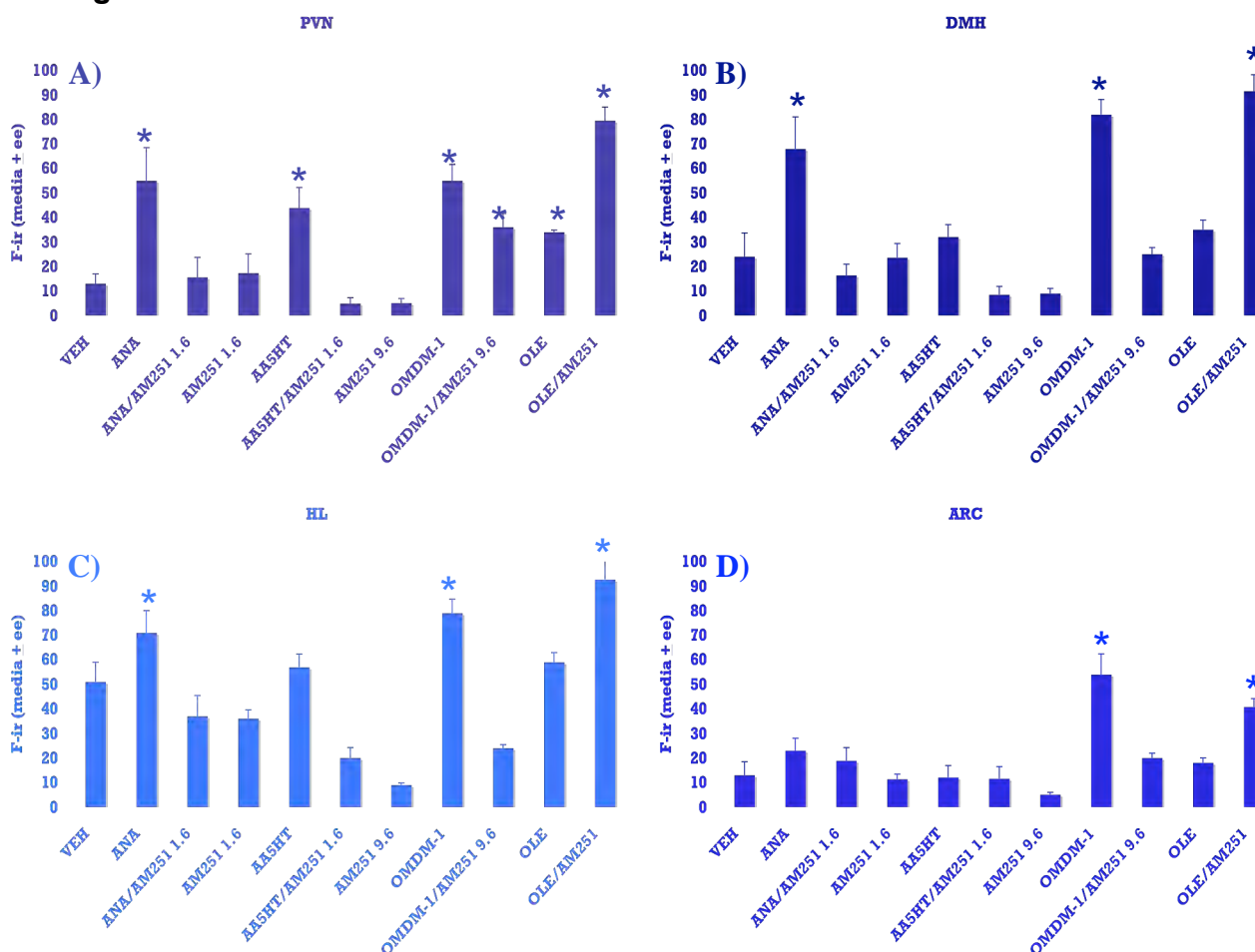


Fig 4.5 Número de células F-ir. En el ARC (D) solo el OMDM-1 incrementan significativamente la expresión de c-Fos. En el PVN (A), la facilitación canabinérgica en el NAcS incrementa la expresión de c-Fos. La ANA y el OMDM-1 estimula la actividad celular en el DMH (B) y en el HL (C). En todas las áreas, el AM251 bloquea el incremento en la expresión de c-Fos inducido por los tratamientos en el NAcS. La dosis de 9.6 μ g del AM251 reduce la inmunoreactividad a c-Fos en todas las áreas hipotalámicas. La combinación de OLE/AM251 incremento la F-ir en todas las áreas de estudio. * $p < 0.05$ comparado con todos los tratamientos.

4.5 El AA5HT y el OMDM-1 en el NAcS estimulan la ingestión de alimento

y activan al hipotálamo a través del receptor CB1. En este estudio

probamos si la infusión del AA5HT, un inhibidor de la FAAH, y del OMDM-1, un

inhibidor de la recaptura de los eCB, en el NAcS afectaba la ingestión de

alimento, y si este efecto era a través del CB1. Observamos que el AA5HT

estimula significativamente el consumo de alimento a la primera y en el total de

las cuatro horas (**Figura 4.6**). Este efecto fue bloqueado por el AM251. El

OMDM-1, aumento significativamente el consumo de alimento solamente en el

total de las 4 horas de medición (**Figura 4.7**). Sin embargo, este efecto no fue prevenido por la dosis de AM251 que bloqueó los efectos de los tratamientos anteriores, ni por una dosis mas alta, la de 4.8 μg . Fue necesario aumentar la concentración hasta 9.6 μg para bloquear el efecto del OMDM-1. Cabe notar que al igual que con la dosis de 1.6 μg , el AM251 a las dosis mayores, 4.8 y 9.6 μg no modificó la ingestión de alimento (**Figura 4.7**). Adicionalmente, encontramos que estos tratamientos (el AA5HT y el OMDM-1) incrementan los niveles de ANA y 2-AG en el NAc (**Tabla 4.1**). En el hipotálamo se encontró un decremento significativo de 2-AG pero no de ANA (**tabla 4.1**).

Con respecto a la expresión de c-Fos en el hipotálamo, el OMDM-1 produjo un incremento significativo en todos los núcleos estudiados. El AA5HT incrementó las células F-ir en el PVN comparados con los valores después del tratamiento con el VEH. Estos efectos fueron revertidos por la co-administración del AM251 (**Figura 4.4 y 4.5**).

Figura 4.6

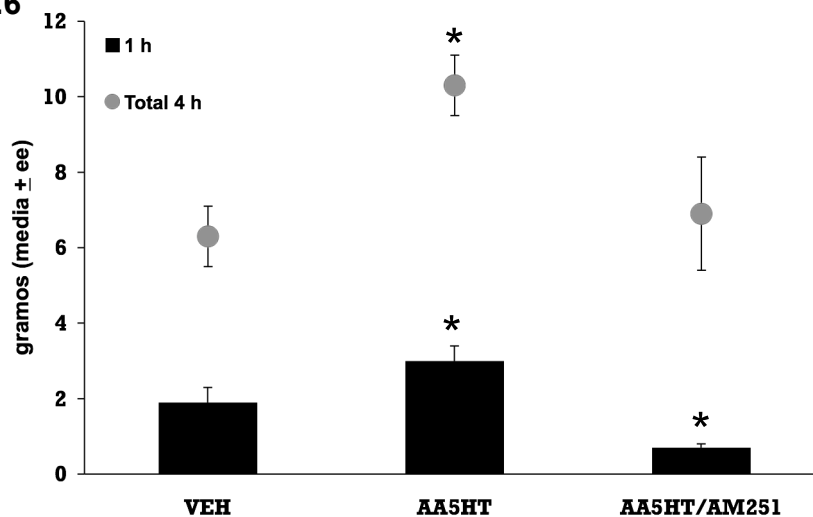


Fig 4.6 Efectos de la infusión intra-NAcS del inhibidor de la FAAH, el AA5HT (1.0 μg), sobre la ingestión de alimento. El AA5HT incremento la ingestión de alimento en la primera, y en el total de 4 horas de medición. Este efecto fue bloqueado por el AM251. * $p < 0.05$ vs VEH y AA5HT/AM251. La combinación de AA5HT y el AM251 redujo la ingestión de alimento en la primera hora. * $p < 0.05$ vs VEH y AA5HT

Figura 4.7

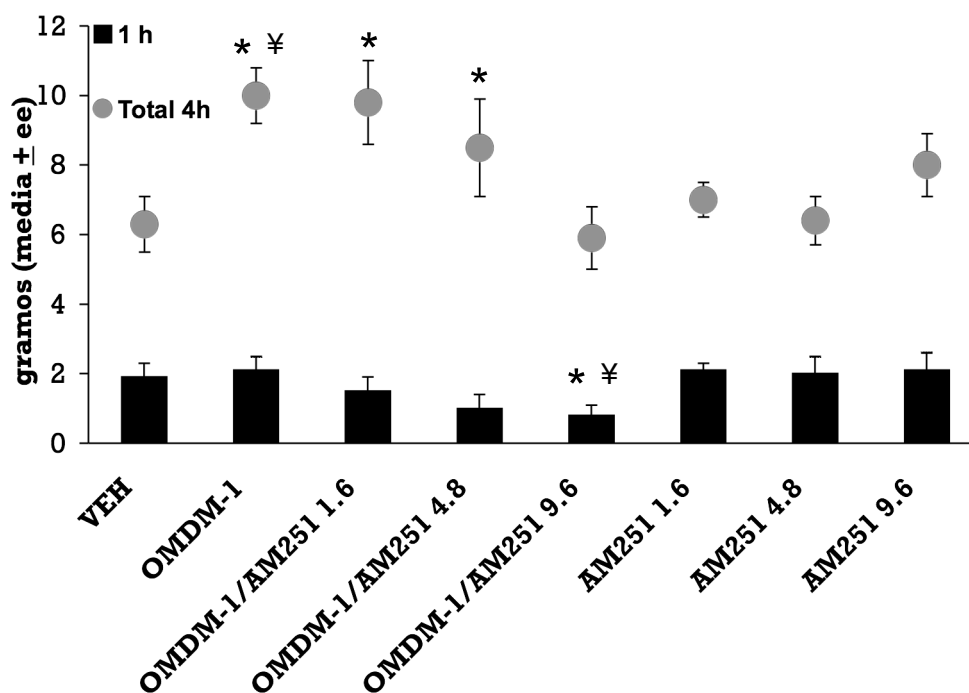


Fig 4.7 Efectos de la infusión intra-NAcS del inhibidor del transportador de ANA, OMDM-1 (1.0 μ g), sobre la ingestión de alimento. El OMDM-1 incremento el consumo de alimento solo en el total de las 4 horas de medición. Dicho efecto solo fue bloqueado por la dosis mas alta del AM251 (9.6 μ g). Tal combinación produjo una reducción en el consumo de alimento en la primera hora, comparado con el VEH. * $p < 0.05$ vs VEH y $\neq p < 0.05$ vs todas las dosis de AM251.

Tabla 4.1

	Núcleo accumbens		Hipotálamo	
	Anandamida	2-AG	Anandamida	2-AG
	(pmol/g)	(nmol/g)	(pmol/g)	(nmol/g)
Vehículo	64.7 \pm 5.5	1.6 \pm 0.2	45.7 \pm 4.7	5.2 \pm 0.3
OMDM-1	67.1 \pm 3.3	2.1 \pm 0.6	55.4 \pm 2.5	3.3 \pm 0.8*
				(p=0-04)
AA5HT	75.6 \pm 4.8	2.6 \pm 0.4 *	43.0 \pm 2.8	3.3 \pm 0.8*
	(p=0.08)	(p=0.03)		(p=0.04)

Tabla 4.1 Niveles de los endocannabinoides en el núcleo accumbens y en el hipotálamo después de las infusiones del AA5HT y del OMDM-1 en el NAcS.

4.6 El antagonismo del CB1 en el NAcS bloquea la hiperfagia inducida por la privación de alimento. La hiperfagia inducida por la privación de alimento de 24 horas fue bloqueada por la administración del AM251 a 1.6 y 4.8 μg en la primera y en el total de 4 horas de medición. Sin embargo, la dosis de 9.6 μg solo produjo este efecto en la primera hora y en el total de 4 horas regreso a los niveles del VEH (**figura 4.8**). De igual manera, la NLX no indujo ningún cambio significativo en la ingestión de alimento (**figura 4.8**). Con respecto a las administraciones hipotalámicas, usamos la dosis mas baja del AM251, la de 1.6 μg , ya que no observamos diferencias significativas entre las dosis utilizadas. A diferencia del efecto observado con las administraciones en el NAcS, en el HL y el PVN, el AM251 no bloqueó el aumento en el consumo de alimento producido por el déficit energético. Por el contrario, se puede observar una potenciación del efecto de la privación de alimento, es decir, el AM251 intra-HL e intra-PVN producen un incremento significativo en la ingestión de alimento, en la primer hora y en el total de 4 horas, respectivamente (**figura 4.9 a y b**). La hiperfagia inducida por una privación de alimento menos agresiva, de 4 horas, fue totalmente bloqueada por el bloqueo del CB1 en el NAcS, usando el Surinabant. Sin embargo, al igual que con el AM251, el SR no afectó la ingestión de alimento en las ratas alimentadas *ad libitum* (**Figura 4.10**). Después del tratamiento con el vehículo, la privación de alimento (VEH-SP) incremento el número de “comidas” y el total del tiempo que las ratas gastan en alimentarse, pero la duración media de cada “comida” no se modificó. Estos efectos conductuales fueron revertidos por la administración del SR intra-NAcS (SR-PA) (**Figura 4.11**). Por el contrario, en las ratas sin privación de alimento, el SR solo modificó la duración media de los episodios de alimentación (SR-

SP). Sin embargo, este tratamiento afectó otras conductas. Por ejemplo, se registró un incremento en la frecuencia de locomoción y de acicalamiento, con una concomitante reducción en la frecuencia de inactividad (**Figura 4.12**).

Figura 4.8

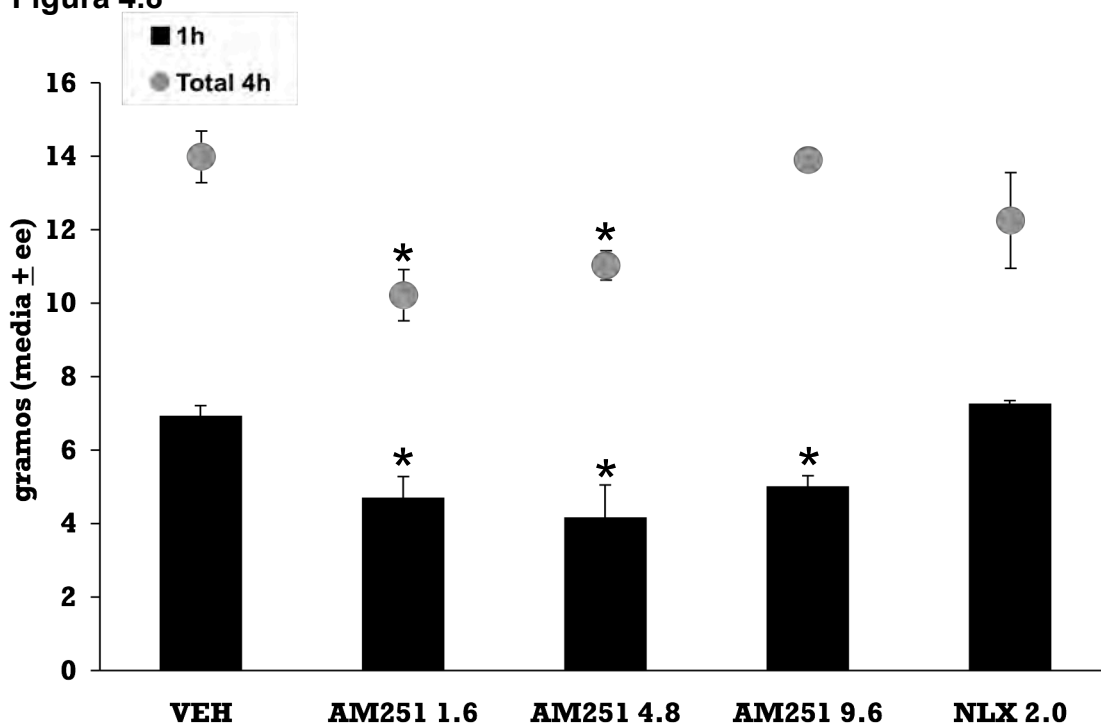


Fig 4.8 Efectos de las infusiones del AM251 y de naloxona (NLX) en el NAcS de ratas privadas de alimento por 24 horas. Las tres dosis del AM251 (1.6, 4.8 y 9.6 μ g) disminuyen significativamente la hiperfagia inducida por la privación de alimento en la primera hora de medición, mientras que en el total de las 4 horas solo las dos primeras dosis resultan efectivas. La NLX (2.0 μ g) no produjo ningún cambio significativo. * $p < 0.05$ vs VEH.

Figura 4.9

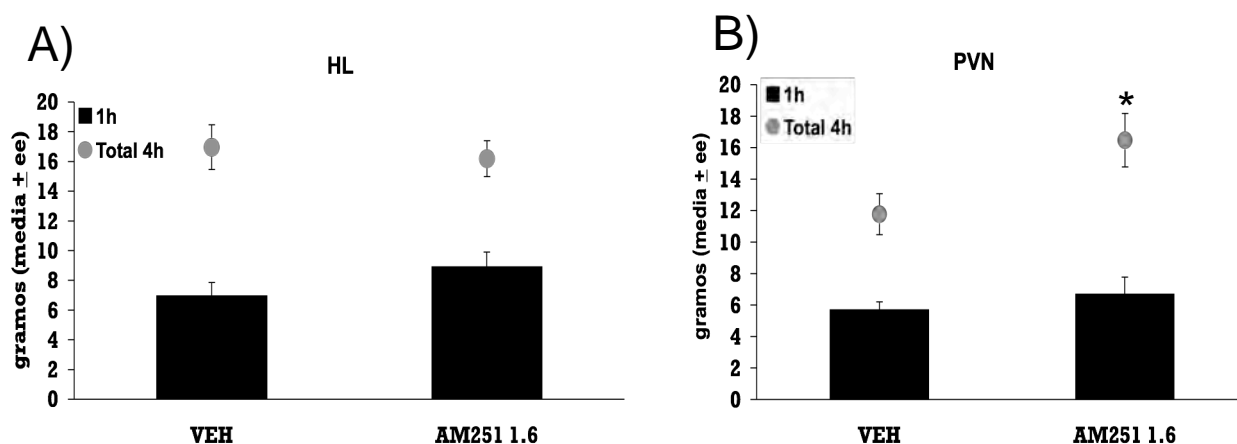


Fig 4.9 Efectos de las infusiones del AM251 intra-hipotalámicas en ratas privadas de alimento por 24 horas. El AM251 en el HL (A) no produce cambios en la ingestión de alimento, mientras que en el PVN (B) se observa una potenciación significativa en el total de las 4 horas de la hiperfagia inducida por la privación de alimento. * $p < 0.05$ vs VEH.

Figura 4.10

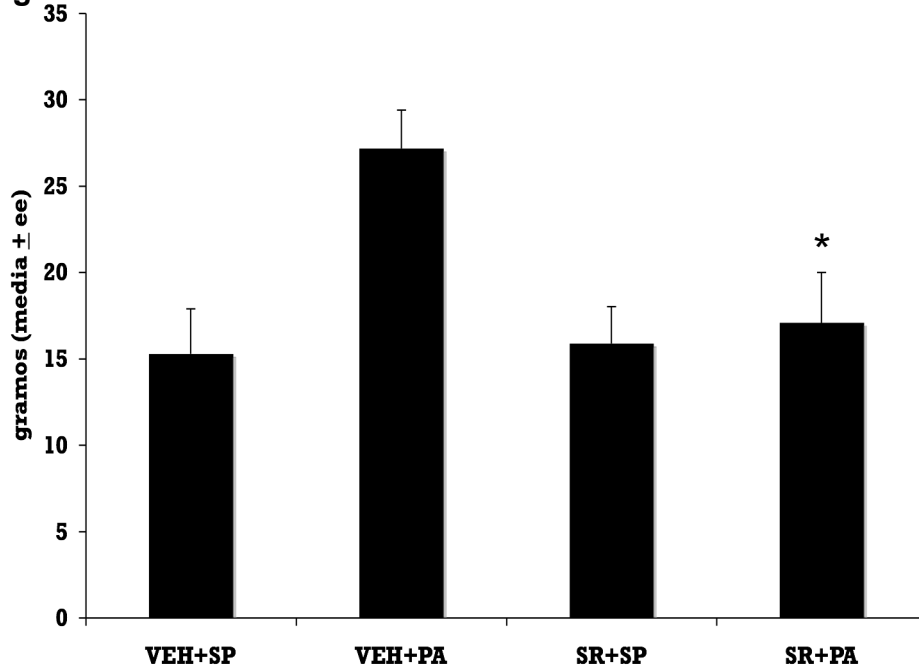


Fig 4.10 Efectos de la administración del Surinabant (SR) intra-NAcS en ratas privadas de alimento por 4 horas. El SR (SR+PA) bloquea totalmente la hiperfagia inducida por la privación de alimento. * $p < 0.05$ vs VEH+PA. El SR no modifica el consumo de alimento en las ratas sin privación (SR+SP).

Figura 4.11

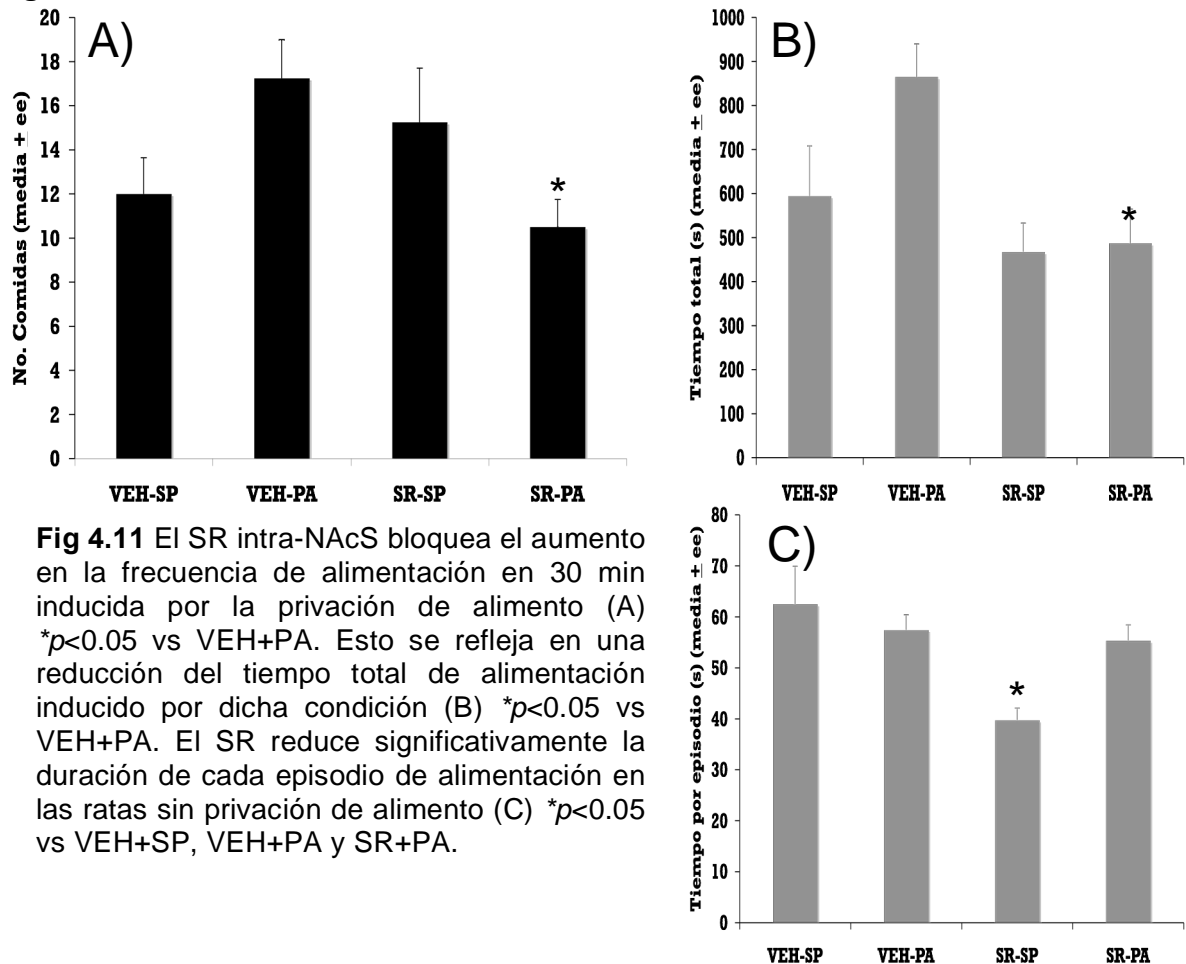


Fig 4.11 El SR intra-NAcS bloquea el aumento en la frecuencia de alimentación en 30 min inducida por la privación de alimento (A) * $p < 0.05$ vs VEH+PA. Esto se refleja en una reducción del tiempo total de alimentación inducido por dicha condición (B) * $p < 0.05$ vs VEH+PA. El SR reduce significativamente la duración de cada episodio de alimentación en las ratas sin privación de alimento (C) * $p < 0.05$ vs VEH+SP, VEH+PA y SR+PA.

