



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

---

---

**“EFECTO DEL POLIPÉPTIDO ACTIVADOR DE LA  
ADENILATO CICLASA PITUITARIA (PACAP) SOBRE LA  
ACTIVIDAD NEURONAL DEL NÚCLEO ACCUMBENS”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN  
PSICOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**SONIA ORTEGA TINOCO**

**DIRECTOR:**

Dr. Salvador Leonardo Hernández López

**REVISOR:**

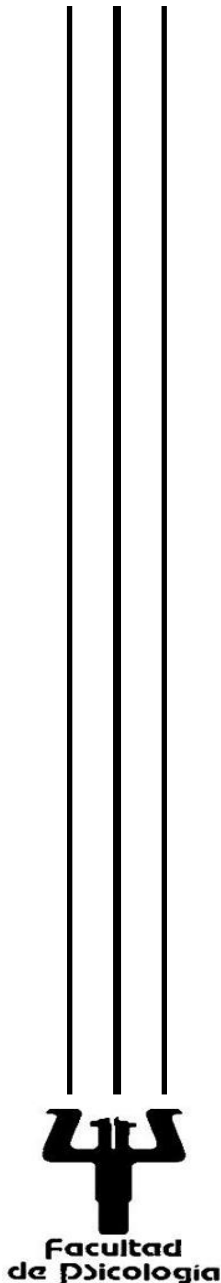
Dr. Hugo Sánchez Castillo

**SINODALES:**

Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez

Dr. Jaime Eduardo Calixto González

Dra. Violeta Giselle López Huerta





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.

# **“EFECTOS DEL POLIPÉPTIDO ACTIVADOR DE LA ADENILATO CICLASA PITUITARIA (PACAP) SOBRE LA ACTIVIDAD NEURONAL DEL NÚCLEO ACCUMBENS”**

RESUMEN

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN

2. ANTECEDENTES

2.1 Trastornos alimentarios

2.2.1 Trastorno por atracones

2.2 Recompensa y motivación

2.2.1 Motivación Incentiva

2.2.2 Circuito de Recompensa

2.2.3 Circuito hedónico

2.2.4 Descripción anatómica y morfológica del NAc

2.2.5 NAcSh y conducta de ingesta

2.3 PACAP

2.3.1 Vías de señalización del PACAP

2.3.2 Efectos del PACAP en la conducta de ingesta

3. JUSTIFICACIÓN

4. HIPÓTESIS

4.1 Hipótesis general

4.2 Hipótesis específicas

5. OBJETIVOS

- 5.1 Objetivo General
- 5.2 Objetivos específicos
- 6. MÉTODO
  - 6.1 Sujetos
  - 6.2 Obtención de tejido
  - 6.3 Electrofisiología
  - 6.4 Imagenología de calcio
  - 6.5 Análisis de imágenes
  - 6.6 Marcaje celular
  - 6.7 Farmacología
  - 6.8 Análisis estadístico
- 7. RESULTADOS
  - 7.1 El efecto del PACAP 1-38 es dependiente de la concentración
  - 7.2 El PACAP 1-38 incrementó la actividad global de las NEM del NAcSh
  - 7.3 El efecto del PACAP 1-38 fue bloqueado por PACAP 6-38, antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub>
  - 7.4 Identificación electrofisiológica de las NEM de proyección NAcSh
  - 7.5 El PACAP 1-38 incrementa la frecuencia de disparo de las NEM del NAcSh
  - 7.6 El antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub> bloquea el incremento de la frecuencia de disparo producida por PACAP 1-38.
- 8. DISCUSIÓN
- 9. CONCLUSIONES
- 10. REFERENCIAS

## RESUMEN

El incremento de la obesidad es considerado un problema de salud pública a nivel mundial. Uno de los trastornos alimentarios asociados al sobrepeso es el trastorno por atracones de acuerdo con el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales. Este trastorno se caracteriza por un consumo excesivo de alimento en un periodo breve de tiempo, aproximadamente dos horas. El consumo excesivo de alimentos generalmente incluye el consumo de alimentos de alto contenido calórico como las grasas y los azúcares. Estos alimentos por su naturaleza son altamente apetecibles o palatables. Los periodos excesivos de ingesta de alimentos palatables en el trastorno por atracones, se han relacionado con conductas motivacionales asociadas a la recompensa y al valor hedónico que tienen estos alimentos. Se sabe que el núcleo accumbens (NAc) participa de manera robusta en la modulación de conductas motivadas, en la recompensa y en el valor hedónico que generan ciertos alimentos.

Estudios previos han reportado que altos niveles del polipéptido activador de la enzima adenilato ciclasa (PACAP 1-38) en el NAc disminuye el consumo de alimentos palatables en un modelo de ingesta tipo atracón. Esto es, que el PACAP 1-38 tiene efectos anorexigénicos específicos. A pesar de estos hallazgos, los efectos del PACAP 1-38 en el NAc no han sido suficientemente estudiados.

El objetivo del presente trabajo de tesis fue investigar el efecto del PACAP 1-38 sobre la actividad de las neuronas espinosas medianas (NEM), las cuales constituyen la principal población, aproximadamente el 95%, de las neuronas del NAc. Para lograr este objetivo se utilizaron técnicas electrofisiológicas, farmacológicas y de imagenología de calcio. Los resultados obtenidos mediante la

técnica de imagenología de calcio mostraron que el PACAP 1-38, en una concentración de 25 nM, aumenta la actividad global de las neuronas del núcleo accumbens shell (NAcSh). Asimismo, se demostró, mediante técnicas electrofisiológicas, que el PACAP 1-38 incrementa la frecuencia de disparo en las NEM y que este efecto es mediado a través de receptores PAC<sub>1</sub>. Los resultados del presente trabajo podrían ayudar a entender los mecanismos anorexigénicos del PACAP 1-38, así como el papel del NAc en las alteraciones de las conductas de ingesta de alimentos. Particularmente, la ingesta por atracones, la cual está estrechamente asociada a los trastornos de tipo metabólico y la obesidad.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>5-HT</b>	Serotonina	<b>M1/M4</b>	Receptores muscarínicos tipo m1 y tipo m4
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa	<b>Mg<sub>2</sub><sup>+</sup>-ATP</b>	Mg <sub>2</sub> -adenosín trifosfato
<b>ACh</b>	Acetilcolina	<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico	<b>mGluR</b>	Receptores metabotrópicos de glutamato
<b>AMPA</b>	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico	<b>MgSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O</b>	Monohidrato de sulfato de magnesio
<b>Amy</b>	Amígdala	<b>min</b>	Minuto
<b>APA</b>	Asociación Americana de Psiquiatría	<b>ml</b>	Mililitro
<b>ARH</b>	Núcleo arqueado del hipotálamo	<b>mOsm</b>	Miliosmoles
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato	<b>mPFC</b>	Corteza prefrontal medial
<b>BS</b>	Tallo cerebral	<b>ms</b>	Milisegundo
<b>BLA</b>	Amígdala basolateral	<b>mV</b>	Milivoltio
<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b>	Glucosa	<b>mM</b>	Milimolar

<b>CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O</b>	Cloruro de calcio monohidratado	<b>N-terminal</b>	Extremo amino-terminal
<b>CALB1</b>	Calbindina	<b>Na<sub>2</sub>GTP</b>	Sal hidratada guanosina 5'-trifosfato
<b>CALB2</b>	Calretinina	<b>NAc</b>	Núcleo accumbens
<b>ChAT</b>	Enzima colina-acetiltransferasa	<b>NAcC</b>	Núcleo accumbens <i>core</i>
<b>CICUAL</b>	Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio	<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>CNEGSR</b>	Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva	<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sodio
<b>CNQX</b>	Cianquixalina	<b>NAcSh</b>	Núcleo accumbens <i>shell</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono	<b>NEM</b>	Neuronas espinosas medianas
<b>CPP</b>	Condicionamiento de Preferencia de Lugar	<b>nm</b>	Nanómetros
<b>CPu</b>	Caudado Putamen	<b>nM</b>	Nanomolar
<b>D-p-CI-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>-VIP</b>	Antagonista del VIP	<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato



<b>DAG</b>	Diacilglicerol	<b>NPY</b>	Neuropéptido Y
<b>D1-NEM</b>	Neuronas espinosas medianas que expresan el receptor dopaminérgico D1	<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>D2-NEM</b>	Neuronas espinosas medianas que expresan el receptor dopaminérgico D2	<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>DA</b>	Dopamina	<b>pA</b>	Picoamperio
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>PA8</b>	Antagonista del receptor PAC <sub>1</sub>
<b>DSM-5</b>	Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, 5 <sup>a</sup> edición	<b>PACAP</b>	Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa
<b>E</b>	Estímulo	<b>PACAP 1-38</b>	Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa 1-38
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración efectiva media	<b>PACAP 1-27</b>	Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa 1-27

<b>EGTA</b>	Etilenglicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter)-N, N, N', N'-tetracético	<b>PACAP 6-38</b>	Potente antagonista del receptor PAC <sub>1</sub>
<b>EO</b>	Opioides endógenos	<b>PAC<sub>1</sub></b>	Receptor PAC <sub>1</sub>
<b>Fi</b>	Fluorescencia en cualquier cuadro de video	<b>PBN</b>	Núcleo parabraquial
<b>Fo</b>	Fluorescencia basal	<b>PBS</b>	Solución salina de fosfatos
<b>GABA</b>	ácido $\gamma$ -aminobutírico	<b>Ph</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>GABA<sub>A</sub></b>	Receptor ionotrópico tipo A para GABA	<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>GABA<sub>B</sub></b>	Receptor metabotrópico tipo B para GABA	<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>GCG</b>	Glucagón	<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>GHRH</b>	Hormona reguladora del crecimiento	<b>POMC</b>	Neuronas que expresan la hormona pro-opiomelanocortina
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-metanosulfónico	<b>PV</b>	Parvalbúmina
<b>Hipp</b>	Hipotálamo	<b>PVN</b>	Núcleo paraventricular del hipotálamo