Figura 4.12

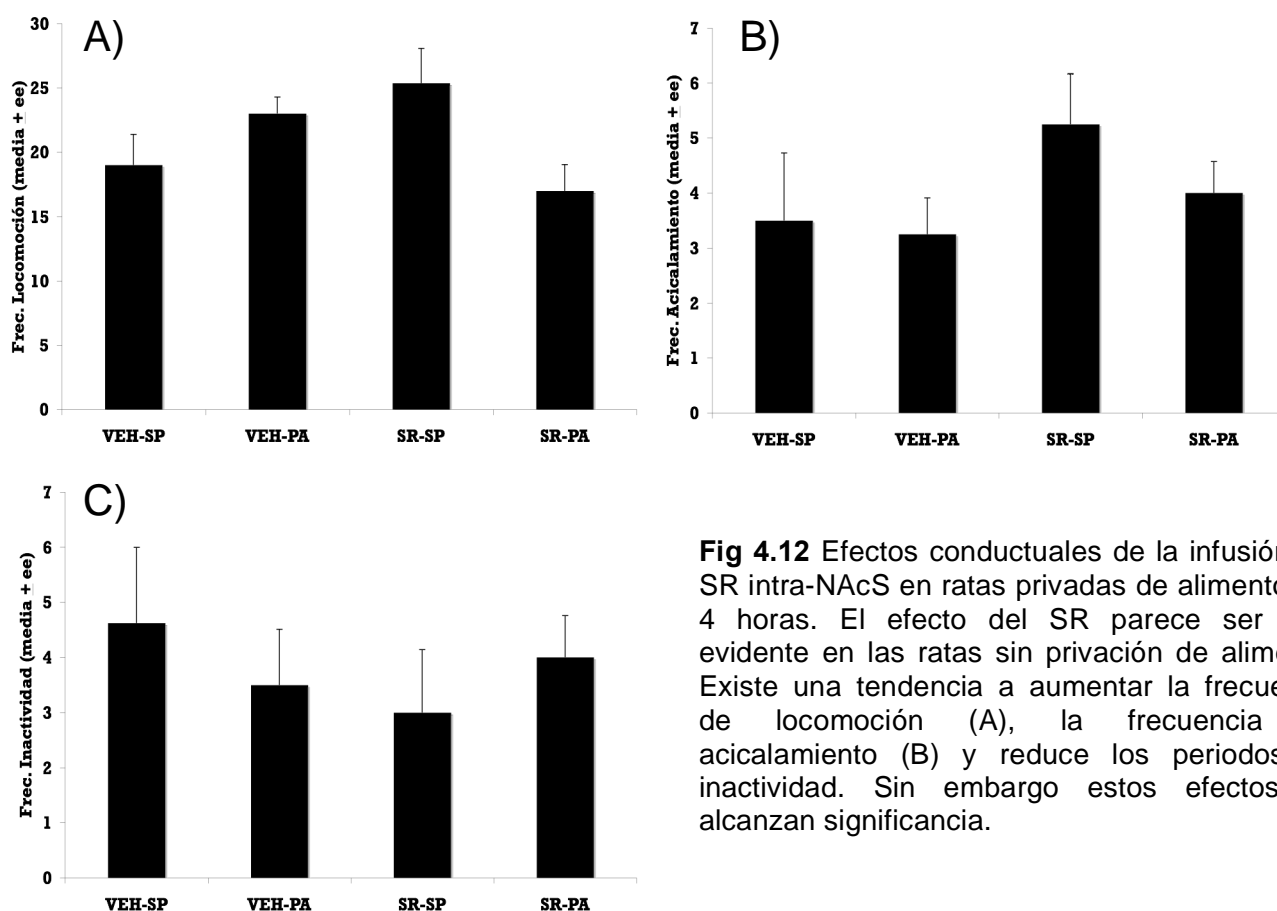


Fig 4.12 Efectos conductuales de la infusión del SR intra-NAcS en ratas privadas de alimento por 4 horas. El efecto del SR parece ser más evidente en las ratas sin privación de alimento. Existe una tendencia a aumentar la frecuencia de locomoción (A), la frecuencia de acicalamiento (B) y reduce los periodos de inactividad. Sin embargo estos efectos no alcanzan significancia.

4.7 La privación de alimento modifica los niveles del ARNm para el CB1

en el cerebro. Con respecto a los niveles del ARNm del CB1, encontramos una mayor expresión del ARNm para el CB1 en todas las áreas cerebrales estudiadas de las ratas sometidas a la privación de alimento. En particular, se detectaron cambios significativos en el NAc, en el estriado dorsal, el HL, y el PVN. En la corteza piriforme y en el núcleo arcuato también aumentaron los niveles del CB1 pero sin alcanzar significancia. En la **figura 4.13** se muestran fotografías representativas de las HIS, y en la **figura 4.14** se muestran los valores medios de la expresión del ARNm para el CB1.

Figura 4.13

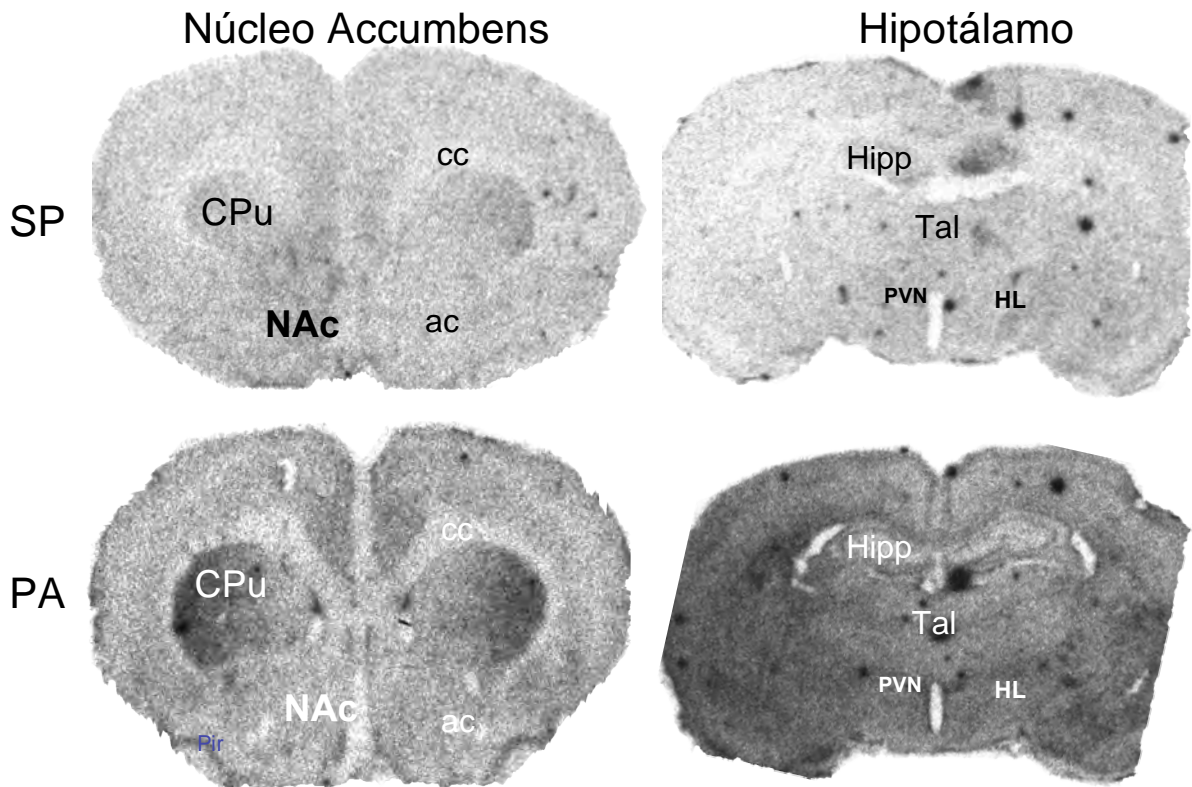


Fig 4.13 Hibridación *in situ* para el receptor CB1 en ratas privadas de alimento. Las regiones mas oscuras indican mayor expresión del ARNm-CB1. La privación de alimento (PA) incrementa el ARNm-CB1 en el caudado-putamen (Cpu), el núcleo accumbens (NAc), el hipotálamo paraventricular (PVN) y en el hipotálamo lateral. ac, comisura anterior; cc, cuerpo calloso; Pir, corteza piriforme; Hipp, hipocampo; Tal, Tálamo.

Figura 4.14

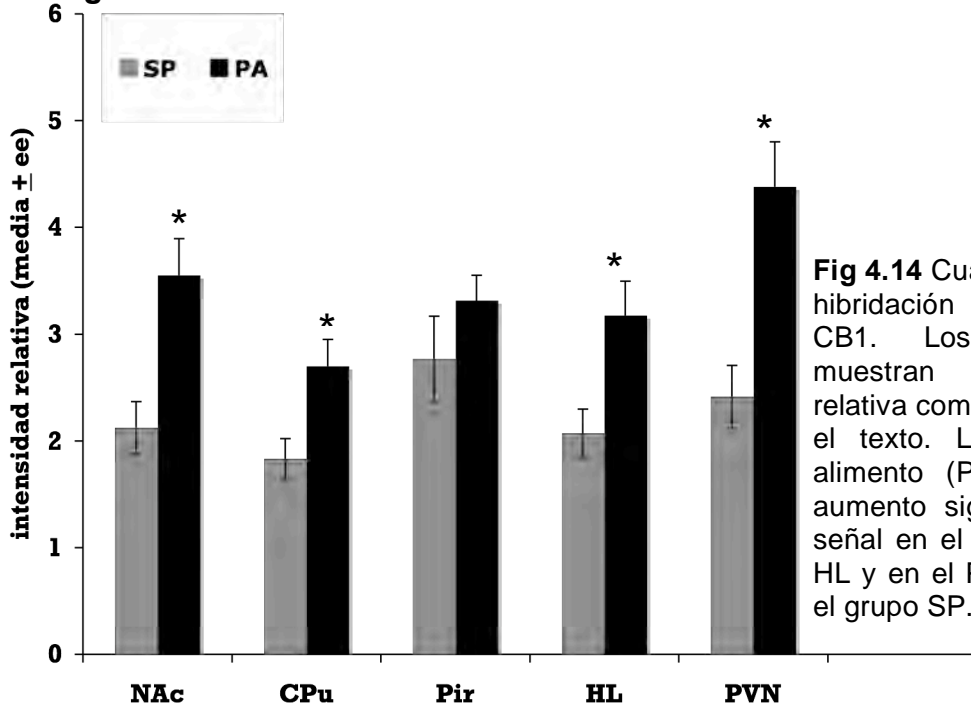


Fig 4.14 Cuantificación de la hibridación *in situ* para el CB1. Los valores se muestran en Intensidad relativa como se describe en el texto. La privación de alimento (PA) produce un aumento significativo de la señal en el NAc, el CPu, el HL y en el PVN. * $p < 0.01$ vs el grupo SP.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se ha demostrado previamente que la inhibición farmacológica del NAc, ya sea por opioides, agonistas GABAérgicos o antagonistas glutamatérgicos facilita la ingestión de alimento (Bodnar et al., 1995; Hanlon et al., 2004; Stratford, 2005). En este trabajo, demostramos que la administración intra-NAcS de los cannabinoides ANA y OLE también estimula la ingestión de alimento, a través de un mecanismo dependiente de la activación del receptor CB1 ya que dicho efecto orexigénico fue bloqueado por la co-administración del antagonista CB1, el AM251. De manera general, todas las dosis probadas facilitan el consumo de alimento, pero los efectos de ANA y OLE pueden ser clasificados, dependiendo de la dosis, como una respuesta aguda (ANA y OLE 1.0 µg) en la primera hora post-inyección, o como una respuesta más tardía pero duradera (ANA 0.1 y 10.0 µg; OLE 10 µg) durante las cuatro horas de medición. Adicionalmente, hemos mostrado por vez primera que la inhibición farmacológica de la FAAH, la enzima principal encargada de la degradación de los endocannabinoides, así como la inhibición de la recaptura de ANA por el OMDM-1, produce un aumento en la ingestión de alimento. Dichos efectos también fueron prevenidos por el AM251. Estos resultados sugieren que dichos compuestos facilitan el consumo de alimento prolongando farmacológicamente la vida media de los cannabinoides endógenos en el NAcS activando indirectamente al CB1.

El AM251 por si solo no modifica la ingestión de alimento a las dosis usadas (1.6, 4.8 y 9.6 µg). Esto parece contrastar con los datos en la literatura que muestran un efecto hiporéxico inducido por diversos antagonistas

canabinérgicos, incluidos el Rimonabant y el propio AM251. Sin embargo, estos resultados se observaron con administraciones sistémicas, mientras que en el presente trabajo las infusiones fueron directamente en el NAcS. Es decir, en el primer caso, los antagonistas CB1 pueden modificar la ingestión de alimento prácticamente afectando todo el organismo. Así mismo, en el estudio de Kirkham et al., en el 2002, el Rimonabant no produjo cambios en el consumo de alimento cuando se administró en el NAcS. Otro punto a considerar (y discutido posteriormente en este apartado) es que los animales usados para estos experimentos tenían el alimento *ad libitum*, es decir, su estado energético no está comprometido.

El AM251 combinado con los otros tratamientos, ANA, AA5HT, OMDM-1 y OLE) produce una reducción (significativa, con excepción de ANA+AM251) de la ingestión de alimento. Siendo el caso más dramático el de la combinación de OLE+AM251. Esto puede sugerir la existencia de otros compuestos endógenos cuya inactivación es inhibida por el AA5HT y el OMDM-1, y cuyos efectos anorexigénicos se desenmascaran cuando el receptor CB1 está bloqueado. Un candidato puede ser la oleoiletanolamida, que cuando se administra sistémicamente junto con el Rimonabant se sinergizan para reducir la ingestión de alimento (Serrano et al., 2007). Otra posibilidad, y la probada en este trabajo, es que la OLE actuando a través de otros sistemas de neurotransmisión produjera los efectos hipofágicos. Como revisamos en el capítulo del Sistema Canabinérgico, la OLE puede afectar la actividad de los receptores serotoninérgicos 5HT_{2A} y 5HT_{2C}. Estos receptores son los principales involucrados en la acción anorexigénica inducida por la serotonina (Hayashi et al., 2005; Simansky et al., 2004; Trifunovic & Reilly, 2006; Vickers

et al., 2001). Aquí demostramos por primera vez que la OLE tiene propiedades hipofágicas actuando a través del receptor 5HT_{2C} y no actuando en los 5HT_{2A}. La disminución en la ingestión de alimento provocada por la combinación OLE+AM251 se revierte por la co-administración del antagonista selectivo 5HT_{2C}, el SB242084, pero no por la co-administración de ketanserina. Es decir, al estar bloqueado el CB1 en el NAcS, la OLE actúa a través de los receptores serotoninérgicos, inhibiendo la ingestión de alimento. También observamos que la sola infusión de la KTS y del SB provoca un aumento en el consumo de alimento. Lo que sugiere la literatura es que probablemente la interacción eCB-5HT en el NAcS modula la actividad dopaminérgica y por este medio, afecta las propiedades recompensantes del alimento (Fletcher et al., 2006; Hayes et al., 2009; McMahon et al., 2001; Yan, 2000). También pudiera afectar la expresión de algunos péptidos anorexigénicos como el CART (Jean et al., 2007). Estos resultados indican que parece existir un tono serotoninérgico en el NAcS que participa en la regulación de los procesos de recompensa, y que el sistema canabinérgico, particularmente la OLE, puede afectar esta relación. Si observamos la distribución de la inmunoreactividad del receptor CB1 y del receptor 5HT_{2c} en el NAc es claro que se encuentran en poblaciones neuronales diferentes. El CB1 parece estar confinado a la presinapsis (potencialmente glutamatérgicas) que afectarían principalmente a las neuronas GABAérgicas espinosas medianas. Por otra parte, el 5HT_{2c} se expresa en menor cantidad en el NAc y muy probablemente en neuronas locales colinérgicas. Esto puede deducirse por el tamaño de las células inmunoreactivas al 5HT_{2c}, considerablemente más grandes que la mayoría de las neuronas del accumbens. Sin embargo, se tienen que realizar más

experimentos para determinar con exactitud en que tipo de células se expresa este receptor. Si esto fuera cierto, es decir, que los 5HT_{2c} se expresan en las neuronas colinérgicas, la serotonina tendería a aumentar los niveles de acetilcolina en el NAc y como consecuencia disminuir la ingestión de alimento. Ya se ha demostrado en estudios pasados que la actividad colinérgica estriatal (dorsal y ventral) participa en la ingestión de alimento (Hoebel et al., 2007).

Ha sido previamente documentado que el NAc participa en la expresión normal de la conducta alimenticia (Kelley, 2004). También se ha sugerido que el sistema opioidérgico en este núcleo es un mediador crucial de la sensación hedónica producida por el alimento (Peciña & Berridge, 2005). De hecho, se ha descrito una interacción funcional entre los sistemas canabinérgico y opioidérgico (Christie, 2006; Vigano et al., 2005). Esto hace plausible pensar que los eCB, directamente o interactuando con los opioides en el NAcS, aumenten el valor recompensante del alimento. El estudio de Mahler et al., en el 2007 respalda esta idea, mostrando que la ANA en el NAcS aumenta el “liking” inducido por una solución de sucrosa. Dada la naturaleza inhibitoria de los eCB, así como su localización, creemos que las infusiones directas de estas moléculas en el NAcS inhibiría este núcleo (Hoffman & Lupica, 2000; Lupica et al., 2004; Manzoni & Bockaert, 2001; Pistis et al., 2002; Robbe et al., 2002). El grupo de Ann Kelley ha demostrado que las infusiones intra-NAcS de agonistas GABAérgicos y antagonistas glutamatérgicos estimulan la ingestión de alimento con una concurrente activación de áreas hipotalámicas, principalmente el HL (Kelley & Swanson 1997; Stratford & Kelley, 1999). Este efecto puede deberse al hecho de que el agonismo GABAérgico en el NAcS produce una inhibición de las neuronas GABAérgicas y como consecuencia

una desinhibición del HL. Los eCB, inyectados exógenamente o facilitados endógenamente, por inhibición de la FAAH o de su recaptura, pueden actuar a través del receptor CB1 inhibiendo la liberación de glutamato, por tanto las células principales del NAcS no estarían excitadas (sin salida GABAérgica) resultando en una desinhibición de las células hipotalámicas que producen péptidos orexigénicos, directa o indirectamente (desinhibiendo la actividad glutamatérgica hipotalámica) (Sano & Yokoi, 2007). La otra posibilidad es que, dado que el receptor CB1 también se encuentra en las colaterales GABAérgicas del NAcS, los eCB pueden inhibir la inhibición, por tanto tendríamos a un NAcS activo que inhibiría principalmente al globo pálido ventral, que es GABAérgico también, quitando el bloqueo que tiene esta última estructura sobre el HL. Por otra parte, los eCB pueden suprimir el tono inhibitorio que tienen las neuronas del HL actuando localmente en este núcleo (Jo et al., 2005). Nuestros datos revelan que las infusiones de ANA, OLE, AA5HT y el OMDM-1 intra-NAcS activa no solamente al HL sino también al ARC, al DMH y al PVN, núcleos reguladores esenciales de la ingestión de alimento. De estos tratamientos, el que indujo un cambio en todos los núcleos fue el OMDM-1, que curiosamente fue con el que se necesitó una mayor dosis de AM251 para bloquear su efecto hiperfágico. Por otra parte, la combinación de OLE+AM251 produjo cambios en todos los núcleos estudiados y fueron los de mayor magnitud. En el PVN, el efecto de ANA correlaciona de manera directa con los datos conductuales encontrados con la infusión de este canabinoide en el NAcS. Lo mismo se puede observar con el AA5HT y el OMDM-1. En el HL y en el DMH, tanto la ANA como el OMDM-1 producen un aumento significativo en la expresión de c-Fos, ambos mediados por el CB1, ya que éste efecto fue

bloqueado por el AM251. Con la administración del AA5HT y la OLE se puede observar una tendencia a aumentar el c-Fos. Lo que es remarcable aquí es que la combinación del AA5HT y del OMDM-1 con el AM251 producen una reducción en la actividad del HL que podemos relacionarlo con la baja en la ingestión de alimento observada después de las infusiones de estos tratamientos en el NAcS. Esto sugiere que el efecto del AA5HT parece ser inespecífico comparado con los efectos observados con la ANA y el OMDM-1. Recordemos que el AA5HT inhibe a la enzima que se encarga de degradar a los ácidos grasos amidados, entre ellos la ANA, pero existen otros que puedan estar ejerciendo efectos diferentes a los producidos por la ANA, como la oleoiletanolamida o la misma OLE que al actuar a través de los receptores serotoninérgicos pueden inhibir la ingestión de alimento. En este mismo sentido, el OMDM-1 es un inhibidor de la recaptura de ANA, teniendo así mayor especificidad (y al parecer mayor potencia) en sus efectos.

La OLE sólo produce un aumento significativo del c-Fos en el PVN, sin embargo la combinación de OLE+AM251 produjo el mayor efecto en todos los núcleos, correlacionando de manera negativa con los efectos conductuales. Este efecto puede ser mediado por la activación de los receptores 5HT_{2c}. Esto puede indicar que para que se presente la hiperfagia o la hipofagia inducida por los cannabinoides endógenos se necesita una mayor actividad del PVN. La diferencia puede estar en el tipo de células que están siendo activadas. En general, esto sugiere que tanto para el hambre como para la saciedad, inducidas por los cannabinoides en el NAcS parece necesaria una activación hipotalámica distribuida. Sin embargo, falta por determinar el fenotipo de las

células activadas. Cabe destacar que la inyección de la dosis mas alta del AM251 (9.6 µg), la cuál no afecta la ingestión de alimento, produce una reducción significativa en la F-ir de los núcleos hipotalámicos. Esto nos hace pensar en la existencia de mecanismos extra-hipotalámicos reguladores de la ingestión de alimento, que pueden, de igual manera, ser afectados por la actividad canabinérgica del NAcS. Es probable que el efecto del AM251 no se vea reflejado en la cantidad de alimento que ingiere el organismo pero si en otras conductas o en otras condiciones energéticas, ya que se ha mostrado que la restricción de alimento produce un incremento en los niveles de ANA y 2-AG en el cerebro límbico anterior, que es la región cerebral en donde se encuentra el NAc (Kirkham et al., 2002).