<b>iGluR</b>	Receptor ionotrópico de glutamato	<b>R</b>	Respuesta
<b>I-F</b>	Relación corriente-frecuencia	<b>Ri</b>	Resistencia de entrada
<b>I-V</b>	Relación corriente-voltaje	<b>RMTg</b>	Núcleo rostromedial tegmental
<b>INSP</b>	Instituto de Salud Pública	<b>S</b>	Segundo
<b>IP3</b>	Inositol 3-fosfato	<b>SCT</b>	Secretina
<b>K-gluconato</b>	Gluconato de potasio	<b>SN</b>	Sistema Nervioso
<b>KCl</b>	Cloruro de Potasio	<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>KHz</b>	Kilohertz	<b>SNP</b>	Sistema Nervioso Periférico
<b>Kir</b>	Corriente de potasio rectificadora entrante	<b>SOM</b>	Somatostatina
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de potasio	<b>VIP</b>	Péptido intestinal vasoactivo
<b>L</b>	Litro	<b>VIP 6-28</b>	Antagonista del VIP
<b>LH</b>	Hipotálamo lateral	<b>VP</b>	Pálido ventral
<b>LHb</b>	Habénula lateral	<b>VPAC<sub>1</sub></b>	Receptor VPAC <sub>1</sub>
<b>LDTg</b>	Núcleo laterodorsal tegmental	<b>VPAC<sub>2</sub></b>	Receptor VPAC <sub>2</sub>

<b>LPO</b>	Área preóptica lateral	<b>VTA</b>	Área Ventral Tegmental
<b>MΩ</b>	Megaohmios	<b>μm</b>	micrómetro
<b>mM</b>	Milimolar		

## 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el consumo de alimentos con un alto contenido calórico ha aumentado significativamente a nivel mundial (Micha, *et al.*, 2014). La obesidad y el sobrepeso son en la actualidad un serio problema de salud pública. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad y el sobrepeso tienen prevalencia alta en todas las regiones de América, ya que el 62% de los adultos tienen sobrepeso o son obesos. Este padecimiento afecta también a la población de niños y adolescentes, pues entre el 20% y 25% de esta población está afectada por el sobrepeso u obesidad (OMS, 2018). La obesidad, la bulimia, la anorexia, el trastorno por atracón y los trastornos alimentarios en general (Fig. 1) se han vuelto más prominentes en los últimos años, lo cual ha aumentado el interés por comprender el problema y los posibles tratamientos para contrarrestarlo (Berridge, 2009).

<b>Trastornos alimentarios y de la ingestión de alimentos de acuerdo con la clasificación del DSM-5</b>	
<b>1</b>	Pica
<b>2</b>	Trastorno de rumiación
<b>3</b>	Trastorno de evitación/restricción de la ingestión de alimentos
<b>4</b>	Anorexia nerviosa
<b>5</b>	Bulimia nerviosa
<b>6</b>	Trastorno por atracones

<b>7</b>	Otro trastorno alimentario o de la ingestión de alimentos especificados
<b>8</b>	Trastorno alimentario o de la ingestión de alimentos no especificado

*Figura 1. Trastornos alimentarios y de la ingestión de alimentos.* Listado de los trastornos relacionados a la ingesta de acuerdo con el DSM-5 (APA, 2013).

La ingesta de alimentos con un alto contenido en grasas o azúcares predispone a los individuos a padecer enfermedades concomitantes como diabetes, hipertensión, cardiopatía isquémica y cáncer (OMS, 2018). Por esa razón, es importante conocer los factores conductuales, psicológicos y fisiológicos que subyacen a dichos padecimientos. Entender los trastornos alimentarios desde diferentes perspectivas, nos permitirá encontrar posibles tratamientos para mejorar la calidad de vida de los seres humanos.

Actualmente, el control del apetito y los trastornos alimentarios son abordados desde una perspectiva que involucra tanto a procesos fisiológicos, motivacionales, psicológicos y socioculturales (Roger y Smit, 2000). Esta perspectiva sostiene que la conducta de ingesta, a pesar de ser una necesidad fisiológica primaria, es regulada no solamente por procesos homeostáticos, sino también, motivacionales. Al igual que la adicción a sustancias como la cocaína, la heroína o el alcohol, existe también una adicción en el consumo de alimentos de alto contenido calórico como las grasas o los azúcares (Lutter y Nestler, 2009).

Así, los trastornos alimentarios, al igual que la adicción a las drogas, se caracterizan por presentar ciertos patrones conductuales, motivacionales y

fisiológicos. Se sabe que tanto en el abuso de la ingesta de alimentos palatables como en el consumo de drogas se presenta el síndrome de abstinencia. Además, a pesar de las consecuencias negativas que dichas sustancias o drogas tienen para el organismo, las personas persisten en el consumo excesivo de alimentos o drogas (Iemolo, *et al.*, 2014).

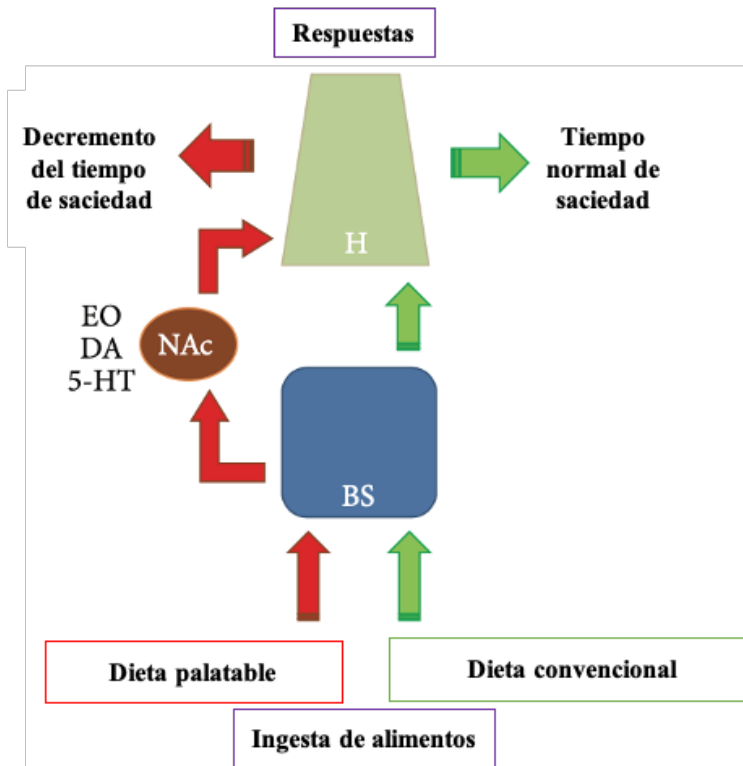
Pese a que las drogas de abuso que se mencionan anteriormente y la ingesta de alimentos palatables tienen mecanismos de acción distintos, comparten una vía en común dentro del sistema mesolímbico. Esta vía participa en la modulación de conductas motivadas (Lutter y Nestler, 2009). Más adelante se explicará a detalle el sistema mesolímbico.

Como se mencionó anteriormente, la ingesta de alimentos está regulada por dos vías complementarias: la homeostática y la hedónica. La vía homeostática es la encargada del control del equilibrio energético y el gasto calórico. En el sistema nervioso central (SNC), el hipotálamo, particularmente el núcleo arqueado (ARH), tiene un papel crucial en esta función (Coll, 2007; Aponte *et al.*, 2011; Atasoy *et al.*, 2012). Existen dos principales poblaciones de neuronas que regulan la ingesta de alimento en el ARH. Por una parte, están las neuronas que expresan el neuropéptido Y (NPY), cuya activación estimula la ingesta de alimento; esto es, que provoca efectos orexigénicos (Aponte *et al.*, 2011; Atasoy *et al.*, 2012). Por otra parte, están las neuronas que expresan la hormona pro-opiomelanocortina (POMC), cuya actividad tiene efectos anorexigénicos (Coll, 2007; Aponte *et al.*, 2011). Por su localización en la eminencia media, cerca de la barrera hematoencefálica, las neuronas del núcleo ARH censan e integran las señales hormonales transmitidas a través del torrente sanguíneo, como los niveles de leptina e insulina y los cambios

en la concentración de glucosa, para controlar el gasto de energía y la ingesta de alimento (Cone, 2005).

Por su parte, la vía hedónica está asociada al deseo de ingerir alimentos que son altamente apetecibles o palatables y que, por lo general, tienen un alto contenido calórico sin importar si la vía homeostática da señales de saciedad (Berthoud, 2006; Avena, *et al.*, 2009; Macedo *et al.*, 2016). Dos estructuras fundamentales asociadas a la vía hedónica son el NAc y el área ventral tegmental (VTA) (Berridge, 2009; Lutter y Nestler, 2009). Por lo anterior, se puede concluir, primero, que la parte motivacional y hedónica tiene un papel fundamental en la búsqueda y el consumo de alimentos palatables y, segundo, que la vía hedónica puede sobreponerse a la vía homeostática. El consumo excesivo de alimentos con alto contenido calórico puede llegar a convertirse en un trastorno y, como consecuencia, producir sobrepeso y modificar fisiológicamente las señalizaciones en los circuitos cerebrales (Fig. 2) asociados a la ingesta (Scofield *et al.*, 2016; de Macedo *et al.*, 2016).





**Figura 2. Señalización ante la ingesta de alimentos.** Esquematización de la vía de señalización activada por una dieta convencional (vía verde) y vía de señalización inducida por una dieta palatable (vía roja). Hipotálamo (H), NAc (núcleo accumbens y tallo cerebral (BS). EO: opioides endógenos, dopamina (DA) y serotonina (5-HT). Imagen modificada de (de Macedo *et al.*, 2016).

Uno de los trastornos alimentarios considerado como adicción a la comida es el trastorno por atracón (Corwin, 2006; Cottone *et al.*, 2012; Avena *et al.*, 2009). De acuerdo con el DSM-5, los episodios del trastorno por atracón se caracterizan por un excesivo, rápido y compulsivo consumo de alimentos en periodos de tiempo cortos, aproximadamente dos horas, seguido de una restricción de dichos alimentos (Corwin, 2006; APA, 2013).

Este trastorno alimenticio representa un ejemplo en el cual la vía hedónica puede anular a la vía homeostática, puesto que un alimento con contenido altamente calórico puede ser preferido a un alimento que aporte los nutrientes necesarios (Avena, *et al.*, 2009; Drewnowski *et al.*, 2012). Así, una comida apetecible posee, respecto a una nutritiva, un mayor efecto en la motivación. Aunque teóricamente el sistema homeostático y el sistema hedónico se puedan

separar, sin duda, ambos están relacionados fisiológicamente y esto influye en la conducta de la ingesta (Lutter y Nestler, 2009).