Aquí demostramos que una privación de alimento por 24 h produce una mayor activación del gen que codifica al receptor CB1, medido por la técnica de hibridación *in situ*, que no permite observar cambios en los niveles del ARNm. Observamos un aumento del ARNm-CB1 en el NAc, el PVN y el HL. Estos resultados coinciden con los encontrados por Cottone et al. (2009), en este mismo año en donde observan una regulación a la alza del mensajero para el receptor CB1 inducida por la restricción de alimento en los peces dorados. Adicionalmente, nuestros resultados muestran que el bloqueo del receptor a cannabinoides CB1 en el NAcS bloquea totalmente la hiperfagia inducida por una privación de alimento de 4 horas, reflejándose en una reducción del tiempo que el animal gasta en alimentarse así como una reducción en la frecuencia de alimentación. Nuevamente, el antagonista canabinérgico usado, el Surinabant, no afectó la cantidad de alimento ingerido por la rata con el alimento *ad libitum*. Sin embargo si afecta la expresión de otras conductas, como una disminución

en el tiempo de cada episodio de alimentación, mayor locomoción y un aumento en la frecuencia de acicalamiento. Esto indica que el bloqueo del sistema canabinérgico en el NAcS puede promover neofobia, o hacer menos recompensante el alimento sin que esto signifique una reducción en la ingestión de alimento. Por otra parte, el AM251 en el NAcS, pero no en el PVN ni en el HL, disminuye parcial pero significativamente la hiperfagia inducida por una privación de alimento mas prolongada, de 24 horas. El hecho que en este caso el bloqueo haya sido parcial y no total como en el primero, puede significar al menos dos escenarios: el primero, que el estado energético del organismo se encuentre mas comprometido con la privación de 24 h que con la de 4, y por eso otros mecanismos extra-accumbales se echen a andar, principalmente mecanismos hipotalámicos, sugiriendo que una restricción de alimento menor activa específicamente al sistema de la recompensa sin modificar mecanismos homeostáticos. El segundo escenario contempla sólo una diferencia en la potencia de los antagonistas canabinérgicos. Para comprobar ésto, es necesario entonces administrar ambos antagonistas, el AM251 y el Surinabant, después de una privación de alimento por 4 h y 24 h, respectivamente. Lo que si parece esencial es la participación del sistema canabinérgico del NAcS en mediar la señal de alarma ante un desbalance energético, ya que también administramos un antagonista opioidérgico como la Naloxona y no observamos el efecto visto con el AM251.

Con respecto a las administraciones hipotalámicas, el AM251 intra-PVN potencia la hiperfagia inducida por el ayuno. Esto puede indicar una función totalmente diferente del sistema canabinérgico en diversas áreas cerebrales o bajo ciertas condiciones del organismo. O incluso, una función diferencial de

cada uno de los canabinoides. Por ejemplo, la restricción de alimento aumenta los niveles del 2-AG, y no de ANA, en el hipotálamo (Kirkham et al., 2002); la auto-administración de heroína promueve la formación de ANA pero no de 2-AG, y lo contrario ocurre con el consumo de alcohol (Caillé et al., 2007). En este trabajo, la inhibición de la inactivación de los eCB en el NAcS aumenta las concentraciones de ANA y 2-AG en el NAc pero las disminuye en el hipotálamo. Esto respalda el hecho de que los agonistas canabinérgicos en el NAcS activan al hipotálamo.

Como puede deducirse, el estudio del sistema canabinérgico es aún insuficiente, pero se tienen las bases sólidas para seguir por buen camino, lo que hace más apasionante el estudio de este sistema de neurotransmisión.

CONCLUSIONES

- Las infusiones intra-NAcS de ANA y OLE, así como de los inhibidores de su inactivación estimulan la ingestión de alimento a través de la activación de los receptores CB1.
- Estos tratamientos activan núcleos hipotalámicos involucrados con la regulación de la ingestión de alimento.
- Este es el primer estudio en mostrar que los activadores indirectos del CB1, el AA5HT y el OMDM-1, pueden facilitar el consumo de alimento. Esta observación puede tener implicaciones clínicas para el potencial uso de estos fármacos para el tratamiento de los desórdenes alimenticios como la anorexia o la bulimia. En este mismo sentido, sugiere que las condiciones que causan un deterioro en el metabolismo de los endocannabinoides con una subsiguiente elevación de los mismos en el NAcS puede contribuir al desarrollo de la obesidad.
- La OLE posee una doble función en el NAcS, estimula el consumo de alimento activando a los CB1 e inhibe esta conducta actuando a través de los 5-HT_{2C}. El bloqueo de este receptor y de los 5-HT_{2A} en el NAcS promueve la ingestión de alimento. Este conocimiento tiene una información adicional de gran importancia. Por ejemplo que algunos antidepresivos actúan a través de interaccionar con los receptores a serotonina, como la mirtasapina. Esto puede ser de gran ayuda en la terapéutica ya que la OLE puede llegar a ser un

fármaco antidepresivo modificando al sistema canabinérgico y al serotoninérgico.

- **El sistema canabinérgico en el NAc y en el hipotálamo es reactivo ante un reto energético modificando la actividad del gen que codifica para el CB1. La hiperfagia inducida por una privación de alimento es revertida por el bloqueo del CB1 en el NAcS pero no en el hipotálamo. Sugiriendo una función diferencial del mismo sistema en regiones separadas.**
- **Este trabajo devela una función importante del sistema canabinérgico del NAcS en la activación de regiones cerebrales clásicamente relacionadas con la ingestión de alimento, como el hipotálamo, apoyando de esta manera la existencia de una relación funcional canabinoide-dependiente entre el núcleo accumbens y el hipotálamo encargada de la modulación de la conducta alimenticia.**

6. REFERENCIAS

Abbot CR, Kennedy AR, Wren AM, Rossi M, Murphy KG, Seal LJ, Tood JF, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR (2003). Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. *Endocrinology*, 144: 3943-3949.

Adan RA, Tiesjema B, Hillebrand JJ, le Fleur SE, Kas MJ, de Krom M (2006). The MC4 receptor and control of appetite. *Br J Pharmacol*, 149: 815-827.

Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, Rubino T, Michalski CW, Marsicano G, Monory K, Mackie K, Marian C, Batkai S, Parolaro D, Fischer MJ, Reeh P, Kunos G, Kress M, Lutz B, Woolf CJ, Kuner R (2007). Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci*, 10: 870-879.

Aizawa T, Greer MA (1981). Delineation of the hypothalamic area controlling thyrotropin secretion in the rat. *Endocrinology*, 109: 1731-1738.

Alheid GF (2003). Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci*, 985: 185-205.

Alon T, Friedman JM (2006). Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. *J Neurosci*, 26: 389-397.

Alonso G, Szafarczyk A, Assenmacher I (1986). Immunoreactivity of hypothalamo-neurohypophysial neurons which secrete corticotropin-releasing hormone (CRH) and vasopressin (Vp): immunocytochemical evidence for a correlation with their functional state in colchicine-treated rats. *Exp Brain Res*, 61: 497-505.

Alvarez-Jaimes L, Polis I, Parsons LH (2007). Attenuation of cue-induced heroin-seeking behavior by cannabinoid CB1 antagonist infusions into the nucleus accumbens core and prefrontal cortex, but not basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 33: 2483-2493.

Anand BK, Brobeck JR (1951a). Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med*, 24: 123-140.

Anand BK, Brobeck JR (1951b). Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, 77: 323-324.

Aravich PF, Sclafani A (1983). Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behav Neurosci*, 97: 970-983.

Astrup A, Raben A (1996). Glucostatic control of food intake and obesity. *Proc Nutr Soc*, 55: 485-495.

Atrens DM, Von Vietinghoff-Riesch (1972). The motivational properties of electrical stimulation of the medial and paraventricular hypothalamic nuclei. *Physiol Behav*, 9: 229-235.

Avraham Y, Menachen AB, Okun A, Zlotarav O, Abel N, Mechoulam R, Berry EM (2005). Effects of the endocannabinoid noladin ether on body weight, food consumption, locomotor activity, and cognitive index in mice. *Brain Res Bull*, 65: 117-123.

Azizi P, Haghparast A, Hassanpour-Ezatti M (2008). Effect of CB1 receptor antagonist within the nucleus accumbens on the acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference in morphine-sensitized rats. *Behav Brain Res*, 197: 119-124.

Bäckberg M, Hervieu G, Wilson S, Meister B (2002). Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemical identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake. *Eur J Neurosci*, 15: 315-328.

Bäckberg M, Madjid N, Ogren SO, Meister B (2004). Down-regulated expression of agouti-related protein (AGRP) mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus of hyperphagic and obese tub/tub mice. *Brain Res Mol Brain Res*, 125: 129-139.

Bagnasco M, Kalra PS, Kalra SP (2002). Ghrelin and leptin pulse discharge in fed and fasted rats. *Endocrinology*, 143: 726-729.

Bai FL, Yamano M, Shiotani Y, Emson PC, Smith AD, Powell JF, Tohyama M (1985). An arcuate-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res*, 331: 172-175.

Baldo BA, Daniel RA, Berridge CW, Kelley AE (2003). Overlapping distributions of orexin/hypocretin- and dopamine- β -hydroxylase immunoreactive fibers in rat brain regions mediating arousal, motivation, and stress. *J Comp Neurol*, 464: 220-237.

Baldo BA, Sadeghian K, Basso AM, Kelley AE (2002). Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. *Behav Brain Res*, 137: 165-177.

Balthasar N, Coppari R, McMinn J, Liu SM, Lee CE, Tang V, Kenny CD, McGovern RA, Chua SC Jr, Elmquist JK, Lowell BB (2004). Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron*, 42: 983-991.

Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang CY, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist JK, Lowell BB

(2005). Divergence of melacortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*, 123: 493-505.

Barbano MF, Cador M (2005). Differential regulation of the consummatory, motivational and anticipatory aspects of feeding behavior by dopaminergic and opioidergic drugs. *Neuropsychopharmacology*, 31: 1371-1381.

Basavarajappa BS (2007). Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett*, 14: 237-246.

Becker JB, Rudick CN, Jenkins WJ (2001). The role of dopamine in the nucleus accumbens and striatum during sexual behavior in the female rat. *J Neurosci*, 21: 3236-3241.

Beckstead RM, Domesick VB, Nauta WJ (1979). Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res*, 175: 191-217.

Bell ME, Bhatnagar S, Akana SF, Choi S, Dallman MF (2000). Disruption of arcuate/paraventricular nucleus connections changes body energy balance and responses to acute stress. *J Neurosci*, 20: 6707-6713.

Bellinger LL, Bernardis LL (2002). The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav*, 76: 431-442.

Bellinger LL, Bernardis LL, Brooks S (1979). The effect of dorsomedial hypothalamic nuclei lesions on body weight regulation. *Neuroscience*, 4: 659-665.

Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, 277: 1094-1097.

Bernstein LM, Grossman MI (1956). An experimental test of the glucostatic theory of regulation of food intake. *J Clin Invest*, 35: 627-633.

Berridge CW, España RA (2006). Hypocretins: waking, arousal, or action? *Neuron*, 46: 696-698.

Berridge KC (2003). Pleasures of the brain. *Brain Cogn*, 52: 106-128.

Berridge KC (2006). The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology*, 191: 391-431.

Berridge KC, Kringelbach ML (2008). Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology*, 199: 457-480.

Berridge KC, Robinson TE (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev*, 18: 247-291.

Berridge KC, Robinson TE (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience. *Brain Res Rev*, 28: 309-369.

Berridge KC, Robinson TE (2008). The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Phil Trans R Soc B*, 363: 3137-3146.

Bi S, Chen J, Behles RR, Hyun J, Kopin AS, Moran TH (2007). Differential body weight and feeding responses to high-fat diets in rats and mice lacking cholecystokinin 1 receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293: R55-R63.

Billington CJ, Briggs JE, Harker S, Grace M, Levine AS (1994). Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol*, 266: R1765-R1770.

Bisogno T (2008). Endogenous cannabinoids: structure and metabolism. *J Neuroendocrinol*, 20, Suppl 1: 1-9.

Bisogno T, Melck D, De Petrocellis L, Bobrov MY, Gretskaya NM, Bezuglov VV, Sitachitta N, Gerwick WH, Di Marzo V (1998). Arachidonoylserotonin and other novel inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Biochem Biophys Res Commun*, 248: 515-522.

Blevins JE, Schwartz MW, Baskin DG (2004). Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287: R87-R96.

Bodnar RJ, Glass MJ, Ragnauth A, Cooper ML (1995). General, μ and κ opioid antagonists in the nucleus accumbens alter food intake under deprivation, glucoprivic and palatable conditions. *Brain Res*, 700: 205-212.

Boger DL, Patterson JE, Jin Q (1998). Structural requirements for 5-HT_{2A} and 5-HT_{1A} serotonin receptor potentiation by the biological active lipid oleamide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 4102-4107.

Bomberg EM, Grace MK, Wirth MM, Levine AS, Olszewski PK (2007). Central ghrelin induces feeding driven by energy needs not by reward. *Neuroreport*, 18: 591-595.

Borgland SL, Taha SA, Sarti F, Fields HL, Bonci A (2006). Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron*, 49: 589-601.

Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB (2004). Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci*, 24: 2795-2805.

Brenowitz SD, Regehr WG (2005). Associative short-term synaptic plasticity mediated by endocannabinoids. *Neuron*, 45: 419-431.

Brischoux F, Chakraborty S, Brierley DI, Ungless MA (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 4894-4899.

Broberger C (2005). Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med*, 258: 301-327.

Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hökfelt T (1998). Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol*, 402: 460-474.

Broberger C, Visser TJ, Kuhar MJ, Hökfelt T (1999). Neuropeptide Y innervation and neuropeptide-Y-Y1-receptor-expressing neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of the mouse. *Neuroendocrinology*, 70: 295-305.

Brown P, Molliver ME (2000). Dual serotonin (5-HT) projections to the nucleus accumbens core and shell: relation of the 5-HT transporter to amphetamine-induced neurotoxicity. *J Neurosci*, 20: 1952-1963.

Bunzeck N, Düzal Emrah (2006). Absolute coding of stimulus novelty in the human substantia nigra/VTA. *Neuron*, 51: 369-379.

Burdakov D, Alexopoulos H (2005). Metabolic state signaling through central hypocretin/orexin neurons. *J Cell Mol Med*, 9: 795-803.

Burdakov D, Luckman SM, Verkhatsky A (2005). Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Phil Trans R Soc*, 360: 2227-2235.

Burdyga G, Lal S, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ (2004). Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *J Neurosci*, 24: 2708-2715.

Cadas H, Di Tomaso E, Piomelli D (1997). Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, *N*-Arachidonoyl Phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci*, 17: 1226-1242.

Cai XJ, Evans ML, Lister CA, Leslie RA, Arch JRS, Wilson S, Williams G (2001). Hypoglycemia activates orexin neurons and selectively increases hypothalamic orexin-B levels. Responses inhibited by feeding and possibly mediated by the nucleus of the solitary tract. *Diabetes*, 50: 105-112.

Caillé S, Alvarez-Jaimes L, Polis I, Stouffer DG, Parsons LH (2007). Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *J Neurosci*, 27: 3695-3702.

Camus J, Roussy G (1922). Les syndromes hypophysaires. *Rev Neurol*, 38: 622-

639.

Cannon CM, Bseikri MR (2004). Is dopamine required for natural reward? *Physiol Behav*, 81: 741-748.

Cannon W (1932). *The wisdom of the body*. WW Norton & Co. New York.

Carling D (2005). AMP-activated protein kinase: balancing the scales. *Biochimie*, 87: 87-91.

Capasso R, Izzo AA (2008). Gastrointestinal regulation of food intake: general aspects and focus on anandamide and oleoylethanolamide. *J Neuroendocrinol*, 20: Suppl. 1, 39-46.

Carelli RM, Ijames SG, Crumling AJ (2000). Evidence that separate neural circuits in the nucleus accumbens encode cocaine versus "natural" (water and food) reward. *J Neurosci*, 20: 4255-4266

Carelli RM (2004). Nucleus accumbens cell firing and rapid dopamine signaling during goal-directed behavior. *Neuropharmacology*, 47: 180-189.

Chambers AP, Koopmans HS, Pittman QJ, Sharkey KA (2006). AM251 produces sustained reductions in food intake and body weight that are resistant to tolerance and conditioned taste aversion. *Br J Pharmacol*, 147: 109-116.

Chambers AP, Vemury VK, Peng Y, Wood JT, Olszewska T, Pittman QJ, Makriyannis A, Sharkey KA (2007). A neutral CB1 receptor antagonist reduces weight gain in rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293: R2185-R2193.

Charara A, Grace AA (2003). Dopamine receptor subtypes selectively modulate excitatory afferents from the hippocampus and amygdala to rat nucleus accumbens neurons. *Neuropsychopharmacology*, 28: 1412-1421.

Cheer JF, Aragona BJ, Heien MLAV, Seipel AT, Carelli RM, Wightman MR (2007). Coordinated accumbal dopamine release and neural activity drive goal-directed behavior. *Neuron*, 54: 237-244.

Cheer JF, Heien MLAV, Garris PA, Carelli RM, Wightman, RM (2006). Simultaneous dopamine and single-unit recordings reveal accumbens GABAergic responses: implications for intracranial self-stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 19150-19155.

Cheer JF, Wassum KM, Sombors LA, Heien MLAV, Ariensen JL, Aragona BJ, Phillips PEM, Wightman RM (2007). Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation. *J Neurosci*, 27: 791-795.

Cheer JF, Wassum KM, Wightman RM (2006). Cannabinoid modulation of electrically evoked pH and oxygen transients in the nucleus accumbens of awake rats. *J Neurochem*, 97: 1145-1154.

Chemin J, Nargeot J, Lory P (2007). Chemical determinants involved in anandamide-induced inhibition of T-type calcium channels. *J Biol Chem*, 282: 2314-2323.

Chen J, Scott KA, Zhao Z, Moran TH, Bi S (2008). Characterization of the feeding inhibition and neural activation produced by dorsomedial hypothalamic cholecystokinin administration. *Neuroscience*, 152: 178-188.

Chiba T, Murata Y (1985). Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: a WGA-HRP study. *Brain Res Bull*, 14: 261-272.

Childers SR (2006). Activation of G-proteins in brain by endogenous and exogenous cannabinoids. *AAPS J*, 8: E112-E117.

Choi YH, Fletcher PJ, Anderson GH (2001). Extracellular amino acid profiles in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus are influenced by diet composition. *Brain Res*, 892: 320-328.

Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J (2003). Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci*, 23: 10691-10702.

Christie MJ (2006). Opioid and cannabinoid receptors: friends with benefits or just close friends? *Br J Pharmacol*, 148: 385-386.

Christie MJ, James LB, Beart PM (1985). An excitant amino acid projection from the medial prefrontal cortex to the anterior part of nucleus accumbens in the rat. *J Neurochem*, 45: 477-482.

Chronwall BM, Chase TN, O'Donohue TL (1984). Coexistence of neuropeptide Y and somatostatin in rat and human cortical and rat hypothalamic neurons. *Neurosci Lett*. 52: 213-217.

Chronwall BM, DiMaggio DA, Massari VJ, Pickel VM, Ruggiero DA, O'Donohue TL (1985). The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience*, 15: 1159-1181.

Clavier RM, Chambers JW, Coscina DV (1983). Catecholamine histofluorescence in the paraventricular hypothalamus of rats made hyperphagic by parasagittal knife cuts. *Brain Res*, 10: 321-325.

Clifton PG, (2000). Meal patterning in rodents: psychopharmacological and neuroanatomical studies. *Neurosci Biobehav Rev*, 24: 213-222.

Cone RD (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci*, 8: 571-578.

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 ACE, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*, 112: 423-431.

Cottone E, Guastalla A, Pomatto V, Campantico E, Di Marzo V, Franzoni M (2009). Goldfish CB1 mRNA expression is affected by fasting and anandamide administration. *Neuroreport*, 20: 595-599.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411: 480-484.

Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp S, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone R D, Horvath TL (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, 37: 649-661.

Cox JE, Sims JS (1988). Ventromedial hypothalamic and paraventricular nucleus lesions damage a common system to produce hyperphagia. *Behav Brain Res*, 28: 297-308.

Cravatt BF, Prospéro-García O, Siuzdak G, Gilula NB, Henriksen SJ, Boger DL, Lerner RA (1995). Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science*, 268: 1506-1509.

Cross BA, Novin D, Sundsten JW (1969). Antidromic activation of neurones in the paraventricular nucleus by stimulation in the neural lobe of the pituitary. *J Physiol*, 203: 68-70.

Currie PJ, Mirza A, Fuld R, Park D, Vasselli JR (2005). Ghrelin is an orexigenic and metabolic signaling peptide in the arcuate and paraventricular nuclei. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289: R353-R358.

Dahlstrom A, Fuxe K (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand*, Suppl. 232: 1-55.

De Araujo IE, Gutierrez R, Oliveira-Maia AJ, Pereira Jr A, Nicolelis MA, Simon SA (2006). Neural ensemble coding of satiety states. *Neuron*, 51: 483-494.

De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao XB, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg ELF, Gautvik VT, Bartlett II FS, Frankel WN, Van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci*, 95: 322-327.

De Vries TJ, Schoffelmeer ANM (2005). Cannabinoid CB1 receptors control conditioned drug seeking. *TREND Pharmacol Sci*, 26: 420-426.

De Vries TJ, Shaham Y, Homberg JR, Crombag H, Schuurman K, Dieben J, Vanderschuren LJM, Schoffelmeier ANM (2001). A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat Med*, 7: 1151-1154.

DeFalco J, Tomishima M, Liu H, Zhao C, Cai X, Marth JD, Enquist L, Friedman JM (2001). Virus-assisted mapping of neural inputs to a feeding center in the hypothalamus. *Science*, 291: 2608-2613.

Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones GS (1998). Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res*, 806: 127-140.

Deli L, Wittmann G, Kalió I, Lechan RM, Watanabe M, Liposits Z, Fekete C (2009). Type 1 cannabinoid receptor-containing axons innervate hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons. *Endocrinology*, 150: 98-103.

Della-Zuana O, Presse F, Ortola C, Duhault J, Nahon JL, Levens N (2002). Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26: 1289-1295.

Demuth DG, Molleman A (2006). Cannabinoid signaling. *Life Sci*, 78: 549-563.

Després JP, Golay A, Sjöström L (2005). Effects of Rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *New Eng J Med*, 353, 2121-2134.

Devane WA, Axelrod J (1994). Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous ligand for the cannabinoid receptor, by brain membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 6698-6701.

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

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258: 1946-1949.

Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci*, 23: 4850-4857.

Di S, Maxson MM, Franco A, Tasker JG (2009). Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways. *J Neurosci*, 29: 393-401.

Di Chiara G, Imperato A (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 5274-5278.

Di Marzo V, Capasso R, Matias I, Aviello G, Petrosino S, Borrelli F, Romano B, Orlando P, Capasso F, Izzo A (2008). The role of endocannabinoids in the regulation of gastric emptying: alterations in mice fed a high-fat diet. *Br J Pharmacol*, 153: 1272-1280.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372: 686-691.

Di Marzo V, Gobbi G, Szallasi A (2008). Brain TRPV1: a depressing TR(i)P down memory lane? *Trends Pharmacol Sci*, 29: 594-600.

Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járjai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, 410: 822-825.

Diana MA, Bregestovski P (2005). Calcium and endocannabinoids in the modulation of inhibitory synaptic transmission. *Cell Calcium*, 37: 497-505.

Dimitrov EL, DeJoseph MR, Brownfield MS, Urban JH (2007). Involvement of neuropeptide Y Y1 receptors in the regulation of neuroendocrine corticotropin-releasing hormone neuronal activity. *Endocrinology*, 148: 3666-3673.

Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 10819-10824.

Dove-Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA (1998). Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res*, 51: 391-402.

Duarte C, Alonso R, Bichet N, Cohen C, Soubrié P, Thiebot MH (2004). Blockade by the cannabinoid CB1 receptor antagonist, Rimonabant (SR141716), of the potentiation of quinelorane of food-primed reinstatement of food-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology*, 29: 911-920.

Dube MG, Kalra SP, Kalra PS (1999). Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins identification of hypothalamic sites of action. *Brain Res*, 842: 473-477.

Dube MG, Kalra SP, Kalra PS (2006). The hypothalamic paraventricular nucleus is not essential for orexigenic NPY or anorexigenic melanocortin action. *Peptides*, 27: 2239-2248.

Edwards CMB, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR (1999). The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide

Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Neuroendocrinol*, 160: R7-R12.

Eggermann E, Serafin M, Bayer L, Machard D, Saint-Mieux B, Jones BE (2001). Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurons. *Neuroscience*, 108: 177-181.

Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos A, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK (1998). Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*, 402: 442-459.

Elmquist JK, Ahima RS, Maratos-Flier E, Flier JS, Saper CB (1997). Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology*, 138: 839-842.

Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Bátkai S, Pacher, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J (2005). Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes*, 54: 2838-2843.

Epstein AN (1960). Reciprocal changes in feeding behavior produced by intrahypothalamic chemical injections. *Am J Physiol*, 199: 969-974.

Escartín-Pérez RE, Cendejas-Trejo NM, Cruz-Martínez AM, González-Hernández B, Mancilla-Díaz JM, Florán-Garduño B (2009). Role of cannabinoid CB1 receptors on macronutrient selection and satiety in rats. *Physiol Behav*, 96: 646-650.

Fadel J, Deutch AY (2002). Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 111: 379-387.

Fallon JH, Moore RY (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol*, 180: 545-80.

Farley IJ, Hornykiewicz O (1977). Noradrenalina distribution insubcortical areas of the human brain. *Brain Res*, 126: 53-62.

Faure A, Reynolds SM, Richard JM, Berridge KC (2008). Mesolimbic dopamine in desire and dread: enabling motivation to be generated by localized glutamate disruptions in nucleus accumbens. *J Neurosci*, 28: 7184-7192.

Fegley D, Kathuria S, Mercier R, Li C, Goutopoulos A, Makriyannis A, Piomelli D (2004). Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 8756-8761.

Fekete C, Légrádi G, Mihály E, Tatro JB, Rand WM, Lechan RM (2000). α -Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci Lett*, 289: 152-156.

Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, Lechan RM (2002). Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology*, 143: 3846-3853.

Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA (1993). Anandamide, and endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 7656-7660.

Fiorino DF, Coury A, Fibiger HC, Phillips AG (1993). Electrical stimulation of reward sites in the ventral tegmental area increases dopamine transmission in the nucleus accumbens of the rat. *Behav Brain Res*, 55: 131-141.

Flanagan LM, Dohanics J, Verbalis JG, Stricker EM (1992). Gastric motility and food intake in rats after lesions of hypothalamic paraventricular nucleus. *Am J Physiol*, 263: R39-R44.

Fletcher PJ, Sinyard J, Higgins GA (2006). The effects of the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB242084 on locomotor activity induced by selective, or mixed, indirect serotonergic and dopaminergic agonists. *Psychopharmacology*, 187: 515-525.

Fliers E, Alkemade A, Wiersinga WM, Swaab DF (2006). Hypothalamic thyroid hormone feedback in health and disease. *Prog Brain Res*, 153: 189-207.

Floresco SB, Blaha CD, Yang CR, Phillips AG (2001a). Modulation of hippocampal and amygdalar-evoked activity of nucleus accumbens neurons by dopamine: Cellular mechanisms of input selection. *J Neurosci*, 21: 2851-2860.

Floresco SB, Todd CL, Grace AA (2001b). Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurosci*, 21: 4915-4922.

Földy C, Neu A, Jones MV, Soltesz I (2006). Presynaptic, activity-dependent modulation of cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of GABA release. *J Neurosci*, 26: 1465-1469.

French SJ, Totterdell S (2003). Individual nucleus accumbens-projection neurons receive both basolateral amygdala and ventral subicular afferents in rats. *Neuroscience*, 119: 19-31.

Fusco FR, Martorana A, Giampa C, De March Z, Farini D, D'Angelo V, Sancesario G, Bernardi G (2004). Immunolocalization of CB₁ receptor in rat

striatal neurons: A confocal microscopy study. *Synapse*, 53: 159-167.

Gallistel CR (1986). The role of the dopaminergic projections in MFB self-stimulation. *Behav Brain Res*, 20: 313-321.

Gamber KM, Macarthur H, Westfall TC (2005). Cannabinoids augment the release of neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Neuropharmacology*, 49: 646-652.

Gardner A, Mallet PE (2006). Suppression of feeding, drinking, and locomotion by a putative cannabinoid receptor "silent antagonist". *Eur J Pharmacol*, 530: 103-106.

Gautron L, Mingam R, Moranis A, Combe C, Layé S (2005). Influence of feeding status on neuronal activity in the hypothalamus during lipolysaccharide-induced anorexia in rats. *Neuroscience*, 134: 933-946.

Gavrilla A, Chan JL, Miller LC, Heist K, Yiannakouris N, Mantzoros CS (2005). Circulating melanin-concentrating hormone, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone levels in relation to body composition: alterations in response to food deprivation and recombinant human leptin administration. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 1047-1054.

Georgescu D, Sears RM, Hommel JD, Barrot M, Bolaños CA, Marsh DJ, Bednarek MA, Bibb JA, Maratos-Flier E, Nestler EJ, DiLeone RJ (2005). The hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone acts in the nucleus accumbens to modulate feeding behavior and forced-swim performance. *J Neurosci*, 25:2933-2940.

Gerald C, Walker MW, Criscione L, Gustafson EL, Batzl-Hartmann C, Smith KE, Vaysse P, Durkin MM, Laz TM, Linemeyer DL, Schaffhauser AO, Whitebread S, Hofbauer KG, Taber RI, Branchek TA, Weinshank RL (1996). A receptor subtype involved in Neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature*, 382: 168-171.

Gerdeman GL, Partridge JG, Lupica CR, Lovinger DM (2003). It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 26:184-192.

Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM (2002). Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci*, 5: 446-451.

German PW, Fields HL (2007). Rat nucleus accumbens neurons persistently encode locations associated with morphine reward. *J Neurophysiol*, 97: 2094-2106.

Gessa GL, Orrú A, Lai P, Maccioni P, Lecca R, Lobina C, Carai MAM, Colombo G (2006). Lack of tolerance to the suppressing effect of Rimonabant on chocolate intake in rats. *Psychopharmacology*, 185: 248-254.

Giogetti M, Tecott LH (2004). Contributions of 5-HT_{2C} receptors to multiple actions of central serotonin systems. *Eur J Pharmacol*, 488: 1-9.

Giraudo SQ, Billington CJ, Levine AS (1998). Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands. *Brain Res*, 809: 302-306.

Gold RM, Jones AP, Sawchenko PE, Kapatos G (1977). Paraventricular area: critical focus of a longitudinal neurocircuitry mediating food intake. *Physiol Behav*, 18: 1111-1119.

Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S (1998). Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS letters*, 422: 69-73.

Goto Y, O'Donnell P (2001). Network synchrony in the nucleus accumbens in vivo. *J Neurosci*, 21: 4496-4504.

Goto Y, Grace AA (2005). Dopaminergic modulation of limbic and cortical drive of nucleus accumbens in goal-directed behavior. *Nat Neurosci*, 8: 805-812.

Goto Y, Grace AA (2008). Limbic and cortical processing in the nucleus accumbens. *Trends Neurosci*, 31: 552-558.

Guan JL, Uehara K, Lu S, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Yanagizawa M, Shioda S (2002). Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26: 1523-1532.

Guesdon B, Paradis E, Samson P, Richard D (2009). Effects of intracerebroventricular and intra-accumbens melanin-concentrating hormone agonism on food intake and energy expenditure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296: R469-R475.

Glaser ST, Kaczocha M, Deutsch DG (2005). Anandamide transport: A critical review. *Life Sci*, 77: 1584-1604.

Gómez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo JM, 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. *J Neurosci*, 22: 9612-9617.

Gooley JJ, Schomer A, Saper CB (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nature Neurosci* 9: 398-407.

Gratton A, Hoffer BJ, Gerhardt GA (1988). Effects of electrical stimulation of brain reward sites on release of dopamine in rat: an in vivo electrochemical study. *Brain Res Bull*, 21: 319-324.

Grill HJ, Norgren R (1978). The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res*, 143: 263-279.

Groenewegen HJ, Russchen FT (1984). Organization of the efferent projections of the nucleus accumbens to pallidal, hypothalamic, and mesencephalic structures: a tracing and immunohistochemistry study in the cat. *J Comp Neurol*, 223: 347-367.

Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV, Voorn P (1999). Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann N Y Acad Sci*, 877: 49-63.

Gross CG (1998). Claude Bernard and the constancy of the internal environment. *The Neuroscientist*, 4: 380-385.

Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DNC, Smith ML, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 10911-10916.

Haglund L, Köhler C, Ross SV, Kelder D (1979). Forebrain projections of the ventral tegmentum as studied by axonal transport of [³H] dopamine in the rat. *Neurosci Lett*, 12: 301-306.

Haj-Dahmane S, Shen RY (2005). The wake-promoting peptide orexin-B inhibits glutamatergic transmission to dorsal raphe nucleus serotonin neurons through retrograde endocannabinoid signaling. *J Neurosci*, 25: 896-905.

Hajnal A, Székely M, Gálosi R, Lénard L (2000). Accumbens cholinergic interneurons play a role in the regulation of body weight and metabolism. *Physiol Behav*, 70: 95-103.

Hamson AJ, Bornheim LM, Scanziani M, Yost CS, Gray AT, Hansen BM, Leonoudakis DJ, Bickler PE (1998). Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J Neurochem*, 70: 671-676.

Hanlon EC, Baldo BA, Sadeghian K, Kelley AE (2004). Increases in food intake or food seeking behavior induced by GABAergic, opioid, or dopaminergic stimulation of the nucleus accumbens: is it hunger? *Psychopharmacology*, 172: 241-247.

Hao S, Avraham Y, Mechoulam R, Berry EM (2000). Low dose of anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *Eur J Pharmacol*, 392: 147-156.

Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and

obesity. *Neuron*, 30: 345-354.

Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G (2005). A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature*, 437: 556-559.

Harrold JA, Elliott JC, King PJ, Widdowson PS, Williams G (2002). Down-regulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? *Bran Res*, 952: 232-238.

Harthoorn LF, Sañé A, Nethe M, Van Heerikhuize JJ (2005). Multi-transcriptional profiling of melanin-concentrating hormone and orexin-containing neurons. *Cell Mol Neurobiol*, 25: 1209-1223.

Hayashi A, Suzuki M, Sasamata M, Miyata K (2005). Agonist diversity in 5-HT_{2C} receptor-mediated weight control in rats. *Psychopharmacology*, 178: 241-249.

Hayes DJ, Clements R, Greenshaw AJ (2009). Effects of systemic and intra-nucleus accumbens 5-HT (2C) receptor compounds on ventral tegmental area self-stimulation thresholds in rats. *Psychopharmacology*, 203: 579-588.

Hayward MD, Schaich-Borg A, Pintar JE, Low MJ (2006). Differential involvement of endogenous opioids in sucrose consumption and food reinforcement. *Pharmacol Biochem Behav*, 85: 601-611.

Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Hauger RL, Koob GF (1993). Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res*, 611: 18-24.

Hentges ST (2007). Synaptic regulation of proopiomelanocortin neurons can occur distal to the arcuate nucleus. *J Neurophysiol*, 97: 3298-3304.

Hentges ST, Low MJ, Williams JT (2005). Differential regulation of synaptic inputs by constitutively released endocannabinoids and exogenous cannabinoids. *J Neurosci*, 25: 9746-9751.

Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, De Costa BR, Rice KC (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 1932-1936.

Hermann H, Marsicano G, Lutz B (2002). Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience* 109: 451-460.

Herzog H (2003). Neuropeptide Y and energy homeostasis: insights from Y receptor knockout models. *Eur J Pharmacol*, 480: 21-29.

Hetherington AW, Ranson SW (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec*, 78: 149.

Hetherington AW, Ranson SW (1942). The spontaneous activity and food intake of rats with hypothalamic lesions. *Am J Physiol*, 609-617.

Hiiggs S, Williams CM, Kirkham TC (2003). Cannabinoid influences on palatability: microstructural analysis of sucrose drinking after delta(9)-tetrahydrocannabinol, anandamide, 2-arachidonoyl glycerol and SR141716. *Psychopharmacology*, 165: 370-377.

Hillard CJ, Jarrahian A (2003). Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. *Br J Pharmacol*, 140: 802-808.

Hillebrand JJG, De Wied D, Adan RAH (2002). Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides*, 23: 2283-2306.

Hjelmstad GO (2004). Dopamine excites nucleus accumbens neurons through the differential modulation of glutamate and GABA release. *J Neurosci*, 24: 8621-8628.

Hnasco TS, Sotak BN, Palmiter RD (2005). Morphine reward in dopamine-deficient mice. *Nature*, 438: 854-857.

Ho J, Cox JM, Wagner EJ (2007). Cannabinoid-induced hyperphagia: correlation with inhibition of proopiomelanocortin neurons? *Physiol Behav*, 92: 507-519.

Hodge J, Bow JP, Plyler KS, Vemuri VK, Wisniecki A, Salamone JD, Makriyannis A, McLaughlin PJ (2008). The cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM251 and antagonist AM4113 produce similar effects on the behavioral satiety sequence in rats. *Behav Brain Res*, 193: 298-305.

Hoffman AF, Lupica CR (2000). Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: a comparison with opioids. *J Neurophysiol*, 85: 72-83.

Horswill JG, Bali U, Shaaban S, Keily JF, Jeevaratnam P, Babbs AJ, Reynet C, Wong Kai In P (2007). PSNCBAM-1, a novel allosteric antagonist at cannabinoid CB1 receptors with hypophagic effect in rats. *Br J Pharmacol*, 152: 805-814.

Howlett AC, Fleming RM (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol*, 26: 532-538.

Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL (1986). Involvement of G_i in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol*, 29: 307-313.

Huang H, Acuna-Goycolea C, Li Y, Cheng HM, Obrietan K, van den Pol AN (2007). Cannabinoids excite hypothalamic melanin-concentrating hormone but inhibit hypocretin/orexin neurons: implications for cannabinoid actions on food

intake and cognitive arousal. *J Neurosci*, 27: 4870-4881.

Huang Q, Rivest R, Richard D (1998). Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (ob/ob) mice. *Endocrinology*, 139: 1524-1532.

Huidobro-Toro JP, Harris RA (1996). Brain lipids that induce sleep are novel modulators of 5-hydroxytryptamine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 8078-8082.

Ikemoto S, Panksepp J (1999). The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res Rev*, 31: 6-41.

Jamshidi N, Taylor DA (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol*, 134: 1151-1154.

Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Péleraux A, Pénarier G, Soubrié P, Le Fur G, Galiéque S, Casellas P (2005). The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J*, 19: 1567-1569.

Jean A, Conductier G, Manrique C, Bouras C, Berta P, Hen R, Charnay Y, Bockaert J, Compan V (2007). Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT4 receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 16335-16340.

Jhanwar-Uniyal M, Beck B, Jhanwar YS, Burlet C, Leibowitz SF (1993). Neuropeptide Y projection from arcuate nucleus to parvocellular division of paraventricular nucleus: specific relation to the ingestion of carbohydrate. *Brain Res*, 631: 97-106.

Jo YH, Chen YJJ, Chua Jr SC, Talmage DA, Role LW (2005). Integration of endocannabinoid and leptin signaling in appetite-related neural circuit. *Neuron*, 48: 1055-1066.

Jobst EE, Enriori PJ, Cowley MA (2004). The electrophysiology of feeding circuits. *Trends Endocrinol Metab*, 15: 488-499.

Johnson P, Parente MA, Stellar JR (1996). NMDA-induced lesions of the nucleus accumbens or the ventral pallidum increase the rewarding efficacy of food to deprived rats. *Brain Res*, 722: 109-177.

Juan-Picó P, Fuentes E, Bermúdez-Silva FJ, Díaz-Molina J, Ripoli C, Rodríguez de Fonseca F, Nadal A (2006). Cannabinoid receptors regulate Ca²⁺ signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium*, 39: 155-162.

Kaczocha M, Hermann A, Glaser ST, Bojesen IN, Deutsch DG (2006). Anandamide uptake is consistent with rate-limited diffusion and is regulated by

the degree of its hydrolysis by fatty acid amide hydrolase. *J Biol Chem*, 281: 9066-9075.

Kalivas PW, Churchill L, Klitenick MA (1993). GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 57: 1047-1060.

Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 10931-10935.

Kandov Y, Israel Y, Kest A, Dostova I, Versammy J, Bernal SY, Kasselmann L, Bodnar RJ (2006). GABA receptor subtype antagonists in the nucleus accumbens shell and ventral tegmental area differentially alter feeding responses induced by deprivation, glucoprivation and lipoprivation in rats. *Brain Res*, 1082: 86-97.

Karteris E, Machado RJ, Chen J, Zervou S, Hillhouse EW, Randevara HS (2005). Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signaling in rat hypothalamus and adrenal cortex. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288: E1089-E1100.

Karydis I, Tolis G (1998). Orexis, anorexia, and thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid*, 8: 947-950.

Kas MJ, Tiesjema B, van Dijk G, Garner KM, Barsh GS, ter Brake O, Verhaagen J, Adan RA (2004). Induction of brain-region-specific forms of obesity by agouti. *J Neurosci*, 24: 10176-10181.

Katona I, Rancz EA, Acsády L, Ledent C, Mackie K, Hájos N, Freund TF (2001). Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci*, 21: 9506-9518.

Katona I, Urbán GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF (2006). Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 26: 5628-5637.

Kawaguchi M, Scott KA, Moran TH, Bi S (2005). Dorsomedial hypothalamic corticotropin-releasing factor mediation of exercise-induced anorexia. 288: R1800-R1805.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*, 18: 527-535.

Keene JJ (1976). Prolonged medial forebrain bundle unit responses to rewarding aversive intracranial stimuli. *Brain Res Bull*, 1: 517-522.

Kelley AE (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev*, 27:

765-776.

Kelley AE, Bakshi VP, Fleming S, Holahan MR (2000). A pharmacological analysis of the substrates underlying conditioned feeding induced by repeated opioid stimulation of the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*, 23: 455-467.

Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ (2005). Corticostriatal–hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav*, 86: 773-795.

Kelley AE, Bless EP, Swanson CD (1996). Investigation of the effects of opiate antagonists infused into the nucleus accumbens on feeding and sucrose drinking in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 278: 1499-1507.

Kelley AE, Swanson CJ (1997). Feeding induced by blockade of AMPA and kainite receptors within the ventral striatum: a microinfusion mapping study. *Behav Brain Res*, 89: 107-113.

Kennedy GC (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 470: 578–596.

Kim KW, Jo YH, Zhao L, Stallings NR, Chua Jr. SC, Parker KL (2008). Steroidogenic factor 1 regulates expression of the cannabinoid receptor 1 in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol*, 22: 1950-1961.

Kim MS, Rossi M, Abusnana S, Sunter D, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Heath MM, Stanley SA, Seal LJ, Bhatti JR, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR (2000). Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes*, 49: 177-182.

Kirchgessner AL, Sclafani A (1988). PVN-hindbrain pathway involved in the hypothalamic hyperphagia-obesity syndrome. *Physiol Behav*, 42: 517-528.

Kirkham TC, Williams CM (2001). Synergistic effects of opioid and cannabinoid antagonist on food intake. *Psychopharmacology*, 153: 267-270.

Kirkham TC, Williams CM, 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. *Br J Pharmacol*, 136: 550-557.

Kita H, Oomura Y (1982). An HRP study of the afferent connections to rat medial hypothalamic region. *Brain Res Bull*, 8: 53-62.

Kobelt P, Wisser AS, Stengel A, Goebel M, Inhoff T, Noetzel S, Veh RW, Bannert N, van der Voort I, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H (2008). Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. *Brain Res*, 1204: 77-86.

Koch JE, Glass MJ, Cooper ML, Bodnar RJ (1995). Alteration in deprivation, glucoprivic and sucrose intake following general, mu and kappa opioid antagonists in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats. *Neuroscience*, 66: 951-957.

Koizumi K, Yamashita H (1972). Studies of antidromically identified neurosecretory cells of the hypothalamus by intracellular and extracellular recordings. *J Physiol*, 221: 683-705.

Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, Wittmann G, Lolli F, Amin F, Harvey-White J, Liposits Z, Kunos G, Grossman AB, Fekete C, Korbonits M (2008). The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLOS One*, 3: 1-8.

Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE, Williams LM, Hawley SA, Grahame-Hardie D, Grossman AB, Korbonits M (2005). Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 280: 25196-25201.

Koob GF, Balcom GJ, Meyerhoff JL (1975). Dopamine and norepinephrine levels in the nucleus accumbens, olfactory tubercle and corpus striatum following lesions in the ventral tegmental area. *Brain Res*, 94, 45-55.

Korotkova TM, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE (2003). Excitation of ventral tegmental are dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J Neurosci*, 23: 7-11.

Kotz CM, Wang CF, Briggs JE, Levine AS, Billington CJ (2000). Effect of NPY in the hypothalamic paraventricular nucleus on uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 278: R494-R498.

Kowalski TJ, Spar BD, Welg B, Farley C, Cook J, Ghibaudi L, Fried S, O'Neill K, Del Vecchio RA, McBriar M, Guzik H, Clader J, Hawes BE, Hwa J (2006). Effects of a selective melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonist on food intake and energy homeostasis in diet-induced obese mice. *Br J Pharmacol*, 535: 182-191.

Kunos G, (2007). Understanding metabolic homeostasis and imbalance: what is the role of the endocannabinoid system? *Am J Med*, 120: S18-S24.

Kreitzer AC, Malenka RC (2005). Dopamine modulation of state-dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum. *J Neurosci*, 25: 10573-10545.

Kreitzer AC, Regehr WG (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous ccannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, 29: 717-727.

Lanca AJ, de Cabo C, Arifuzzaman AI, Vaccarino FJ (1998). Cholecystokinergic

innervation of nucleus accumbens subregions. *Peptides*, 19: 859-868.

Landry GJ, Yamakawa GR, Webb IC, Mear RJ, Mistlberger RE (2007). The dorsomedial hypothalamic nucleus is not necessary for the expression of circadian food-anticipatory activity in rats. *J Biol Rhythms*, 22: 467-478.

Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, Luckman SM (2002). Acute central ghrelin and GH secretagogues induces feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology*, 143: 155-162.

Lecourtier L, Kelly PH (2007). A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neurosci Biobehav Rev*, 31: 658-672.

Lees G, Edwards MD, Hassoni AA, Ganellin CR, Galanakis D (1998). Modulation of GABA_A receptors and inhibitory synaptic currents by the endogenous CNS sleep regulator *cis*-9,10-octadecenoamide (cOA). *Br J Pharmacol*, 124: 873-882.

Lechan RM, Fekete C (2006). The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res*, 153: 209-235.

Leibowitz SF, Hammer NJ, Chang K (1981). Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol Behav*, 27:1031-1040.