El objetivo principal del presente trabajo es explorar y describir los aspectos fisiológicos relacionados a la motivación en la ingesta de alimentos. Utilizando herramientas electrofisiológicas, farmacológicas y de imagenología de calcio, se estudiará el NAc el cual se ha propuesto como un posible blanco terapéutico en presencia de fármacos anorexigénicos que reducen el consumo de alimentos de alto contenido calórico.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 *Trastornos alimentarios***

El sobrepeso y la obesidad son un problema de salud pública a nivel internacional y nacional en poblaciones adultas, juveniles e infantiles. De acuerdo con el Instituto de Salud Pública (INSP) en 2012, México es el segundo lugar en obesidad en adultos y el primer lugar en obesidad infantil. De acuerdo con la OMS, la obesidad y el sobrepeso incrementa el riesgo de padecer enfermedades concomitantes como la diabetes, hipertensión, dislipidemias, enfermedades cardiovasculares, entre otras. En general, el sobrepeso y la obesidad aumenta los trastornos metabólicos y determina un crecimiento significativo en la morbilidad y la mortalidad (OMS, 2018).

Los trastornos alimentarios se caracterizan por tener alteraciones graves en la conducta alimentaria (APA, 2013). Un ejemplo es que los pacientes que presentan una ingesta baja o alta de alimentos, o que padecen algún tipo de trastorno alimentario, tienden a aumentar o a perder peso de manera radical, lo cual es un problema grave en la salud mundial (OMS, 2018). Entre los trastornos

alimentarios con más relevancia en México están la anorexia, la bulimia y la compulsión para comer (CNEGSR, 2004).

### **2.1.1 Trastorno por atracón**

Uno de los trastornos más frecuentes en población mexicana que padece obesidad es el trastorno por atracones (CNEGSR, 2004). Cabe mencionar que este trastorno ha incrementado de manera rápida en comparación con la bulimia y la anorexia (Cuadro y Baile, 2015). El trastorno por atracones se reconoció de manera formal en el DSM-5 en 2013. Este trastorno se caracteriza por un consumo excesivo de alimento en un periodo breve de tiempo, aproximadamente dos horas, acompañado por una sensación de pérdida de control (APA, 2013).

La conducta de ingesta que se presenta en el trastorno por atracones se asocia a varios trastornos alimentarios y al padecimiento de comorbilidades psiquiátricas. Ejemplo de ello es que los pacientes que padecen trastorno por atracón presentan uno o más signos relacionados a trastornos de ansiedad y trastornos de depresión. En un modelo animal, se observó que cuando se elimina la sacarosa de la dieta las ratas, éstas experimentan ansiedad, rechinan los dientes y tienen comportamientos más agresivos (Avena *et al.*, 2008). Estas conductas ansiosas o depresivas se presentan tanto en los periodos de ingesta, como en los periodos de abstinencia (Hudson *et al.*, 2007; Marano *et al.*, 2010; Peterson *et al.*, 2012).

En la actualidad, existen diversos tratamientos terapéuticos desarrollados específicamente para el trastorno por atracón, como las terapias cognitivo-

conductuales. Sin embargo, aún no se cuenta con un tratamiento farmacológico específico para este tipo de trastorno. Investigaciones recientes sugieren la hipótesis de que los sujetos con trastorno por atracón presentan una desregulación dopaminérgica y GABAérgica en la vía mesolímbica (Corwin, *et al.*, 2016), que está asociada a conductas de recompensa y a conductas motivadas.

## **2.2 Recompensa y motivación**

Anteriormente se entendía a la recompensa como un estímulo agradable que subyace en el gusto consciente de dicho estímulo (Brown, 1993). También se pensaba que la recompensa y los estados motivados eran directamente regulados por estados de aversión y desagrado o de reforzamiento agradable, así como de la emisión de respuestas operantes. En otras palabras, que la motivación y la recompensa responden de acuerdo con el esquema de estímulo-respuesta (E-R).

Sin embargo, esta definición no abarca la complejidad de lo que es en realidad la recompensa, ya que el concepto de recompensa incluye múltiples variables como estados emocionales, motivacionales y hedónicos de cada individuo. Brevemente, se entiende a la emoción como una respuesta cognitiva a la información externa (Coleman *et al.*, 2011). A la motivación como una conducta aprendida que responde a reforzamientos (Bolles, 2006). Lo hedónico, por su parte, se define como el grado de placer que se le asigna a los reforzadores (Berridge y Kringelbach, 2016). Estas variables relacionadas a la recompensa funcionan de manera conjunta y participan en la toma de decisiones y en la conducta ante estímulos reforzantes.

Teniendo en cuenta que la recompensa y la motivación no son hechos separados y que ambos son un aprendizaje, Bindra, Bolles y Toates propusieron el concepto de «aprendizaje incentivo» en los años setenta. El «aprendizaje incentivo» consiste en que los estados afectivos, los procesos hedónicos y los procesos motivacionales son desencadenados tanto por estímulos condicionados como por estímulos incondicionados (Toates, 1944; Bindra, 1974).

Las aportaciones que desarrollaron estos autores nos permiten entender a la motivación como un proceso de aprendizaje que se da mediante recompensas. Además, los conceptos de incentivo y de motivación propuestos por Toates y Bindra son la base de la teoría de Motivación Incentiva propuesta por Berridge y colaboradores (Berridge y Grill, 1984; Berridge y Kringelbach, 2013).

Uno de los paradigmas más importantes y utilizados para definir a la recompensa y a la motivación es el paradigma de Motivación Incentiva propuesto por Kent Berridge, Terry Robinson y Wayne Aldridge. Estos autores definen a la recompensa como un proceso de aprendizaje; y como todo aprendizaje, involucra un cambio en el comportamiento y es el resultado de la adquisición de conocimiento del mundo (Kandel *et al.*, 2013).

Este aprendizaje por recompensas ocurre mediante procesos de condicionamiento, ya sea de manera directa, mediante estímulos condicionados, o de manera indirecta, mediante estímulos incondicionados (Berridge y Kringelbach 2013). Esto es, el aprendizaje se entiende desde el condicionamiento clásico o condicionamiento pavloviano.

Berridge y colaboradores señalan que el hecho de tener hambre actúa como una señal que sirve para aumentar el incentivo hedónico. Por el contrario, el hecho

de tener un estado fisiológico de saciedad reduce el impacto de estas señales (Berridge *et al.*, 2010). El aprendizaje que se hace a partir de estas asociaciones entre las recompensas dependerá de los estados fisiológicos de cada individuo y del grado hedónico que tengan dichas recompensas (Berridge *et al.*, 2009).

### **2.2.1 Motivación Incentiva**

De acuerdo con el paradigma de Motivación Incentiva, se entiende a la recompensa desde tres tipos de procesos: el primero de ellos es el «gustar» o «*liking*», el segundo es el «desear» o «*wanting*» y el tercero es el «aprendizaje» (Berridge, 2009; Berridge *et al.*, 2010).

El «gustar» es una reacción hedónica objetiva. El «gustar» determina el impacto hedónico que tiene una recompensa (Berridge *et al.*, 2010). Un ejemplo de esto es cuando se compra un alimento y, al ingerirlo, hay una sensación de placer.

El «desear», por otra parte, está regulado por la saliencia del incentivo. La saliencia del incentivo se entiende como la motivación que se tiene ante la recompensa, esto es, el valor hedónico de los estímulos va a aumentar o disminuir dependiendo de los cambios o déficits fisiológicos relevantes para el sujeto como el hambre, la sed y el sexo (Bolles, 2006). También, cabe mencionar que este valor motivacional se puede potenciar por un emparejamiento con otro estímulo que tiene por sí mismo un valor hedónico.

Un ejemplo sencillo para entender el concepto de valor hedónico es que una persona, al encontrarse en un estado fisiológico de hambre, va a valorar más un plato de comida en comparación con una persona que está satisfecha. Así, el plato

de comida va a poseer un mayor valor hedónico para el individuo que está hambriento que para uno que está satisfecho.

Finalmente, para concluir el proceso de recompensa, el aprendizaje se logra por asociaciones y predicciones de la o las recompensas condicionadas o incondicionadas. Esto es, por medio de condicionamiento clásico (Berridge *et al.*, 2009).

Este aprendizaje por recompensa ya sea a la comida o a hacia una droga, se ha asociado a estructuras cerebrales específicas como la vía mesolímbica (Volkow *et al.*, 2017), esta vía se especificará a detalle en los siguientes apartados. La vía mesolímbica, en la adicción a las drogas y en la adicción a la comida, tiene un papel importante en los mecanismos de recompensa. Es importante subrayar esto, puesto que, teóricamente, tiene implicaciones potenciales para comprender los trastornos alimentarios (Berridge, 2009).

La teoría de Motivación Incentiva propone que el «gustar» y el «desear», que normalmente son dos procesos que ocurren de manera simultánea, son moduladas por diferentes estructuras cerebrales (Berridge *et al.*, 2010; Berridge y Kringelbach, 2016).

Las conductas de «gustar» y «desear» son reguladas, principalmente, por el sistema mesolímbico. Sin embargo, a pesar de que estos procesos comparten varias estructuras cerebrales como el núcleo accumbens y el hipotálamo lateral, las aferencias y eferencias que regulan estos procesos son diferentes (Berridge *et al.*, 2010), este tema se desarrollará a detalle más adelante. Las estructuras cerebrales que regulan el «gustar» son el núcleo accumbens, el pálido ventral y el tronco encefálico, además participan señales neuroquímicas como la de la orexina y la de

los endocannabinoides. Estas señalizaciones y estructuras participan en la amplificación de las señales hedónicas. Por otro lado, las estructuras que participan en la modulación del «desear» son las mesolímbicas y circuitos corticales, asimismo participan señalizaciones dopaminérgicas (Berridge *et al.*, 2010).

Al ser los procesos de aprendizaje esenciales para todo ser vivo, el entendimiento de los mecanismos fisiológicos que subyacen a las conductas de ingesta es de suma importancia para la investigación. Si estos mecanismos son alterados, las señales relacionadas al «gustar» y al «desear» se sensibilizan y aumentan las conductas compulsivas (Toates, 1944; Bindra, 1974; Lutter y Nestler, 2009; Berridge *et al.*, 2010). Entonces, si el modelo de la Motivación Incentiva se aplica a las personas que padecen obesidad o algún trastorno alimenticio, las conductas ansiosas o compulsivas que estos individuos tienen hacia los alimentos es amplificada y habrá conductas compulsivas como el consumo exagerado de alimentos palatables.