Leknes S, Tracey I (2008). A common neurobiology for pain and pleasure. *Nat Rev Neurosci*, 9: 314-320.

Li C, Chen P, Smith MS (2000). Corticotropin releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus are direct targets for neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus: an anterograde tracing study. *Brain Res*, 854: 122-129.

Lichtenstein SS, Marinescu C, Leibowitz SF (1984). Chronic infusion of norepinephrine and clonidine into the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res Bull*, 13: 591-595.

Lichtman AH, Hawkins EG, Griffin G, Cravatt BF (2002). Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J Pharm Exp Ther*, 302: 73-79.

Lisman JE, Grace AA (2005). The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*, 46: 703-713.

Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HY, Kunos G (2006). A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 13345-13350.

Luiten PG, Room P (1980). Interrelation between lateral, dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei in the rat. An HRP study. *Brain Res*, 190:

321-332.

Lupica CR, Riegel AC, Hoffman AF (2004). Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. *Br J Pharmacol*, 143: 227-234.

Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science*, 310: 683-685.

Lutz B (2009). Endocannabinoid signals in the control of emotion. *Curr Opin Pharmacol*, 9: 46-52.

MacDonald AF, Billington CJ, Levine AS (2003). Effects of the opioid antagonist naltrexone on feeding induced by DAMGO in the ventral tegmental area and in the nucleus accumbens shell region in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285: R999-R1004.

Mallieux P, Vanderhaeghen JJ (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and *in situ* hybridization histochemistry. *Neuroscience*, 48: 655-668.

Mackie K (2008). Cannabinoid receptors: Where they are and what they do. *Br J Pharmacol*, 20. Suppl 1: 10-14.

Maejima T, Hashimoto K, Yoshida T, Alba A, Kano M (2001). Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron*, 31: 463-475.

Maejima T, Ohno-Shosaku T, Kano M (2001). Endogenous cannabinoids as a retrograde messenger from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neurosci Res*, 40: 205-210.

Mahler SV, Smith KS, Berridge KC (2007). Endocannabinoid hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances "liking" of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology*, 32: 2267-2278.

Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacák K, Palkovits M, Gold PW (1995). Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology*, 136: 4517-4525.

Malcher-López R, Di S, Marcheselli VS, Weng FJ, Stuart CT, Bazan NG, Tasker JG (2006). Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *J Neurosci*, 26: 6643-6650.

Manzoni O, Bockaert J (2001). Cannabinoids inhibit GABAergic synaptic transmission in mice nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol*, 412: R3-R5.

Markowska A, Bakke HK, Walther B, Ursin H (1985). Comparison of electrolytic

and ibotenic acid lesions in the lateral hypothalamus. *Brain Res*, 328: 313-323.

Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, van der Ploeg LH, Qian S (2002). Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 3240-3245.

Marsden CA (2006). Dopamine: the rewarding years. *Br J Pharmacol*, 147: S136-S144.

Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutiérrez SO, van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Nature*, 302: 84-88.

Marsicano G, Lutz B (1999). Expression of the cannabinoid receptor 1 CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci*, 11: 4213-4225.

Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002). The endogenous cannabinoids system controls extinction of aversive memories. *Nature*, 18: 530-534.

Martel P, Fantino M (1996). Influence of the amount of food ingested on mesolimbic dopaminergic system activity: a microdialysis study. *Pharmacol Biochem Beba*, 55: 297-302.

Martín AB, Fernandez-Espejo E, Ferrer B, Gorriti MA, Bilbao A, Navarro M, Rodríguez de Fonseca, Moratalla R (2008). Expression and function of CB1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2 dopamine receptor-mediated motor behaviors. *Neuropsychopharmacology*, 33: 1667-1679.

Martínez-González D, Bonilla-Jaime H, Morales-Otal, Henriksen SJ, Velázquez-Moctezuma J, Prospéro-García O (2004). Oleamide and anandamide effects on food intake and sexual behavior of rats. *Neurosci Lett*, 364: 1-6.

Masaki T, Yoshimichi G, Chiba S, Yasuda T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H (2003). Corticotropin-releasing hormone-mediated pathway of leptin to regulate feeding, adiposity, and uncoupling protein expression in mice. *Endocrinology*, 144: 3547-3554.

Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V (2006). Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in

obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 3171-3180.

Matias I, Petrosino S, Racioppi A, Capasso R, Izzo A, Di Marzo V (2008). Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: Effect of high fat diets. *Mol Cell Endocrinol*, 286: S66-S78.

Matthews G (1977). Neural substrate for brain stimulation reward in the rat: cathodal and anodal strength-duration properties. *J Comp Physiol Psychol*, 91: 858-874.

Mátyás F, Watanabe M, Mackie K, Katona I, Freund TF (2007). Molecular architecture of the cannabinoid signaling system in the core of the nucleus accumbens. *Ideggyogy Sz*, 60: 187-191.

Mátyás F, Urbán GM, Watanabe M, Mackie K, Zimmer A, Freund TF, Katona I (2008). Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology*, 54: 95-107.

Mayer J (1953). Genetic, traumatic and environmental factors in the etiology of obesity. *Physiol Rev*, 33: 472.

Mayer J, Thomas DW (1967). Regulation of food intake and obesity. *Science*, 156: 328-337.

Mcallister SD, Griffin G, Satin LS, Abood ME (1999). Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a *xenopus* oocyte expression system. *J Pharmacol Exp Ther*, 291: 618-626.

McDonald AJ, Mascagni F (2001). Localization of the CB1 type cannabinoid receptor in the rat basolateral amygdala: high concentrations in a subpopulation of cholecystokinin-containing interneurons. *Neuroscience*, 107: 641-652.

McKinney MK, Cravatt BF (2005). Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem*, 74: 411-432.

McLean S, Hoebel BG (1983). Feeding induced by opiates injected into the paraventricular hypothalamus. *Peptides*, 4: 287-292.

McMahon LR, Filip M, Cunningham KA (2001). Differential regulation of the mesoaccumbens circuit by serotonin 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *J Neurosci*, 21: 7781-7787.

Mechoulam R (1970). Marijuana chemistry. *Science*, 168: 1159-1166.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995). Identification of an endogenous 2-mono-glyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*,

50: 83-90.

Meister B, Gömüc B, Suarez E, Ishii Y, Dürr K, Gillberg L (2006). Hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) neurons have a cholinergic phenotype. *Eur J Neurosci*, 24: 2731-2740.

Melis MR, Mascia MS, Succu S, Torsello A, Muller EE, Deghenghi R, Argiolas A (2002). Ghrelin injected into the paraventricular nucleus of the hypothalamus of males rats induces feeding but not penile erection. *Neurosci Lett*, 329: 339-343.

Melis T, Succu S, Sanna F, Boi A, Argiolas A, Melis MR (2007). The cannabinoid antagonist SR 141716A (Rimonabant) reduces the increase of extra-cellular dopamine release in the rat nucleus accumbens induced by a novel high palatable food. *Neurosci Lett*, 419: 231-235.

Mendez-Andino JL, Wos JA (2007). MCH-R1 antagonists: what is keeping most research programs away from the clinic? *Drug Discov Today*, 12: 972-979.

Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL (1998). An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature*, 395: 381-383.

Meredith GE (1999). The synaptic framework for chemical signalling in nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci*, 877:140-156.

Meredith GE, Blank B, Groenewegen HJ (1989). The distribution and compartmental organization of the cholinergic neurons in nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience*, 31:327-345.

Meredith GE, Pattiselanno A, Groenewegen HJ, Haber SN (1996). Shell and core in monkey and human nucleus accumbens identified with antibodies to calbindin-D28k. *J Comp Neurol*, 365: 628-639.

Meredith GE, Wouterlood FG, Pattiselanno A (1990). Hippocampal fibers make synaptic contacts with glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons in the rat nucleus accumbens. *Brain Res*, 513, 329-334.

Mieda M, Williams SC, Richardson JA, Tanaka K, Yanagisawa M (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 12150-12155.

Mihály E, Fekete C, Lechan RM, Liposits Z (2002). Corticotropin-releasing hormone-synthesizing neurons of the human hypothalamus receive neuropeptide Y-immunoreactive innervation from neurons residing primarily outside the infundibular nucleus. *J Comp Neurol*, 446: 235-243.

Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM (2005). Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron*, 46: 787-798.

Miner P, Abayev Y, Kandova E, Gerges M, Styler E, Wapniak R, Touzani K, Sciafani A, Bodnar RJ (2008). Role of systemic endocannabinoid CB-1 receptor

antagonism in the acquisition and expression of fructose-conditioned flavor-flavor preferences in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 90: 318-324.

Mitome M, Honma S, Yoshihara T, Honma K (1994). Prefeeding increase in paraventricular NE release is regulated by a feeding-associated rhythm in rats. *Am J Physiol*, 266: E606-E611.

Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980). From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol*, 14: 69-97.

Mogenson GJ, Swanson LW, Wu M (1983). Neural projections from nucleus accumbens to globus pallidus, substantia innominata, and lateral preoptic-lateral hypothalamic area: an anatomical and electrophysiological investigation in the rat. *J Neurosci*, 3: 189-202.

Monory K, Massa F, Egertová M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker M, Long J, Rubenstein JL, Goebbels S, Nave KA, Doring M, Klugmann M, Wölfel B, Dodt HU, Zieglgänsberger W, Wotjak CT, Mackie K, Elphick MR, Marsicano G, Lutz B (2006). The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*, 51: 455-466.

Moore RY, Halaris AE, Jones BE (1978). Serotonin neurons of the midbrain raphe: Ascending projections. *J Comp Neurol*, 180: 417-438.

Moore SA, Nomikos GG, Dickason-Chesterfield AK, Schober DA, Schaus JM, Ying BP, Xu YC, Phebus L, Simmons RMA, Li D, Lyengar S, Felder CC (2005). Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 17852-17857.

Morens C, Norregaard P, Receveur JM, van Dijk G, Scheurink AJ (2005). Effects of MCH and MCH1-receptor antagonis on (palatable) food and water intake. *Brain Res*, 1062: 32-38.

Morikawa Y, Ueyama E, Senba E (2004). Fasting-induced activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/p38) in the mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, 16: 105-112.

Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443: 289-295.

Mulder AB, Hodenpijl MG, Lopez da Silva FH (1998). Electrophysiology of the hippocampal and amigdaloid projections to the nucleus accumbens of the rat: Convergence, segregation, and interaction of inputs. *J Neurosci*, 18: 5095-5102.

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

Murai Y, Akaike T (2005). Orexins cause depolarization via nonselective cationic and K⁺ channels in isolated locus coeruleus neurons. *Neurosci Res*, 51: 55-65.

Muroya S, Funahashi H, Yamanaka A, Kohno D, Uramura K, Nambu T, Shibahara M, Kuramochi M, Takigawa M, Yanagisawa M, Sakurai T, Shioda S, Yada T (2004). Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC, and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur J Neurosci*, 19: 1524-1534.

Murray B, Shizgal P (1996). Attenuation of medial forebrain bundle reward by anterior lateral hypothalamic lesions. *Behav Brain Res*, 75: 33-47.

Nair SG, Golden SA, Shaham Y (2008). Differential effects of the hypocretin 1 receptor antagonist SB 334867 on high-fat food self-administration and reinstatement of food seeking in rats. *Br J Pharmacol*, 154: 406-416.

Nahon JL (2006). The melanocortins and melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *C R Biol*, 329: 623-638.

Nakano K, Kayahara T, Chiba T (1999). Afferent connections to the ventral striatum from the medial prefrontal cortex (area 25) and the thalamic nuclei in the macaque monkey. *Ann N Y Acad Sci*, 877: 667-670.

Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res*, 827:

Narushima M, Hashimoto K, Kano M (2006). Endocannabinoid-mediated short-term suppression of excitatory synaptic transmission to medium spiny neurons in the striatum. *Neurosci Res*, 54: 159-164.

Narushima M, Uchigashima M, Hashimoto K, Watanabe M, Kano M (2006). Depolarization-induced suppression of inhibition mediated by endocannabinoids at synapses from fast-spiking interneurons to medium spiny neurons in the striatum. *Eur J Neurosci*, 24: 2246-2252.

Nauta WJ, Smith GP, Faull RL, Domesick VB (1978). Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience*, 3: 385-401.

Nestler EJ (2005). Is there a common molecular pathway for addiction? *Nature*, 8: 1445-1449.

Nilni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjorbak C, Flier JS (2000). Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J Biol Chem*, 275: 36124-36133.

Nowend KL, Arizzi M, Carlson BB, Salamone JD (2001). D1 or D2 antagonism

in nucleus accumbens core or dorsomedial shell suppresses lever pressing for food but leads to compensatory increases in chow consumption. *Pharm Biochem Behav*, 69: 373-382.

Nyilas R, Dudok B, Urbán GM, Mackie K, Watanabe M, Cravatt BF, Freund TF, Katona I (2008). Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. *J Neurosci*, 28: 1058-1063.

Nyíri G, Cserép C, Szabadits E, Mackie K, Freund TF (2005). CB1 cannabinoid receptors are enriched in the presynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience*, 136: 811-822.

O'Donnell P, Grace AA (1993). Physiological and morphological properties of accumbens core and shell neurons recorded in vitro. *Synapse*, 13: 135-160.

O'Donnell P, Grace AA (1995). Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *J Neurosci*, 15: 3622-3639.

O'Donnell P, Grace AA (1996). Dopaminergic reduction of excitability in nucleus accumbens neurons recorded in vitro. *Neuropsychopharmacology*, 15: 87-97.

O'Donnell P, Greene J, Pabello N, Lewis BL, Grace AA (1999). Modulation of cell firing in the nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci*, 877: 157-175.

Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*, 29: 729-738.

Olds J (1958). Self-stimulation of the brain. *Science*, 127: 315-324.

Olds ME, Olds J (1969). Effects of lesions in medial forebrain bundle on self-stimulation behavior. *Am J Physiol*, 217: 1253-1264.

Olds J, Milner P (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*, 47: 419-427.

Olszewski PK, Levine AS (2007). Central opioids and consumption of sweet tastants: when reward outweighs homeostasis, 91: 506-512.

Ortar G, Ligresti A, De Petrocellis L, Morera E, Di Marzo V (2003). Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake. *Biochem Pharmacol*, 65: 1473-1481.

Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Harvey-White J, Bannon AW, Cravatt BF, Kuhar MJ, Mackie K, Palkovits M, Kunos G (2005). Cocaine- and amphetamine-related transcript is involved in the orexigenic effect of endogenous anandamide. *Neuroendocrinology*, 81: 273-282.

Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*, 115: 1298-1305.

Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, Bátkai S, Marsicano G, Lutz B, Buettner C, Kunos G (2008). Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest*, 118: 3160-3169.

Owesson-White CA, Cheer JF, Beyene M, Carelli RM, Wightman RM (2008). Dynamic changes in accumbens dopamine correlate with learning during intracranial self-stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 11957-11962.

Paez X, Stanley BG, Leibowitz SF (1993). Microdialysis analysis of norepinephrine levels in the paraventricular nucleus in association with food intake at dark onset. *Brain Res*, 606: 167-170.

Pagotto U, Pasquali R (2005). Fighting obesity and associated risk factors by antagonizing cannabinoid type 1 receptors. *The Lancet*, 365: 1363-1364.

Pasquier DA, Kemper TL, Forbes WB, Morgane PJ (1977). Dorsal raphe, substantia nigra and locus coeruleus: interconnections with each other and the neostriatum. *Brain Res Bull*, 2: 323-339.

Patel S, Cravatt BF, Hillard CJ (2005). Synergistic interactions between cannabinoids and environmental stress in the activation of the central amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 30: 497-507.

Peciña S (2008). Opioid reward “liking” and “wanting” in the nucleus accumbens. *Physiol Behav*, 94: 675-680.

Peciña S, Berridge KC (2005). Hedonic hotspot in nucleus accumbens shell: where do μ -opioids cause increased hedonic impact of sweetness? *J Neurosci*, 25: 11777-11786.

Peciña S, Schulkin J, Berridge KC (2006). Nucleus accumbens corticotropin-releasing factor increases cue-triggered motivation for sucrose reward: paradoxical positive incentive effects in stress? *BMC Biol*, 13: 4-8.

Peciña S, Smith KS, Berridge KC (2006). Hedonic hot spots in the brain. *The Neuroscientist*, 12: 500-511.

Pelletier G (1990). Ultrastructural localization of neuropeptide Y in the hypothalamus. *Ann N Y Acad Sci*, 611: 232-246.

Pennartz CMA, Groenewegen HJ, Lopez da Silva FH (1994). The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Prog Neurobiol*, 42: 719-761.

Pereira da Silva M, Torsoni MA, Nourani HV, Augusto VD, Souza CT, Gasparetti AL, Carvalheira JB, Ventrucci G, Marcondes MC, Cruz-Neto AP, Saad MJ, Boschero AC, Carneiro EM, Velloso LA (2003). Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology*, 144: 4831-4840.

Peyron C, Tigre DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*, 18: 9996-10015.

Phillips PEM, Stuber GD, Heien MLAV, Wightman RM, Carelli RM (2003). Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature*, 422: 614-618.

Pich EM, Pagliusi SR, Tessari M, Talabot-Ayer D, Hooft van Huijsduijnen R, Chiamulera C (1997). Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. *Science*, 275: 83-86.

Pickel VM, Chan J, Kash TL, Rodríguez JJ, Mackie K (2004). Compartment-specific localization of cannabinoid 1 (CB1) and mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens. *Neuroscience*, 127: 101-112.

Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science*, 304: 110-115.

Piomelli D (2003). The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci*, 4: 873-884.

Pistis M, Muntoni AL, Pillolla G, Gessa GL (2002). Cannabinoids inhibit excitatory inputs to neurons in the shell of the nucleus accumbens: an *in vivo* electrophysiological study. *Eur J Neurosci*, 15: 1795-1802.

Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (1995). Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 12304-12308.

Portillo F, Carrasco M, Vallo JJ (1996). Hypothalamic neuron projection to autonomic preganglionic levels related with glucose metabolism: a fluorescent labeling study in the rat. *Neurosci Lett*, 210: 197-200.

Powell EW, Leman RB (1976). Connections of the nucleus accumbens. *Brain Res*, 105: 389-403.

Powis JE, Bains JS, Ferguson AV (1998). Leptin depolarizes rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *Am J Physiol*, 274: R1468-R1472.

Pratt WE, Blackstone K (2009). Nucleus accumbens acetylcholine and food intake: decreases muscarinic tone reduces food intake but not food seeking. *Behav Brain Res*, 198: 252-257.

Pratt WE, Kelley AE (2004). Nucleus accumbens acetylcholine regulates appetitive learning and motivation for food via activation of muscarinic receptors. *Behav Neurosci*, 118: 730-739.

Prensa L, Richard S, Parent A (2003). Chemical anatomy of the human ventral striatum and adjacent basal forebrain structures. *J Comp Neurol*, 460: 345-367.

Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380: 243-247.

Ragnauth A, Znamensky V, Moroz M, Bodnar RJ (2000). Analysis of dopamine receptor antagonism upon feeding elicited by mu and delta opioid agonist in the shell region of the nucleus accumbens. *Brain Res*, 877: 65-72.

Ramírez-Lugo L, Zavala-Vega S, Bermúdez-Rattoni F (2006). NMDA and muscarinic receptors of the nucleus accumbens have differential effects on taste memory formation. *Learn Mem*, 13: 45-51.

Rao Y, Lu M, Ge F, Marsh DJ, Qian S, Wang AH, Picciotto MR, Gao XB (2008). Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin-concentrating hormone in the lateral hypothalamus. *J Neurosci*, 28: 9101-9110.

Ravinet-Trillou C, Arnone M, Delgeorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, Soubrié P (2002). Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284: R345-R353.

Reynolds SM, Berridge KC (2001). Fear and feeding in the nucleus accumbens shell: rostrocaudal segregation of GABA-elicited defensive behavior versus eating behavior. *J Neurosci*, 21: 3261-3270.

Reynolds SM, Berridge KC (2002). Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: bivalent rostrocaudal gradients for GABA-elicited eating, taste "liking"/"disliking" reactions, place preference/avoidance, and fear. *J Neurosci*, 22: 7308-7320.

Richardson DK, Reynolds SM, Cooper SJ, Berridge KC (2005). Endogenous opioids are necessary for benzodiazepine palatability enhancement: naltrexone blocks diazepam-induced increase of sucrose-"liking". *Pharmacol Biochem Behav*, 81: 657-663.

Riegel AC, Lupica CR (2004). Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signaling at multiple synapses in the ventral tegmental area. *J Neurosci*, 24: 11070-11078.

Rindi G, Torsillo A, Locatelli V, Solcia (2004). Ghrelin expression and actions: A novel peptide for an old cell type of the diffused endocrine system. *Exp Biol Med*, 229: 1007-1016.

Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ (2001). Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci*, 21: 109-116.

Robbe D, Alonso G, Manzoni OJ (2003). Exogenous and endogenous cannabinoids control synaptic transmission in mice nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci*, 1003: 212-225.

Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ (2002). Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 8384-8388.

Rockhold RW, Acuff CG, Clower BR (1990). Excitotoxic lesions of the paraventricular hypothalamus: metabolic and cardiac effects. *Neuropharmacology*, 29: 663-673.

Roitman ME, Stuber GD, Phillips PEM, Wightman RM, Carelli RM (2004). Dopamine operates as a subsecond modulator of food seeking. *J Neurosci*, 24: 1265-1271.

Rolls ET (1971). Involvement of brainstem units in medial forebrain bundle self-stimulation. *Physiol Behav*, 7: 297-310.

Rolls ET (1975). The neural basis of brain-stimulation reward. *Prog Neurobiol*, 3: 73-160

Rolls ET (2005). *Emotion explained*. Oxford University Press. New York.

Rolls ET, Cooper SJ (1973). Activation of neurones in the prefrontal cortex by brain-stimulation reward in the rat. *Brain Res*, 60: 351-68.

Rondeel JM, de Greef WJ, van der Schoot P, Karels B, Klootwijk W, Visser TJ (1988). Effect of thyroid status and paraventricular area lesions on the release of thyrotropin-releasing hormone and catecholamines into hypophysial portal blood. *Endocrinology*, 123: 523-527.

Rowland NE, Mukherjee M, Robertson K (2001). Effects of the cannabinoid receptor antagonist SR141716A, alone and in combination with dexfenfluramine or naloxone, on food intake in rats. *Psychopharmacology*, 159: 111-116.

Ruby MA, Nomura DK, Hudak CSS, Mangravite LM, Chiu S, Casida JE, Krauss RM (2008). Overactive endocannabinoid signaling impairs apolipoprotein E-mediated clearance of triglyceride-rich-lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 14561-14566.

Rueda-Orozco PE, Montes-Rodríguez CJ, Soria-Gómez E, Méndez-Díaz M, Prospéro-García O (2008). Impairment of endocannabinoids activity in the dorsolateral striatum delays extinction of behavior in a procedural memory task in rats. *Neuropharmacology*, 55: 55-62.

Rueda-Orozco PE, Soria-Gómez E, Montes-Rodríguez CJ, Martínez-Vargas M, Galicia O, Navarro L, Prospéro-García O (2008). A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology*, 198: 565-576.

Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 152: 1092-1101.

Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC (2003). Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron*, 37: 577-582.

Saario SM, Laitinen JT (2007). Monoglyceride lipase as an enzyme hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biodivers*, 4: 1903-1913.

Sahr AE, Sindelar DK, Alexander-Chacko JT, Eastwood BJ, Mitch CH, Statnick MA (2008). Activation of mesolimbic dopamine neurons during novel and daily limited access to palatable food is blocked by the opioid antagonist LY255582. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295: R463-R471.

Sahu A, Kalra PS, Kalra SP (1988). Food deprivation and ingestion induce reciprocal changes in neuropeptide Y concentrations in the paraventricular nucleus. *Peptides*, 9: 83-86.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson G, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92: 573-585.