### **2.2.2 Circuito de recompensa**

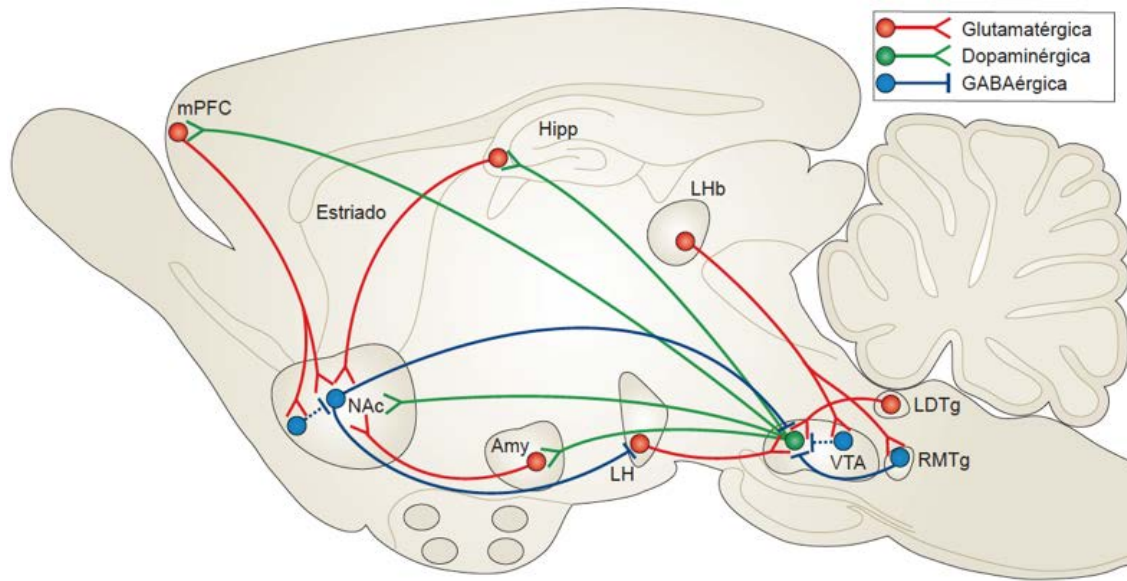
El sistema mesolímbico, también llamado circuito de recompensa (Fig. 3), se caracteriza por regular conductas motivacionales mediando la sensibilidad ante estímulos reforzantes, al igual que en la predicción de reforzamientos (Volkow *et al.*, 2017).

La idea de que el sistema mesolímbico participa en la regulación de los estímulos de recompensa y de placer surge a partir de una gran cantidad de investigaciones que sostienen que el sistema mesolímbico es activado por diversas recompensas primarias como el alimento y la conducta sexual o por recompensas



secundarias como las drogas (Kelley y Berridge, 2002; Castro *et al.*, 2016; Ferrairo *et al.*, 2016). Se sabe, además, que la inactivación de este sistema, mediante técnicas farmacológicas, disminuye la efectividad de las recompensas (Wise, 1985; Mahler, *et al.*, 2007). Esta idea se ha sostenido por varias décadas y, en la actualidad, investigaciones más detalladas han permitido reforzar la idea de que la recompensa y la motivación están reguladas por estructuras mesolímbicas (Wise, 2005; Russo y Nestler, 2013; Berridge y Kringelbach, 2016).

El circuito de recompensa se regula, principalmente, por señalizaciones dopaminérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas. La vía dopaminérgica se origina en el VTA y proyecta hacia el NAc, el hipocampo, la amígdala central, la amígdala basolateral (BLA) y la corteza prefrontal medial (mPFC). A su vez, el VTA recibe proyecciones glutamatérgicas del hipotálamo lateral (LH), de la habénula lateral (LHb) y del núcleo laterodorsal tegmental (LDTg). También el VTA, recibe proyecciones GABAérgicas del núcleo rostromedial tegmental (RMTg), del NAc y de interneuronas locales. Además de la importante entrada dopaminérgica proveniente del VTA, el NAc recibe señales glutamatérgicas de BLA, mPFC, corteza infralímbica, tálamo e hipocampo. Por su parte, el NAc tiene eferencias GABAérgicas hacia el VTA y proyecciones hacia el hipotálamo lateral. Cabe recalcar que esta proyección es relevante, ya que la vía NAc-hipotálamo se ha propuesto como una interfase entre la motivación y las conductas de ingesta (Zahm, 2000; Wise, 2005; Berthoud, 2006; Ambroggi *et al.*, 2011).



**Figura 3. Circuito de recompensa.** Dibujo esquemático que representa las señalizaciones que participan en el circuito de recompensa en un corte sagital de cerebro de ratón. Se muestran las aferencias dopaminérgicas (verde) que van desde el VTA hacia el NAc, el hipotálamo (Hipp) y la mPFC. Las aferencias glutamatérgicas (rojo) que van del hipotálamo, mPFC y amígdala (Amy) hacia NAc; igual el VTA recibe proyecciones glutamatérgicas desde la habénula lateral (LHb), del hipotálamo lateral (LH), del núcleo tegmental laterodorsal (LDTg); también el núcleo rostromedial tegmental (RMTg) recibe proyecciones glutamatérgicas desde LHb. Por otro lado, las aferencias GABAérgicas (azul) hacia el VTA, provienen del NAc, y del RMTg; también se ilustran las eferencias GABAérgicas desde el NAc hacia el LH. Imagen modificada de (Russo y Nestler, 2013).