Salamone JD, Arizzi MN, Sandoval MD, Cervone KM, Aberman JE (2002). Dopamine antagonists alter response allocation but do not suppress appetite for food: contrasts between the effects of SKF 83566, raclopride and fenfluramine on a concurrent lever pressing/chow consumption task. *Psychopharmacology*, 160: 371-380.

Salto Y, Nothacker HP, Civelli O (2000). Melanin-concentrating hormone receptor: an orphan receptor fits the key. *Trends Endocrinol Metab*, 11: 299-303.

Sanchis-Segura C, Cline BH, Marsicano G, Lutz B, Spanagel R (2004). Reduced sensitivity to reward in CB1 knockout mice. *Psychopharmacology*, 176: 223-232.

Sano H, Yokoi M (2007). Striatal medium spiny neurons terminate in a distinct region in the lateral hypothalamic area and do not directly innervate orexin/hypocretin- or melanin-concentrating hormone-containing neurons. *J*

Neurosci, 27: 6948-6955.

Saper CB, Chou TC, Elmquist JK (2005). The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron*, 36: 199-211.

Sarkar S, Lechan RM (2003). Central administration of neuropeptide Y reduces alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced cyclic adenosine 5'-monophosphate response element binding protein (CREB) phosphorylation in pro-thyrotropin-releasing hormone neurons and increases CREB phosphorylation in corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 144: 281-291.

Sarkar S, Légrádi G, Lechan RM (2002). Intracerebroventricular administration of alpha-melanocyte stimulating hormone increases phosphorylation of CREB in TRH- and CRH-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res*, 945: 50-59.

Sawchenko PE (1998). Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. *J Comp Neurol*, 402: 435-441

Schlicker E, Kathmann M (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 22: 565-572.

Shor-Posner G, Azar AP, Filart R, Tempel D, Leibowitz SF (1986a). Morphine-stimulated feeding: analysis of macronutrient selection and paraventricular nucleus lesions. *Pharmacol Biochem Behav*, 24: 931-939.

Shor-Posner G, Azar AP, Jhanwar-Uniyal M, Filart R, Leibowitz SF (1986b). Destruction of noradrenergic innervation of the paraventricular nucleus: deficits in food intake, macronutrient selection, and compensatory eating after food deprivation. *Pharmacol Biochem Behav*, 25: 381-392.

Schott BH, Minuzzi L, Krebs RM, Elmenhorst D, Lang M, Winz OH, Seidenbecher CI, Coenen HH, Heinze HJ, Zilles K, Düzel E, Bauer A (2008). Mesolimbic functional magnetic resonance imaging activations during reward anticipation correlates with reward-related ventral striatal dopamine release. *J Neurosci*, 28: 14311-14319.

Schramm-Sapota NL, Olsen CM, Winder DG (2006). Cocaine self-administration reduces excitatory responses in the mouse nucleus accumbens shell. *Neuropsychopharmacology*, 31: 1444-1451.

Schulkin J (2003). *Rethinking Homeostasis: Allostatic Regulation in Physiology and Pathophysiology*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.

Schultz W (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol*, 80: 1-27.

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1996). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*, 98:

1101-1106.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404: 435-441.

Sebaai N, Lesage J, Vieau D, Alaoui A, Dupouy JP, Deloof S (2002). Altered control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in adult male rats exposed perinatally to food deprivation and/or dehydration. *Neuroendocrinology*, 76: 243-253.

Seeley RJ (2006). Our evolving understanding of peptides and the control of food intake. Capítulo 6 en *Neurobiology of food and fluid intake*. Springer US.

Serrano A, del Arco I, Pavón FJ, Macías Pérez-Valero V, Rodríguez de Fonseca F (2007). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A (Rimonabant) enhances the metabolic benefits of long term treatment with oleoylethanolamide in Zucker rats. *Neuropharmacology*, 54: 226-234.

Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*, 396: 670-674.

Shoaib M (2008). The cannabinoid antagonist AM251 attenuates nicotine self-administration and nicotine-seeking behavior in rats. *Neuropharmacology*, 54: 438-444.

Simansky KJ, Dave KD, Inemer BR, Nicklous DM, Padron JM, Aloyo VJ, Romano AG (2004). A 5-HT_{2C} agonist elicits hyperactivity and oral dyskinesia with hypophagia in rabbits. *Physiol Behav*, 82: 97-107.

Singru PS, Fekete C, Lechan RM (2005). Neuroanatomical evidence for participation of the hypothalamic dorsomedial nucleus (DMH) in regulation of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) by alpha-melanocyte stimulating hormone. *Brain Res*, 1064: 42-51.

Sink KS, McLaughlin PJ, Wood JAT, Brown C, Fan P, Vemuri VK, Pang Y, Olzewska T, Thakur GA, Makriyannis A, Parker LA, Salamone JD (2007). The novel cannabinoid CB1 receptor neutral antagonist AM4113 suppresses food intake and food-reinforced behavior but does not induce signs of nausea in rats. *Neuropsychopharmacology*, 33: 946-955.

Sipe JC, Chiang K, Gerber AL, Beutler E, Cravatt BF (2002). A missense mutation in human fatty acid amide hydrolase associated with problem drug use. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 8394-8399.

Skofitsch G, Jacobowitz DM, Zamir N (1985). Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain. *Brain Res Bull*, 15: 635-649.

Smith PE (1927). The disabilities caused by hypophysectomy and their repair.

The tuberal (hypothalamic) syndrome in the rat. *J Am Med Assoc*, 88: 158-161.

Smith KS, Berridge KC (2007). Opioid limbic circuit for reward: interaction between hedonic hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum. *J Neurosci*, 27: 1594-1605.

Solinas M, Goldberg SR (2005). Motivational effects of cannabinoids and opioids on food reinforcement depend on simultaneous activation of cannabinoid and opioid systems. *Neuropsychopharmacology*, 30: 2046-2057.

Solinas M, Justinova Z, Goldberg SR, Tanda G (2006). Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. *J Neurochem*, 98: 408-419.

Somers LA, Beyene M, Carelli RM, Wightman RM (2009). Synaptic overflow of dopamine in the nucleus accumbens arises from neuronal activity in the ventral tegmental area. *J Neurosci*, 29: 1735-1742.

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

Stanley BG, Daniel DR, Chin AS, Leibowitz SF (1985). Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides*, 6: 1205-1211.

Stanley BG, Leibowitz SF (1984). Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci*, 35: 2635-2642.

Stratford TR (2005). Activation of feeding-related neural circuitry after unilateral injections of muscimol into the nucleus accumbens shell. *Brain Res*, 1048: 241-250.

Stratford TR, Kelley AE (1999). Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J Neurosci*, 19: 11040-11048.

Stratford TR, Swanson CJ, Kelley AE (1998). Specific changes in food intake elicited by blockade or activation of glutamate receptors in the nucleus accumbens shell. *Behav Brain Res*, 93: 43-50.

Stütz AM, Staszkiwicz J, Ptitsyn A, Argyropoulos G (2007). Circadian expression of genes regulating food intake. *Obesity*, 15: 607-615.

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 215: 89-97.

Svízenská I, Dubovy P, Sulcová A (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous

system structures-a short review. *Pharmacol Biochem Behav*, 90: 501-511.

Swanson LW (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull*, 9: 321-353.

Swanson LW, Hartman BK (1975). The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J Comp Neurol*, 163: 467-505.

Swart I, Jahng JW, Overton JM, Houpt TA (2002). Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283: R1020-R1026.

Sweet DC, Levine AS, Billington CJ, Kotz CM (1999). Feeding response to central orexins. *Brain Res*, 821: 535-538.

Szabo B, Muller T, Koch H (1999). Effects of cannabinoids and dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. *J Neurochem*, 73: 1084-1089.

Taber MT, Fibiger HC (1997). Feeding-evoked dopamine release in the nucleus accumbens: regulation by glutamatergic mechanisms. *Neuroscience*, 76: 1105-1112.

Taha SA, Fields, HL (2005). Encoding of palatability and appetitive behaviors by distinct neuronal populations in the nucleus accumbens. *J Neurosci*, 25: 1193-1202.

Taha SA, Fields, HL (2006). Inhibitions of nucleus accumbens neurons encode a gating signal for reward-directed behavior. *J Neurosci*, 26: 217-222.

Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*, 276: 2048-2050.

Taverna S, Canciani B, Pennartz CMA (2007). Membrane properties and synaptic connectivity of fast-spiking interneurons in rat ventral striatum. *Brain Res*, 1152: 49-56.

Taverna S, Van Dongen YC, Groenewegen HJ, Pennartz CMA (2004). Direct Physiological evidence for synaptic connectivity between médium-sized spiny neurons in rat nucleus accumbens in situ. *J Neurophysiol*, 91: 1111-1121.

Taylor K, Lester E, Hudson B, Ritter S (2007). Hypothalamic and hindbrain NPY, AGRP and NE increase consummatory feeding responses. *Physiol Behav*, 90: 744-750.

Taylor T, Woondlsford FE, Blaine T, Weintraub BD (1990). The paraventricular

nucleus of the hypothalamus has a major role in thyroid hormone feedback regulation of thyrotropin synthesis and secretion. *Endocrinology*, 126: 317-324.

Teitelbaum P, Stellar E (1954). Recovery from the failure to eat produced by hypothalamic lesions. *Science*, 120: 894-895.

Tempel DL, Leibowitz SF (1993). Glucocorticoid receptors in PVN: interactions with NE, NPY, and Gal in relation to feeding. *Am J Physiol*, 265: E794-E800.

Thorpe AJ, Cleary JP, Levine AS, Kotz CM (2005). Centrally administered orexin A increases motivation for sweet pellets in rats. *Psychopharmacology*, 182: 75-83.

Thorpe AJ, Kotz CM (2005). Orexin A in the nucleus accumbens stimulates feeding and locomotor activity. *Brain Res*, 1050: 156-162.

Thiemann G, Di Marzo V, Molleman A, Hasenöhrl RU (2008). The CB1 cannabinoid receptor antagonist AM251 attenuates amphetamine-induced behavioural sensitization while causing monoamine changes in nucleus accumbens and hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav*, 89: 384-391.

Tiesjema B, Adan RA, Luijendijk MC, Kalsbeek A, la Fleur SE (2007). Differential effects of recombinant adeno-associated virus-mediated neuropeptide Y overexpression in the hypothalamic paraventricular nucleus and lateral hypothalamus on feeding behavior. *J Neurosci*, 27: 14139-14146.

Tobler PN, Fiorillo CD, Schultz W (2005). Adaptive coding of reward value by dopamine neurons. *Science*, 307: 1642-1645.

Tokunaga K, Fukushima M, Kemnitz JW, Bray GA (1986). Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. *Am J Physiol*, 251: R1221-R1227.

Tokunaga K, Fukushima M, Lupien JR, Bray GA, Kemnitz JW, Schemmel R (1989). Effects of food restriction and adrenalectomy in rats with VMH or PVH lesions. *Physiol Behav*, 45: 1131-1137.

Tong Q, Ye CP, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB (2008). Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nat Neurosci*, 11: 998-1000.

Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2003). Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology*, 144: 1506-1512.

Touzani K, Velley L (1992). Ibotenic acid lesion of the hypothalamic paraventricular nucleus produces weight gain but modifies neither preference nor aversion for saccharin. *Physiol Behav*, 52: 673-678.

Trifunovic R, Reilly S (2006). Medial parabrachial nucleus neurons modulate d-fenfluramine-induced anorexia through 5HT_{2C} receptors. *Brain Res*, 1067: 170-176.

Tritos NA, Vicent D, Gillete J, Ludwig DS, Flier ES, Maratos-Flier E (1998). Functional interactions between melanin-concentrating hormone, neuropeptide Y, and anorectic neuropeptides in the rat hypothalamus. *Diabetes*, 47: 1687-1692.

Trojnar W, Plucinska K, Ignatowska-Jankowska B, Jankowski M (2007). Damage to the nucleus accumbens shell but not core impairs ventral tegmental area stimulation-induced feeding. *J Physiol Pharmacol*, 58: 63-71.

Tsai HW, Shui HA, Liu HS, Tai MY, Tsai YF (2006). Monoamine levels in the nucleus accumbens correlate with male sexual behavior in middle-aged rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 83: 265-270.

Tsou, K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83: 393-411.

Tucci SA, Rogers EK, Korbonits M, Kirkham TC (2004). The cannabinoid CB₁ receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. *Br J Pharmacol*, 143: 520-523.

Tzschentke TM (2000). The medial prefrontal cortex as a part of the brain reward system. *Amino Acids*, 19: 211-219.

Ueyama E, Morikawa Y, Yasuda T, Senba E (2004). Attenuation of fasting-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (ERK/p38) in the mouse hypothalamus in response to refeeding. *Neurosci Lett*, 371: 40-44.

Usuda I, Tanaka K, Chiba T (1998). Efferent projections of the nucleus accumbens in the rat with special reference to subdivision of the nucleus: biotinylated dextran amine study. *Brain Res*, 797: 73-93.

Valjent E, Pagés C, Rogard M, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J (2001). Δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation *in vivo* depends on dopaminergic transmission. *Eur J Neurosci*, 14: 342-352.

Van der Stelt M, Di Marzo V (2005). Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 77: 111-122.

Van Dijk G (2001). The role of leptin in the regulation of energy balance and adiposity. *J Neuroendocrinol*, 13: 913-921.

Van Dijk G, Strubbe JH (2003). Time-dependent effects of neuropeptide Y infusion in the paraventricular hypothalamus on ingestive and associated behaviors in rats. *Physiol Behav*, 79: 575-580.

Van Dongen YC, Deniau JM, Pennartz CMA, Galis-de Graf Y, Voorn P, Thierry AM, Groenewegen HJ (2005). Anatomical evidence for direct connections between the shell and core subregions of the rat nucleus accumbens. *Neuroscience*, 136: 1049-1071.

Vásquez C, Lewis DL (1999). The CB1 cannabinoid receptor can sequester G-proteins, making unavailable to couple to other receptors. *J Neurosci*, 19: 9271-9280.

Ventura R, Morrone C, Puglisi-Allegra S (2007). Prefrontal/accumbal catecholamine system determines motivational salience attribution to both reward-and aversion-related stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 5181-5186.

Vertes RP (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, 51: 32-58.

Verty ANA, McGregor IS, Mallet PE (2004). Consumption of high carbohydrate, high fat, and normal chow is equally suppressed by a cannabinoid receptor antagonist in non-deprived rats. *Neurosci Lett*, 354: 217-220.

Verty ANA, McGregor IS, Mallet PE (2005). Paraventricular hypothalamic CB₁ cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology*, 49: 1101-1109.

Vickers SP, Dourish CT, Kenneth GA (2001). Evidence that hypophagia induced by *α*-fenfluramine and *α*-norfenfluramine in the rat is mediated by 5-HT_{2C} receptors. *Neuropharmacology*, 41: 200-209.

Vigano D, Rubino T, Parolaro D (2005). Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions. *Pharmacol Biochem Behav*, 81: 360-368.

Voisin T, Rouet-Benzineb P, Reuter N, Laburthe M (2003). Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues. *Cell Mol Life Sci*, 60: 72-87.

Voorn P, Vanderschuren LJMJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CMA (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci*, 27: 468-474.

Vrang N, Larsen PJ, Clausen JT, Kristensen P (1999). Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci*, 19, RC5.

Waalas I, Fonnum F (1979). The effects of surgical and chemical lesions on neurotransmitter candidates in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience*, 4: 209-216.

Waalas I, Fonnum F (1980). Biochemical evidence for γ -aminobutyrate containing fibres from the nucleus accumbens to the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Neuroscience*, 5:63-72.

Wang L, Liu J, Harvey-White J, Zimmer A, Kunos G (2002). Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age-dependent decline in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 1393-1398.

Ward HG, Nicklous DM, Aloyo VJ, Simansky KJ (2006). Mu-opioid receptor cellular function in the nucleus accumbens is essential for hedonically driven eating. *Eur J Neurosci*, 23: 1605-1613.

Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*, 424: 434-438.

Weiss GF, Leibowitz SF (1985). Efferent projections from the paraventricular nucleus mediating alpha 2-noradrenergic feeding. *Brain Res*, 347: 225-238.

Wiley JL, Burston JJ, Leggett DC, Alekseeva OO, Razdan RK, Mahadevan A, Martin BR (2005). CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br J Pharmacol*, 145: 293-300.

Will MJ, Franzblau EB, Kelley AE (2003). Nucleus accumbens μ -opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network. *J Neurosci*, 23: 2882-2888.

Williams KW, Coppari R, Elmquist JK (2006). "AMPing up" our understanding of the hypothalamic control of energy balance. *J Clin Invest*, 117: 2089-2092.

Williams CM, Kirkham TC (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, 143: 315-317.

Williams CM, Kirkham TC (2002). Observational analysis of feeding induced by Delta9-THC and anandamide. *Physiol Behav*, 76: 241-250.

Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M (2001). To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci*, 24: 429-458.

Willis GL, Hansky J, Smith GC (1984). Ventricular, paraventricular and circumventricular structures involved in peptide-induced satiety. *Regul Pept*, 9: 87-99.

Wilson CJ, Kawaguchi Y (1996). The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci*, 16: 2397-2410.

Wilson RI, Nicol RA (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signaling at hippocampal synapses. *Nature*, 410: 588-592.

Winn P, Tarbuck A, Dunnet SB (1984). Ibotenic acid lesions of the lateral hypothalamus: comparison with the electrolytic lesion syndrome. *Neuroscience*,

12: 225-240.

Wirth MM, Giraudo SQ (2001). Effect of Agouti-related protein delivered to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus on intake of a preferred versus a non-preferred diet. *Brain Res*, 897: 169-174.

Wirth MM, Olszewski PK, Yu C, Levine AS, Giraudo SQ (2001). Paraventricular hypothalamic alpha-melanocyte-stimulating hormone and MTHL reduce feeding without causing aversive effects. *Peptides*, 22: 129-134.

Wise RA (1987). The role of reward pathways in the development of drug dependence. *Pharmacol Ther*, 35: 227-263.

Wise RA (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci*, 5: 1-12.

Wise RA (2005). Forebrain substrates of reward and motivation. *J Comp Neurol*, 493: 115-121.

Wise RA (2008). Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotox Res*, 14: 169-183.

Wittmann G, Deli L, Kalló I, Hrabovszky E, Watanambe M, Liposits, Z, Fekete C (2007). Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol*, 503: 270-279.

Xi ZX, Gilbert JG, Peng XQ, Pak AC, Li X, Gardner EL (2006). Cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 inhibits cocaine-primed relapse in rats: role of glutamate in the nucleus accumbens. *J Neurosci*, 26: 8531-8536.

Xiong W, Hosoi M, Koo BN, Zhang L (2008). Anandamide inhibition of 5-HT_{3A} receptors varies with receptor density and desensitization. *Mol Pharmacol*, 73: 314-322.

Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW, Barsh GS (2005). PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest*, 115: 951-958.

Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2003). Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, 38: 701-713.

Yan QS (2000). Activation of 5-HT_{2A/2C} receptors within the nucleus accumbens increases local dopaminergic transmission. *Brain Res Bull*, 51: 75-81.

Yang SC, Shieh KR, Li HY (2005). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the nucleus accumbens participates in the regulation of feeding behavior in rats. *Neuroscience*, 133: 841-851.

Yim CY, Mogenson GJ (1982). Response of nucleus accumbens neurons to

amygdala stimulation and its modification by dopamine. *Brain Res*, 239: 401-415.

Yim CY, Mogenson GJ (1988). Neuromodulatory action of dopamine in the nucleus accumbens: and in vivo intracellular study. *Neuroscience*, 26: 403-415.

Yoshida K, McCormack S, España RA, Crocker A, Scammell TE (2006). Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol*, 494: 845-861.

Yun IA, Wakabayashi KT, Fields HL, Nicola SM (2004). The ventral tegmental area is required for the behavioral and nucleus accumbens neuronal firing responses to incentive cues. *J Neurosci*, 24: 2923-2933.

Záborszky L, Alheid GF, Beinfeld MC, Eiden LE, Heimer L, Palkovits M (1985). Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience*, 14: 427-453.

Zamir N, Skofitsch G, Jacobowitz DM (1986). Distribution of immunoreactive melanin-concentrating hormone in the central nervous system of the rat. *Brain Res*, 373: 240-245.

Zangen A, Solinas M, Ikemoto S, Goldberg SR, Wise RA (2006). Two brain sites for cannabinoid reward. *J Neurosci*, 26: 4901-4907.

Zarevich P, Setter PE (1979). Simultaneous rate-independent and rat-dependent assessment of intracranial self-stimulation: evidence for the direct involvement of dopamine in brain reinforcement mechanisms. *Brain Res*, 169: 499-512.

Zhang Y, Proenca R, Maffel M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-432.

Zheng M, Gosnell BA, Kelley AE (1998). Intake of high-fat food is selectively enhanced by *Mu* opioid receptor stimulation within the nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther*, 285: 908-914.

Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 5780-5785.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang HH, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400: 452-457.

7. ANEXOS

Anexo 1

Abreviaturas

2-AG: 2-araquidonilglicerol.

3V: tercer ventrículo.

α MSH: alfa-hormona estimuladora de melanocitos.

ACh: acetilcolina.

ACTH: hormona adenocorticotropa.

AgRP: proteína relacionada al gen agouti.

AH: hipotálamo anterior.

AMP: adenosin monofosfato.

AMPK: proteína cinasa dependiente de adenosin monofosfato.

ANA: anandamida.

AP: área postrema.

APo: área preóptica.

ARC: núcleo arcuato o arqueado.

ARNm: ARN mensajero.

ATP: adenosin trifosfato.

CART: transcrito regulado por cocaína y anfetamina.

CB1: receptor a cannabinoides 1.

CB2: receptor a cannabinoides 2.

CCK: colecistocinina.

CPu: núcleo caudado-putamen.

CRH: hormona liberadora de corticotropina.

CtxPf: corteza prefrontal.

DA: dopamina.

DAG: diacilglicerol.

DMH: hipotálamo dorsomedial.

DMNX: núcleo dorsal motor del vago.

DMSO: dimetilsulfoxido.

EAA: aminoácidos excitadores.

eCB: endocannabinoides.

ENK: encefalina.

FAAH: hidrolasa de los ácidos grasos amidados.

F-ir: inmuoreactividad a c-Fos.

GAD: descarboxilasa del ácido glutámico.

HIS: hibridación *in situ*.

HL: hipotálamo lateral.

HPM: haz prosencefálico medial.

ICj: islas de calleja.

ICSS: auto-estimulación eléctrica intracraneal.

KTS: ketanserina.

LC: locus ceruleous.

LTD: depresión a largo plazo.

LTP: potenciación de largo plazo.

MCH: hormona concentradora de melanina.

mGLUR: receptores glutamatérgicos metabotrópicos.

MAGL: monoacil glicerol lipasa.

MSN: neuronas espinosas de mediano tamaño.

NAc: núcleo accumbens.

NAcC: núcleo accumbens core.

NAcS: núcleo accumbens shell.

NLX: naloxona.

NPY: neuropéptido Y.

NR: núcleos del rafe.

NSQ: núcleo supraquiasmático.

NTS: núcleo del tracto solitario.

OLE: oleamida.

ORX: orexinas.

PA: privación de alimento.

PB: núcleo parabraquial.

PFA: paraformaldehído.

Pir: corteza piriforme.

POMC: pro-opiomelanocortina.

PV: globo pálido ventral.

PVN: hipotálamo paraventricular.

SP: sin privación de alimento.

TH: tirosina hidroxilasa.

THC: tetrahidrocanabinol.

TPBS: tritón-PBS.

TRH: hormona liberadora de tirotrópina.

VEH: vehículo.

VL: ventrículo lateral.

VMH: hipotálamo ventromedial.

VTA: área ventral tegmental.

Anexo 2

El anexo 2 es el artículo que conjunta el 60 % de mi tesis doctoral, el 40 % restante se encuentra en dos artículos mas que se encuentran bajo revisión.

Soria-Gómez E, Matias I, Rueda-Orozco PE, Cisneros M, Petrosino S, Navarro L, Di Marzo V, Prospéro-García (2007) Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. Br J Pharmacol, 151: 1109-1116.

RESEARCH PAPER

Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus

E Soria-Gómez¹, I Matias², PE Rueda-Orozco¹, M Cisneros¹, S Petrosino², L Navarro¹, V Di Marzo² and O Prospéro-García¹

¹Grupo de Neurociencias, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, Mexico and ²Endocannabinoid Research Group, Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pozzuoli (NA), Italy

Background and purpose: Evidence indicates that the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol (2-AG), increases food intake when injected into the nucleus accumbens shell (NAcS), thereby potentially activating hypothalamic nuclei involved in food intake regulation. We aimed to evaluate potential orexigenic effects of the endocannabinoid anandamide and of AA5HT, a fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor, and OMDM-1, an inhibitor of anandamide uptake, injected in the NAcS, as well as the effect of these treatments on activation of hypothalamic nuclei.

Experimental approach: Drugs were given into the NAcS of rats and food intake quantified during the next 4 h. In other groups, after the same treatments the brains were processed for c-Fos immunohistochemistry with focus on hypothalamic nuclei. Additional groups were used to quantify endocannabinoid levels in the nucleus accumbens and the hypothalamus after AA5HT and OMDM-1 intra-NAcS injections.

Key results. Our results indicate that the above treatments stimulate food intake during 4 h post-injection. They also increase c-Fos immunoreactivity in hypothalamic nuclei. The CB₁ antagonist, AM251, blocked these effects. Finally, we found elevated levels of 2-AG, but not anandamide, after intra-NAcS injections of AA5HT.

Conclusions and implications: These data support the involvement of the endocannabinoid system in feeding behavior at the level of the NAcS and hypothalamus. In addition, this is the first experimental demonstration that the pharmacological inhibition of endocannabinoid inactivation in the NAcS stimulates food intake, suggesting that the endocannabinoid degrading proteins can be a target for treating eating disorders.

British Journal of Pharmacology (2007) **151**, 1109–1116; doi:10.1038/sj.bjp.0707313; published online 4 June 2007

Keywords: hyperphagia; anandamide; cannabinoid receptor 1; FAAH; hypothalamus; anandamide transporter; nucleus accumbens shell

Abbreviations: AA5HT, *N*-arachidonoyl-serotonin; 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; ARC, arcuate nucleus; DMH, dorsomedial hypothalamus; FAAH, fatty acid amide hydrolase; F-ir, c-Fos immunoreactive; LH, lateral hypothalamus; MSNs, medium spiny neurons; NAc, nucleus accumbens; NAcS, nucleus accumbens shell; OMDM-1, (*R*)-*N*-oleoyl-(1'-hydroxybenzyl)-2'-ethanolamine; PBS, phosphate-buffered saline; PFH, paraformaldehyde; PVN, paraventricular nucleus

Introduction

Mounting evidence supports the involvement of the endocannabinoid system in the control of feeding behaviour,

mainly by regulating the activity of the brainstem, the hypothalamus and the nucleus accumbens (NAc) (Cota *et al.*, 2003; Cooper, 2004; Di Marzo and Matias, 2005; Frideri *et al.*, 2005). For example, it has been demonstrated in several animal models that the endocannabinoids, anandamide (ANA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and oleamide increase food intake, and that such effects are mediated by the CB₁ receptor (Williams and Kirkham, 1999, 2002; Jamshidi and Taylor, 2001; Kirkham *et al.*, 2002; Martínez-

Correspondence: Dr O Prospéro-García, Grupo de Neurociencias, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-250, México DF 04510, Mexico.

E-mail: opg@sevidor.unam.mx or Dr V Di Marzo, Endocannabinoid Research Group, ICB-CNR, 80078 Pozzuoli (NA), Italy.

E-mail: vdimarzo@icmib.na.cnr.it

Received 29 March 2007; accepted 1 May 2007; published online 4 June 2007

González *et al.*, 2004). In this context, the CB₁ antagonist SR141716A (rimonabant) has been used in humans (Van Gaal *et al.*, 2005) and AM251, another CB₁ antagonist, in animals, to reduce food intake and induce weight loss (Hildebrandt *et al.*, 2003; Chambers *et al.*, 2004). Moreover, mice that are CB₁ null (CB₁^{-/-}) are lean and hypophagic (Cota *et al.*, 2003; Osei-Hyiaman *et al.*, 2005b; Wiley *et al.*, 2005).

The sites of the orexigenic action of endocannabinoids have been studied. For example, both ANA and 2-AG have been detected in high concentrations in the hypothalamus, where food restriction increases 2-AG, but not ANA levels (Kirkham *et al.*, 2002). However, leptin reduces the concentration of both endocannabinoids (Di Marzo *et al.*, 2001). It has also been shown that mice lacking fatty acid amide hydrolase (FAAH) (FAAH^{-/-}), the enzyme that metabolizes ANA, oleamide and 2-AG, exhibit reduced levels of the cocaine- and amphetamine-response transcript, an anorexigenic peptide, in the arcuate nucleus (ARC), in the dorsomedial hypothalamus (DMH) and in the NAc (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005a). In addition, ANA increases the release of neuropeptide Y, an orexigenic mediator, in the hypothalamus *in vitro* (Gamber *et al.*, 2005), suggesting that high hypothalamic levels of endocannabinoids following food deprivation downregulate anorectic and upregulate orexigenic neuropeptides.

Administration of ANA into the ventromedial hypothalamus, a nucleus with CB₁-expressing neurons, increases food intake in rats (Jamshidi and Taylor, 2001). On the other hand, infusion of GABAergic (Stratford and Kelley, 1997; Söderpalm and Berridge, 2000; Zhang *et al.*, 2003) and opioidergic (MacDonald *et al.*, 2003; Will *et al.*, 2003) agonists, or glutamatergic antagonists (Kelley and Swanson, 1997; Stratford *et al.*, 1998) into the NAc stimulates food intake. These treatments also produce activation of hypothalamic nuclei related to food intake (Maldonado-Irizarry *et al.*, 1995; Stratford and Kelley, 1999). Furthermore, simultaneous inactivation of these hypothalamic nuclei (that is, lateral hypothalamus, LH) blocks the increase in food intake induced by these drugs (Maldonado-Irizarry *et al.*, 1995; Will *et al.*, 2003), thus indicating that stimulation of orexigenic mechanisms in the NAc is, at least in part, due to activation of hypothalamic nuclei. Infusion of 2-AG into the nucleus accumbens shell (NAcS), a subdivision of the NAc, produces a hyperphagic effect that is blocked by the systemic administration of rimonabant (Kirkham *et al.*, 2002). However, whether or not also ANA enhances food intake when administered into the NAcS has not yet been determined. In the present study, we aimed at (a) demonstrating that ANA stimulates food intake when administered into the NAcS, (b) determining the ability of *N*-arachidonoyl-serotonin (AA5HT), an inhibitor of FAAH (Bisogno *et al.*, 1998), and (*R*)-*N*-oleoyl-(1'-hydroxybenzyl)-2'-ethanolamine (OMDM-1: Ortar *et al.*, 2003), a selective inhibitor of ANA cellular reuptake via a putative plasma membrane transporter, to enhance food intake when injected into the NAcS, (c) investigating whether these treatments in the NAcS activate the hypothalamus, and (d) determining endocannabinoid levels in the NAc and the hypothalamus after AA5HT or OMDM-1 administration.

Methods

Animals

Male Wistar rats ($n = 185$) weighing between 250 and 280 g were used. After surgery, rats were housed individually in Plexiglas cages and maintained at constant temperature (23°C) in a reverse dark-light cycle (lights on from 2000 to 0800 hours) with food and water *ad libitum*. All the behavioural tests were carried out at the beginning of the dark period (0800 hours). None of the animals used in these experiments was food deprived at any time.

Rats were implanted bilaterally with 23-gauge stainless steel guide cannulae aimed at the NAcS ($A = 2.0$; $L = \pm 1.0$; $V = -6.0$; reference to Bregma, Paxinos and Watson, 1986). After fixation to the skull with dental cement, the cannulae were sealed with stylets to maintain their patency. Infusions were performed with the aid of 30-gauge injectors protruding 1.5 mm from the end of the guide cannula. The injections were performed while animals were temporarily restrained. After infusion, injectors were kept in place for 60 s to prevent outflow. All animals were treated in accordance with American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care Policy.

Intra-NAcS administration of ANA, AA5HT and OMDM-1: food intake evaluation

Rats ($n = 140$) were gently handled for 2 h during 2 days before experimental manipulations to minimize stress. The number of experimental subjects for each group was 10. ANA was administered in three different doses: 0.1, 1.0 and 10.0 µg, in 0.5 µl per side (0.25 µl min⁻¹). AA5HT and OMDM-1 doses were 1.0 µg per side. To determine if the behavioural effect produced by the most potent dose of ANA (1.0 µg) was exerted through the CB₁ receptor, we prepared a cocktail with ANA and the CB₁ receptor antagonist, AM251 (1.6 µg per side, equivalent in moles to ANA) ($n = 10$). AA5HT and OMDM-1 were also mixed with AM251 (1.6 µg) to prevent the behavioural effect produced by these drugs. Since the OMDM-1 effects were not blocked by the AM251 at a dose of 1.6 µg, we proceeded to increase the dose until the effect was clearly blocked, that is, to 4.8 and 9.6 µg in 0.5 µl per side. In additional groups, AM251 was administered alone at the doses mentioned above. Rats under the effect of the different treatments received a pre-weighed amount of regular laboratory chow pellets, after intra-NAcS infusions. We estimated the amount of food ingested by the rats calculating the difference between the original food weight and the weight of the leftover food, corrected for by the spill-over, at 1 and 4 h after injection. Upon completion of food intake evaluation, rats were perfused transcardially with 200 ml phosphate-buffered saline (PBS) and 200 ml of 4% paraformaldehyde (4% PFH). The brains were prepared for histological analysis with cresyl violet staining to verify the correct placement of the injector tip (Figure 1). Animals with injector tips misplaced were discarded.

Intra-NAcS administration of ANA, AA5HT and OMDM-1: hypothalamic *c-Fos*

In another group of rats ($n = 35$), all drugs were administered as follows. For this experiment, we used the ANA dose

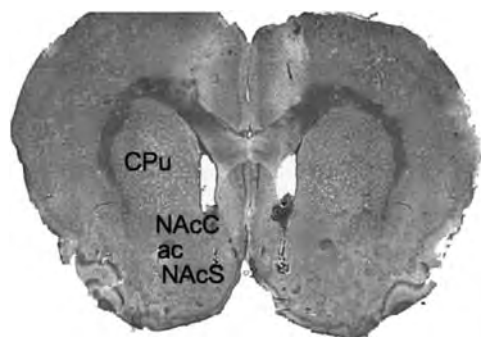


Figure 1 Representative photomicrograph of injection sites. CPU, caudate putamen; ac, anterior commissure; NAcC, nucleus accumbens core; NAcS, nucleus accumbens shell.

(1.0 μg) that produced the largest effect in the first hour and the AM251 doses (1.6 and 9.6 μg) that prevented the hyperphagic effect induced by the various treatments. For the rest of the treatments, the concentrations were the same. Five rats were used for each group.

Ninety minutes after administration of each compound or combination thereof, rats were anaesthetized with sodium pentobarbital and perfused transcardially with 200 ml PBS and 200 ml 4% PFH. Then, the brains were prepared for cryostat sectioning; 50- μm coronal slices were made at the hypothalamic level. For each slice taken for c-Fos immunohistochemistry, another immediately adjacent was selected for cresyl violet staining to determine accurately the limits of a given hypothalamic nucleus of our interest. Immunohistochemistry was developed with the peroxidase-diaminobenzidine reaction.

Sections were observed under a light microscope (Olympus BX41). Images were captured on a 12-bit digital camera (Evolution VF; MediaCybernetics) at a magnification of $\times 4$ for panoramic resolution of the hypothalamic nuclei and at $\times 10$ for cell-nuclei counting. The hypothalamic nuclei of interest were the following: paraventricular nucleus (PVN), ARC, DMH and LH. Images were displayed on a computer screen using the Image-Pro Plus software (MediaCybernetics) that allowed us to mark individual c-Fos immunoreactive (F-ir) cells. Counts of F-ir cells were obtained bilaterally from two brain sections for each region and averaged for subsequent analysis. Cells were counted in the defined nuclear areas as determined in the cresyl violet section for each region.

Intra-NAcS administration of AA5HT and OMDM-1: ANA and 2-AG quantification

The protocol of drug administration was the same as that in the experiments described above. The number of experimental subjects for each group (vehicle, AA5HT and OMDM-1) was four. Ninety minutes after infusions rats were killed. Rat brains were quickly removed, and the NAc and the hypothalamus were obtained by regional dissection on ice and immediately frozen in dry ice. Tissues were stored at -80°C until use. Tissues were then homogenized in 5 vol of chloroform/methanol/Tris-HCl 50 mM; (2:1:1) containing 100 pmol each of d_8 -anandamide and d_5 -2-AG as internal

standards. Homogenates were centrifuged at 13000g for 16 min (4°C), the aqueous phase plus debris were collected and extracted again twice with 1 vol of chloroform. The organic phases from the three extractions were pooled and the organic solvents evaporated in a rotating evaporator. Lyophilized samples were then stored frozen at -80°C under nitrogen atmosphere until analysed. Lyophilized extracts were resuspended in chloroform/methanol (99:1; v/v). The solutions were then purified by open bed chromatography on silica. Fractions eluted with chloroform/methanol 9:1 by volume (containing ANA and 2-AG) were collected and the excess solvent evaporated with a rotating evaporator. The prepurified fractions were then analysed by isotope dilution liquid chromatography mass-spectrometry using chromatographic and mass spectrometric, as described previously (Di Marzo *et al.*, 2001), but employing a single-quadrupole instrument from Shimadzu, Japan. Two liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) peaks for both deuterated and undeuterated monoarachidonoylglycerol were found, corresponding to 2-AG and 1(3)-AG, in agreement with the previous observation that 2-AG undergoes isomerization during the purification procedure. Therefore, the amounts of 2-AG were calculated by adding the amounts of the two isomers. The amounts of endocannabinoids are expressed as pmol or nmol per gram of wet tissue extracted.

Data analysis

Food intake data obtained at the first or fourth hour were analysed, independently, using a one-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by a *post hoc* Bonferroni test. Results are presented as mean \pm s.e.m. of the amount of food ingested.

Cell counts of F-ir cells were analysed by using a one-way ANOVA test with treatment and hypothalamic nucleus as factors, followed by a *post hoc* Bonferroni test. Results are presented as mean \pm s.e.m. Quantitative data of ANA and 2-AG content were analysed by a one-way ANOVA test followed by a *post hoc* Bonferroni test. Results are presented as mean \pm s.e.m. Significance was accepted at $P < 0.05$ for all analyses.

Drugs

ANA was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA), and AM251 from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). AA5HT and OMDM-1 were synthesized as described previously (Bisogno *et al.*, 1998; Ortar *et al.*, 2003). The vehicle for ANA, AA5HT and OMDM-1 was 5% ethanol in saline solution. A mixture of dimethyl sulphoxide (25%), PBS (74%) and Tween 20 (1%) was used to dissolve AM251. The anti-c-Fos antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Results

Effects of ANA infusions into the NAcS on food intake

Results indicated that, in the first hour, ANA (1.0 μg) increased the amount of food ingested by about 100%

compared to the vehicle (Figure 2). The CB₁ antagonist, AM251, blocked this hyperphagic effect. Interestingly, AM251 alone did not produce any effect on food intake. The other two doses of ANA seemed to increase food intake but did not reach significance. Four hours after the administration, all doses of ANA increased food consumption, compared with the vehicle. Although AM251 given alone remained without effect, it prevented the orexigenic effects of ANA (Figure 2).

Effects of AA5HT infusions into the NAcS on food intake

In this study, we tested whether the infusion of AA5HT, a FAAH inhibitor, into the NAcS affected food intake, and if such an effect was mediated through the CB₁ receptor. We observed that AA5HT significantly stimulated food intake at the first and fourth hours post-injection, compared with the vehicle (Figure 3). This effect was prevented by AM251 at both times.

Effects of OMDM-1 infusions into the NAcS on food intake

OMDM-1 significantly increases food intake only at the 4 h time point, post-injection compared with vehicle (Figure 4). However, this effect was not prevented by the dose of AM251 (1.6 µg) that blocked the effect of ANA and AA5HT or by a higher dose (4.8 µg). It was necessary to increase the dose to 9.6 µg for effective blockade. Interestingly, AM251 administered alone at the higher doses of 4.8 and 9.6 µg still did not affect ingestive behaviour (Figure 4).

Effects of ANA, AA5HT and OMDM-1 infusions into the NAcS on hypothalamic c-Fos expression

This experiment allowed us to determine whether endocannabinoid treatments into the NAcS affected hypothalamic nuclei related to feeding behaviour. Figure 5 shows representative microphotographs of F-ir cells in the four nuclei, ARC, PVN, DMH and LH, in which NAcS treatments induced

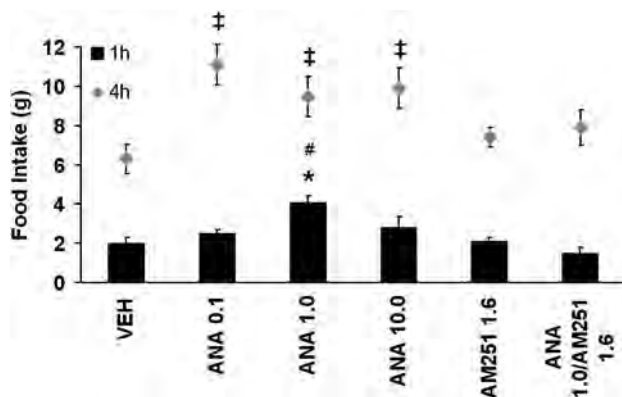


Figure 2 Effects on food intake of infusions of three doses of ANA (0.1, 1.0 and 10.0 µg) and the CB₁ antagonist, AM251, into the NAcS. Values are means ± s.e.m. In the first hour, only 1.0 µg ANA increased food intake that was blocked by AM251. In the fourth hour, all doses of ANA increased food intake. * and †*P* < 0.05 vs vehicle group. #*P* < 0.05 vs AM251 and ANA1.0/AM251. ANA, anandamide; NAcS, nucleus accumbens shell.

significant changes. Mean values for F-ir cell counts after these treatments in the four hypothalamic nuclei are shown in Figure 6. No changes in ARC were documented except for those produced by OMDM-1 and such an effect was blocked by AM251. In turn, ANA, AA5HT and OMDM-1 increased the numbers of F-ir cells in the PVN, compared to the values after treatment with vehicle. These effects were prevented by AM251. Unlike AA5HT, ANA and OMDM-1 increased F-ir cell numbers in the DMH, compared to vehicle. This effect was also blocked by AM251. In the LH, only ANA and OMDM-1 increased c-Fos expression, compared to vehicle. AA5HT tended to increase F-ir cells but did not reach significance. Again, AM251 prevented both effects. Despite the fact that the administration of AM251 (1.6 µg) alone into the NAcS did not produce any change in the number of F-ir cells in any of the nuclei, the higher dose, 9.6 µg, significantly diminished Fos immunoreactivity in all four of the hypothalamic nuclei assayed.

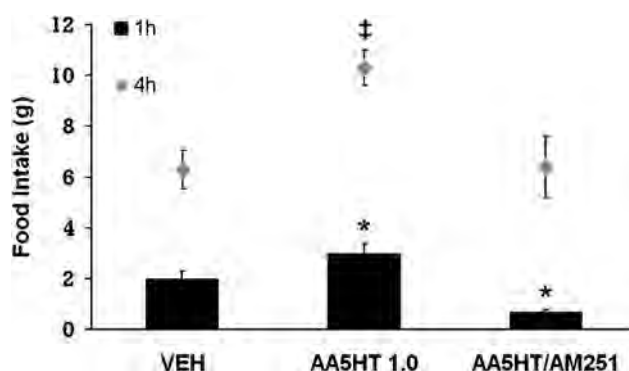


Figure 3 Effects on food intake of infusions into the NAcS of the FAAH inhibitor, AA5HT (1.0 µg). Values are means ± s.e.m. AA5HT increased food intake in the 1st and 4th hour. The effect was blocked by the coadministration of AM251. * and †*P* < 0.05 vs vehicle and AA5HT/AM251. The combination of AA5HT and AM251 reduced food intake in the first hour. **P* < 0.05 vs vehicle and AA5HT.

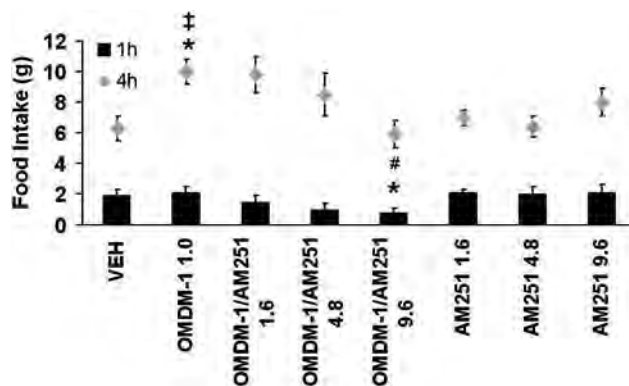


Figure 4 Effects on food intake of infusions into the NAcS of the ANA transporter inhibitor, OMDM-1 (1.0 µg). Values are means ± s.e.m. OMDM-1 increased food intake only after 4 h. Such effects are reversed by AM251 at a dose of 9.6 µg. **P* < 0.05 vs vehicle and †*P* < 0.05 vs OMDM-1/AM251 9.6, AM251 1.6, AM251 4.8 and AM251 9.6. In the first hour, OMDM-1 plus AM251 9.6 decreases food intake compared with vehicle and OMDM-1. **P* < 0.05, and #*P* < 0.05 vs AM251 1.6, AM251 4.8 and AM251 9.6. ANA, anandamide; NAcS, nucleus accumbens shell; OMDM-1, (*R*)-*N*-oleoyl-(1'-hydroxybenzyl)-2'-ethanolamine.

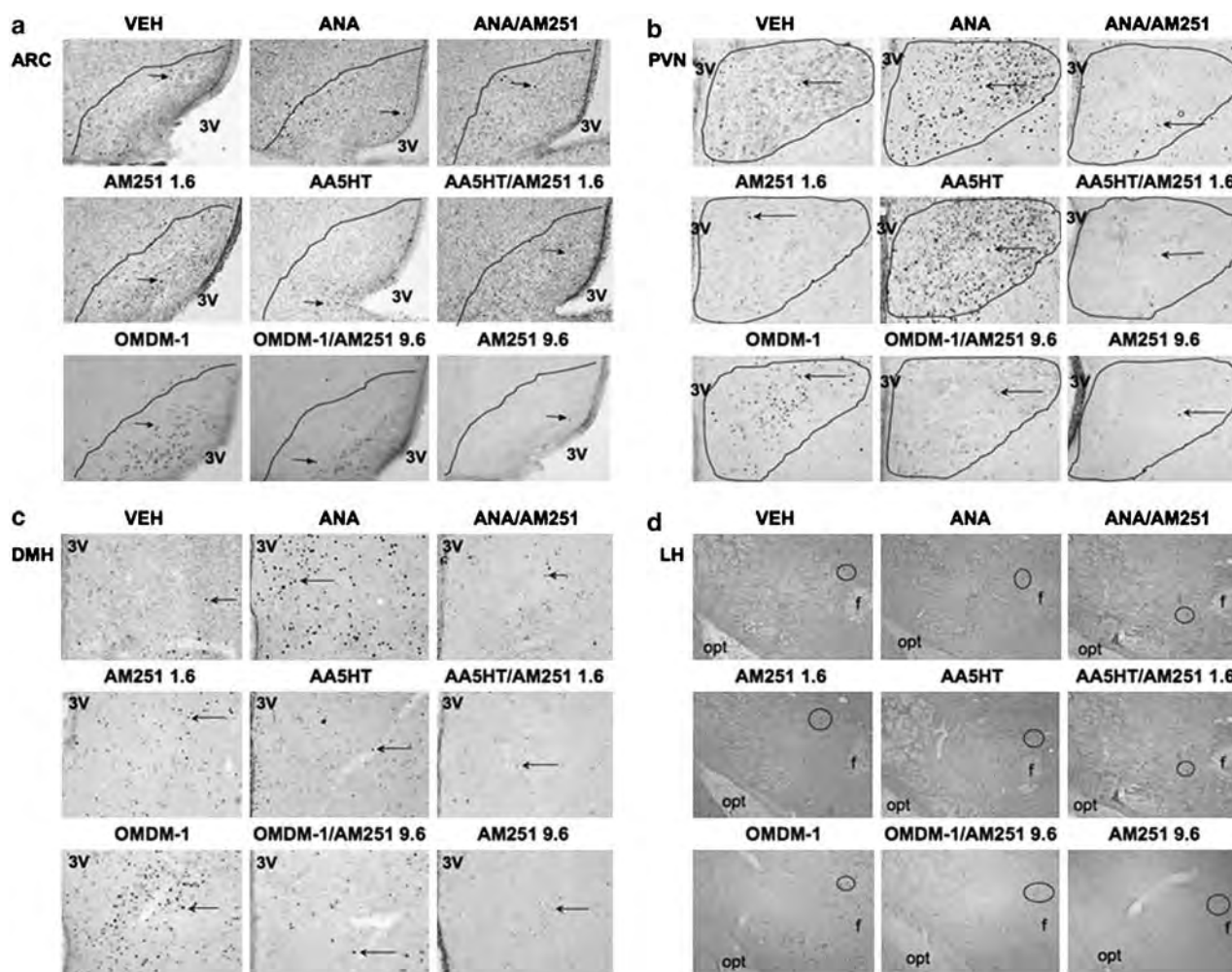


Figure 5 Representative photomicrographs showing F-ir cells in the ARC (a), PVN (b), DMH (c) and LH (d) under NAcS treatments. Only OMDM-1 increased c-Fos expression in all nuclei. ANA and AA5HT increased F-ir cell numbers in the PVN, DMH and LH, compared to vehicle (VEH). This effect was blocked by AM251. Magnification: $\times 10$. Scale bar = $100 \mu\text{m}$. The ARC and PVN areas are delineated by a continuous line, according to the cresyl violet slice for each section. 3V, third ventricle; opt, optic tract; f, fornix. Arrows indicate examples of F-ir cells in ARC, PVN and DMH. Red ellipses in LH indicate Fos-positive cells. ARC, arcuate nucleus; DMH, dorsomedial nucleus; F-ir, c-Fos immunoreactive; LH, lateral hypothalamus; NAcS, nucleus accumbens shell; OMDM-1, (*R*)-*N*-oleoyl-(1'-hydroxybenzyl)-2'-ethanolamine; PVN, paraventricular nucleus.

ANA and 2-AG levels after AA5HT or OMDM-1 treatments

The aim of this experiment was to determine if intra-NAcS administration of AA5HT and OMDM-1 increases endocannabinoid levels selectively in the NAcS and not in the hypothalamus. We found an increase in ANA and 2-AG levels in the NAc after AA5HT and OMDM-1 infusions, albeit only AA5HT increased 2-AG significantly compared to vehicle (Table 1). In the hypothalamus, a significant decrease of 2-AG levels was observed with both drugs, whereas no changes were detected for ANA.

Discussion and conclusions

It has been previously demonstrated that injection in the NAcS of opioids and GABA agonists, glutamate antagonists and the endocannabinoid 2-AG enhances feeding behaviour (Kirkham *et al.*, 2002; Hanlon *et al.*, 2004). In this

study, we show that administration into the NAcS of the other endocannabinoid, ANA, also increases food intake. We believe that ANA acts through the activation of the CB₁ receptor, since its orexigenic effect was blocked here by coadministration with AM251, a selective CB₁ antagonist. In general, all doses tested stimulated food intake but the effects of ANA can be classified, depending on the dose, either as an acute response produced by $1.0 \mu\text{g}$ of ANA at the first hour post-injection or as a slowly developing response after 4 h for the other two doses. Furthermore, we show, for the first time, that pharmacological inhibition by AA5HT (Bisogno *et al.*, 1998) of the main enzyme (FAAH) involved in degrading endocannabinoids, as well as potential inhibition of the cellular uptake of ANA by OMDM-1 (Ortar *et al.*, 2003), also stimulate food intake. These effects were also prevented by AM251, thus suggesting that these compounds facilitate food intake by activating the CB₁ receptor indirectly, that is, by prolonging

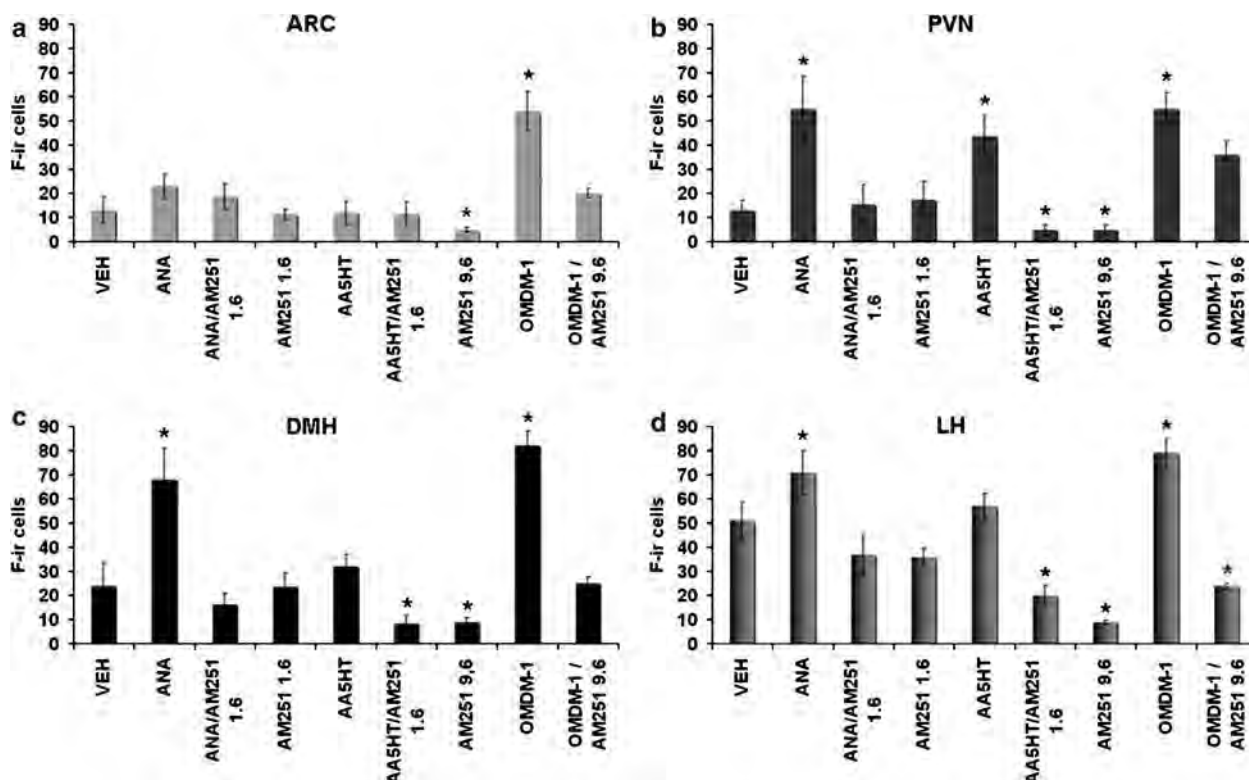


Figure 6 Mean numbers of F-ir cells. In the ARC (a) only OMDM-1 increased significantly c-Fos expression. In the PVN (b) ANA and AA5HT increased significantly c-Fos expression. In the DMH (c) and LH (d) ANA and OMDM-1 effects reached significance compared with the vehicle. In all areas, the AM251 blocked the increase in Fos expression. AM251 (9.6 μg) reduced Fos immunoreactivity in all hypothalamic areas. Values are means \pm s.e.m. * $P < 0.05$ compared with all treatments. ARC, arcuate nucleus; DMH, dorsomedial nucleus; F-ir, c-Fos immunoreactive; LH, lateral hypothalamus; OMDM-1, (*R*)-*N*-oleoyl-(1'-hydroxybenzyl)-2'-ethanolamine; PVN, paraventricular nucleus.

Table 1 Endocannabinoid levels in the nucleus accumbens and the hypothalamus after NAcS infusions of AA5HT and OMDM-1

	Nucleus accumbens		Hypothalamus	
	ANA (pmol g^{-1})	2-AG (nmol g^{-1})	ANA (pmol g^{-1})	2-AG (nmol g^{-1})
Vehicle	64.7 \pm 5.5	1.6 \pm 0.2	45.7 \pm 4.7	5.2 \pm 0.3
OMDM-1	67.1 \pm 3.1	2.1 \pm 0.6	55.4 \pm 2.5	3.3 \pm 0.8* ($P = 0.04$)
AA5HT	75.6 \pm 4.8 ($P = 0.08$)	2.6 \pm 0.4* ($P = 0.03$)	43.0 \pm 2.8	3.3 \pm 0.8* ($P = 0.04$)

Abbreviations: AA5HT, *N*-arachidonoyl-ethanolamine; 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; ANA, anandamide; ANOVA, analysis of variance; NAcS, nucleus accumbens shell; OMDM-1, (*R*)-*N*-oleoyl-(1'-hydroxybenzyl)-2'-ethanolamine.

Values shown in the table are means \pm s.e.m. of four experiments. Differences between means were assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. * $P < 0.05$.

pharmacologically the lifetime of the endocannabinoids in the NAcS.

AM251 alone did not modify food intake at the doses used. This might seem in contrast with the extensive literature indicating that the CB₁ antagonist, rimonabant, induces hyporexia. However, some differences were to be expected, since we applied here a single AM251 injection directly into the NAcS, whereas rimonabant has been given systemically. Also in a previous study, rimonabant given intra-NAcS was found to be inactive on food intake (Kirkham *et al.*, 2002). Another possibility is that AM251 does not suppress food intake via actions on the NAc. Curiously, the combination of AA5HT and AM251 reduced food intake in the first hour, compared with vehicle. The same effect was observed with the OMDM-1/AM251 combination in a dose-responsive

manner. This observation might suggest the existence of other endogenous compounds whose inactivation is still inhibited by AA5HT and OMDM-1 and whose 'anorexic' activity is facilitated by CB₁ receptor blockade. One such compound might be oleoylethanolamide, which given systemically together synergizes with rimonabant at reducing food intake (Serrano *et al.*, 2007).

That the NAc is necessary for normal expression of feeding behaviour has been extensively documented (Kelley, 2004). It has also been suggested that the opioidergic system in the NAc is a crucial mediator of the hedonic sensation triggered by food (Peciña and Berridge, 2005). In addition, a functional interaction between opioidergic and cannabinergic systems has been described extensively (Vigano *et al.*, 2005; Christie, 2006). Hence, it is plausible to think that endocannabinoids,

either directly or by interacting with opioids in the NAcS, enhance the rewarding value of food (Cota *et al.*, 2006). However, given the inhibitory nature of endocannabinoids and their localization, we believe that the direct infusion of these molecules into the NAcS would rather inhibit the activity of this nucleus (Hoffman and Lupica, 2000; Manzoni and Bockaert, 2001; Pistis *et al.*, 2002; Robbe *et al.*, 2002; Lupica *et al.*, 2004). Actually, Kelley and Swanson (1997) and Stratford and Kelley (1999) demonstrated that intra-NAcS infusions of GABA agonists and glutamate antagonists stimulate food intake with a concurrent activation of food-related hypothalamic areas, mainly the LH. This effect might be due to the fact that infusions GABA agonists in this nucleus produce an inhibition of GABAergic medium spiny neurons (MSNs) and, as a consequence, disinhibition of the LH. Endocannabinoids, either exogenously injected or locally produced and degraded in a way inhibited by AA5HT and OMDM-1, might act at CB₁ receptors to inhibit GABA release from MSNs, thus also resulting in the disinhibition of the LH. On the other hand, endocannabinoids could suppress the inhibitory tone on LH neurons acting directly in this nucleus (Jo *et al.*, 2005). Our data reveal that the infusion of ANA, AA5HT and OMDM-1 into the NAcS readily activates not only the LH but also other hypothalamic nuclei, that is, the ARC, DMH and PVN. The role of these nuclei in the regulation of energy balance has been demonstrated by others (Bellinger and Bernardis, 2002; Bali and Kovács, 2003; Berthoud, 2004; Wynne *et al.*, 2005; Gooley *et al.*, 2006; Morton *et al.*, 2006). At present, we do not know which neurotransmitters are released by these F-ir neurons. However, future experiments will shed a light into this question.

In support of the hypothesis that AA5HT injected into the NAcS acts selectively in this nucleus, and that, hence, the other drugs administered here in this manner, which have similar lipophilicity to AA5HT, also do not diffuse into other nuclei and do not cause their effects in the hypothalamus by acting directly in this brain area, we found that AA5HT caused a significant elevation of 2-AG levels in the NAc, whereas reducing it in the hypothalamus. There was also a trend to increase ANA levels in the NAc ($P=0.08$), whereas no changes were observed in the hypothalamus. OMDM-1 also tended to increase ANA and 2-AG levels in the NAc, whereas it significantly reduced 2-AG levels in the hypothalamus. The increase of endocannabinoids in the NAc is very likely a result of the pharmacological activity of the drugs, which, by inhibiting the degradation of endocannabinoids, should elevate their tissue levels. Conversely, it is possible that the reduction of 2-AG levels observed in the hypothalamus is a result of food intake. In fact, it was previously shown (Kirkham *et al.*, 2002) that food intake is accompanied by a decrease in hypothalamic 2-AG, but not ANA, levels in rats. The lower efficacy of OMDM-1 at elevating endocannabinoid levels, compared to AA5HT, again supports our hypothesis that the two compounds are producing their pharmacological effects by inhibiting endocannabinoid degradation in the NAcS. In fact, endocannabinoid levels were measured in tissues dissected after 90 min from administration of the two drugs and OMDM-1 only produced significant effects on food intake after 4 h from its

administration, whereas the effects of AA5HT were observed already after 1 h. The different time of onset of the effects of the two drugs might be due to pharmacokinetic factors and to their different mechanism of action.

In summary, our study indicates that infusion of ANA or of endocannabinoid level enhancers into the NAcS increases food intake very likely through the activation of CB₁ receptors, as this effect was blocked with a CB₁ antagonist. Cannabinoids administered in this way activate the hypothalamic nuclei involved in food intake regulation, thus supporting the notion that there is a functional relationship between the NAcS and the hypothalamus. This is the first study showing that indirect activators of CB₁ receptors such as AA5HT and OMDM-1 can enhance food intake. This observation might have important clinical implications for the potential use of AA5HT to control eating disorders, like anorexia. Furthermore, it might suggest that conditions causing impairment of endocannabinoid inactivation with subsequent elevation of endocannabinoid levels in the NAcS might contribute to the development of hyperphagia and, eventually, obesity. Our study supports an important role of the endocannabinoids in the NAcS in the activation of brain regions such as the hypothalamus (Jamshidi and Taylor, 2001; Tucci *et al.*, 2004) or the brainstem (Miller *et al.*, 2004), that is, in other nuclei involved in feeding. Our work suggests the existence of an endocannabinoid/CB₁-mediated functional relationship between the NAcS and the hypothalamus.

Acknowledgements

This study was supported by Grant IN224306 from DGAPA-UNAM to OPG and a fellowship from CONACyT to ESG. We thank Khalil Guzmán for help in animal handling. This work is part of ESG's Doctoral Dissertation in the Programa de Investigación Biomédica of UNAM.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

References

- Bali B, Kovács KJ (2003). GABAergic control of neuropeptide gene expression in parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci* **18**: 1518–1526.
- Bellinger LL, Bernardis LL (2002). The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav* **76**: 431–442.
- Berthoud HR (2004). Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol Behav* **81**: 781–793.
- Bisogno T, Melck D, De Petrocellis L, Bobrov MY, Gretskaya NM, Bezuglov VV *et al.* (1998). Arachidonoylserotonin and other novel inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 515–522.
- Chambers AP, Sharkey KA, Koopmans HS (2004). Cannabinoid (CB₁) receptor antagonist, AM 251, causes a sustained reduction of daily food intake in the rat. *Physiol Behav* **82**: 863–869.

- Christie MJ (2006). Opioid and cannabinoid receptors: friends with benefits or just close friends? *Br J Pharmacol* **148**: 385–386.
- Cooper SJ (2004). Endocannabinoids and food consumption: comparison with benzodiazepine and opioid palatability-dependent appetite. *Eur J Pharmacol* **500**: 37–49.
- Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Gröbler Y, Flachskman C, Schubert M *et al.* (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* **112**: 423–431.
- Cota D, Tschöp MH, Horvath TL, Levine AS (2006). Cannabinoids, opioids, and eating behavior: the molecular face of hedonism. *Brain Res Rev* **51**: 85–107.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Aral Z *et al.* (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* **410**: 822–825.
- Di Marzo V, Matias I (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* **8**: 585–589.
- Fride E, Bregman T, Kirkham TC (2005). Endocannabinoids and food intake: newborn suckling and appetite regulation in adulthood. *Exp Biol Med* **230**: 225–234.
- Gamber KM, MacArthur H, Westfall TC (2005). Cannabinoids augment the release of neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Neuropharmacology* **49**: 646–652.
- Gooley JJ, Schomer A, Saper CB (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci* **9**: 398–407.
- Hanlon EC, Baldo BA, Sadeghian K, Kelley AE (2004). Increase in food intake or food seeking behavior induced by GABAergic, opioid, or dopaminergic stimulation of the nucleus accumbens: is it hunger? *Psychopharmacology* **172**: 241–247.
- Hildebrandt AL, Kelly-Sullivan DM, Black SC (2003). Antiobesity effects of chronic cannabinoid CB1 receptor antagonist treatment in diet-induced obese mice. *Eur J Pharmacol* **462**: 125–132.
- Hoffman AF, Lupica CR (2000). Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: a comparison with opioids. *J Neurophysiol* **85**: 72–83.
- Jamshidi N, Taylor DA (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol* **134**: 1151–1154.
- Jo YH, Chen YJ, Chua Jr C, Talmage DA, Role LW (2005). Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. *Neuron* **48**: 1055–1066.
- Kelley AE (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev* **27**: 765–776.
- Kelley AE, Swanson CJ (1997). Feeding induced by blockade of AMPA and kainite receptors within the ventral striatum: a microinfusion mapping study. *Behav Brain Res* **89**: 107–113.
- Kirkham TC, Williams CM, 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. *Br J Pharmacol* **136**: 550–557.
- Lupica CR, Riegel AC, Hoffman AF (2004). Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. *Br J Pharmacol* **143**: 227–234.
- MacDonald AF, Billington CJ, Levine AS (2003). Effects of the opioid antagonist naltrexone on feeding induced by DAMGO in the ventral tegmental area and in the nucleus accumbens shell region in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**: 999–1004.
- Maldonado-irizarry CS, Swanson CJ, Kelley AE (1995). Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control feeding behavior via the lateral hypothalamus. *J Neurosci* **15**: 6779–6788.
- Manzoni OJ, Bockaert J (2001). Cannabinoids inhibit GABAergic synaptic transmission in mice nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* **412**: R3–R5.
- Martinez-Gonzalez D, Bonilla-Jaime H, Morales-Otal A, Henriksen SJ, Velazquez-Moctezuma J, Prospero-García O (2004). Oleamide and anandamide effects on food intake and sexual behavior of rats. *Neurosci Lett* **364**: 1–6.
- Miller CC, Murray TF, Freeman KG, Edwards GL (2004). Cannabinoid agonist, CP 55,940, facilitates intake of palatable foods when injected into the hindbrain. *Physiol Behav* **80**: 611–616.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* **443**: 289–295.
- Ortata G, Ligresti A, De Petrocellis L, Morera E, Di Marzo V (2003). Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide uptake. *Biochem Pharmacol* **65**: 1473–1481.
- Osei-Hyiaman D, Depetrillo M, Harvey-White J, Bannan AW, Cravatt BF, Kuhar MJ *et al.* (2005a). Cocaine- and amphetamine-related transcript is involved in the orexigenic effect of the endogenous anandamide. *Neuroendocrinology* **81**: 273–282.
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S *et al.* (2005b). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* **115**: 1298–1305.
- Paxinos G, Watson C (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Raven Press: New York, NY.
- Peciña S, Berridge KC (2005). Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do μ -opioids caused increased hedonic impact of sweetness? *J Neurosci* **25**: 11777–11786.
- Pistis M, Muntoni AL, Pillolla G, Gessa GL (2002). Cannabinoids inhibit excitatory inputs to neurons in the shell of the nucleus accumbens: an *in vivo* electrophysiological study. *Eur J Neurosci* **15**: 1795–1802.
- Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ (2002). Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 8384–8388.
- Serrano A, del Arco I, Pavón FJ, Macías M, Perez-Valero V, Rodríguez de Fonseca F. (2007). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A (Rimonabant) enhances the metabolic benefits of long term treatment with oleylethanolamide in Zucker rats. *Neuropharmacology* (in press, available online 24 March 2007).
- Söderpalm AH, Berridge KC (2000). Food intake after diazepam, morphine or muscimol: microinjections in the nucleus accumbens shell. *Pharmacol Biochem Behav* **66**: 429–434.
- Stratford TR, Kelley AE (1997). GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci* **17**: 4434–4440.
- Stratford TR, Kelley AE (1999). Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J Neurosci* **19**: 11040–11048.
- Stratford TR, Swanson CJ, Kelley AE (1998). Specific changes in food intake elicited by blockade or activation of glutamate receptors in the nucleus accumbens shell. *Behav Brain Res* **93**: 43–50.
- Tucci SA, Rogers EK, Korbonits M, Kirkham TC (2004). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. *Br J Pharmacol* **143**: 520–523.
- Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S, RIO-Europe Study Group (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**: 1389–1397.
- Vigano D, Rubino T, Parolaro D (2005). Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions. *Pharmacol Biochem Behav* **81**: 360–368.
- Wiley JL, Burston JJ, Leggett DC, Alekseeva OO, Razdan RK, Mahadevan A *et al.* (2005). CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br J Pharmacol* **145**: 293–300.
- Will MJ, Franzblau EB, Kelley AE (2003). Nucleus accumbens μ -opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network. *J Neurosci* **23**: 2882–2888.
- Williams CM, Kirkham TC (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology* **143**: 315–317.
- Williams CM, Kirkham TC (2002). Observational analysis of feeding induced by Δ^9 -THC and anandamide. *Physiol Behav* **76**: 241–250.
- Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S (2005). Appetite control. *J Endocrinol* **184**: 291–318.
- Zhang H, Corkern M, Stoyanova I, Patterson LM, Tian R, Berthoud HR (2003). Appetite-inducing accumbens manipulation activates hypothalamic orexin neurons and inhibits POMC neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**: R1436–R1444.