Todas estas estructuras, que son llamadas «regiones cerebrales de recompensa», están interconectadas entre sí y modulan las conductas de recompensa y de motivación. Actualmente, hay investigaciones que utilizan modelos que van desde el uso de roedores, monos, hasta humanos para saber cómo estas estructuras cerebrales modulan las conductas ante recompensas (Kelley y Berridge, 2002; Kenny, 2011; Castro *et al.*, 2015; Durts *et al.*, 2018). Este hecho es relevante, ya que se pueden hacer avances científicos desde la investigación básica hasta la investigación aplicada.

Se sabe que las manipulaciones de estimulación optogenética, eléctrica o farmacológica, que aumentan la transmisión de dopamina, actúan como reforzadores. Esto es congruente con el paradigma que propone que la transmisión de dopamina es indispensable para el aprendizaje de cualquier conducta que implique motivación (Wise, 2005).

Un ejemplo de ello es el uso de optogenética para estimular selectivamente la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA en ratones. En un experimento, se observó que la activación fásica de estas neuronas fue suficiente para producir un condicionamiento de preferencia de lugar (CPP), ya que los ratones transfectados que recibieron un estímulo luminoso en el VTA desarrollaron una preferencia de lugar al compartimento en el que recibían dicho estímulo. Asimismo, se observó un incremento en los niveles de dopamina en el NAc (Tsai *et al.*, 2009) lo cual sugiere que el NAc participa en la decodificación de señales de recompensa del VTA. Además, mediante la técnica de autoestimulación optogenética en ratones, se ha observado que la excitación de las neuronas del NAc regula la motivación hacia alimentos palatables (Cole *et al.* 2018).

### **2.2.3 Circuito hedónico**

El circuito hedónico (Fig. 4) se caracteriza por modular la fuerza con que se percibe un estímulo placentero. Por un lado, se tiene a la recompensa y a la motivación, y por el otro se tiene a el valor hedónico que se les asigna a los reforzadores (Espel-Huynh *et al.*, 2018). Por ejemplo, si a una persona que prefiere los sabores dulces se le da como recompensa algo salado, el reforzador no va a tener el mismo valor hedónico que si le hubieran dado algún alimento dulce.

Se ha reportado que los alimentos palatables, como grasas y azúcares, activan sitios corticales en la parte frontal del cerebro implicados en la regulación de la emoción, tales como la corteza orbitofrontal, la corteza cingular anterior y la corteza insular; así como estructuras límbicas del procencéfalo subcortical, como la amígdala, el núcleo accumbens y el pálido ventral (Berridge, 2009).

Específicamente en la teoría de Motivación Incentiva, se ha propuesto que en el «gustar» se activa un circuito que incluye el pálido ventral (VP), el núcleo accumbens *core* y señalizaciones GABAérgicas en el núcleo parabranchial. Por otro lado, en el circuito implicado en el «desear» participan el pálido ventral (VP), ganglios basales y estructuras mesolímbicas-talamocorticales (Berridge *et al.* 2009).

En el presente trabajo, nos enfocaremos en el NAc, ya que se sabe que es un posible blanco terapéutico específico para la regulación de la ingesta (Hurley *et al.*, 2016; Hurley *et al.*, 2019) tanto en la recompensa, como en el valor hedónico.

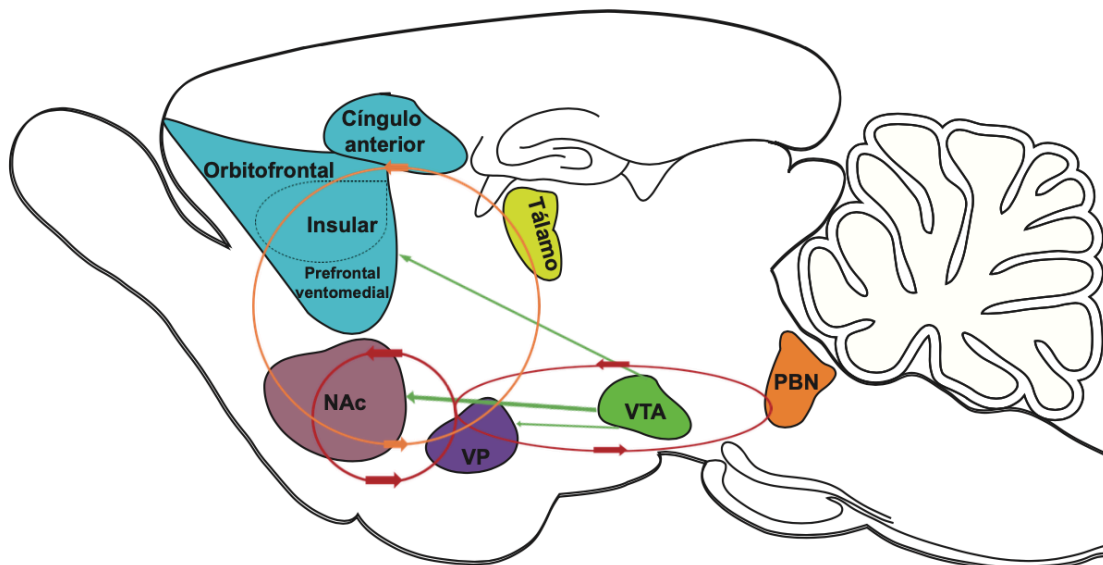


Figura 4. **Circuito hedónico.** Diagrama sagital de roedor que representa a los sistemas del «gustar» y del «desear». Los sistemas del «gustar» (rojo) son modulados por sitios hedónicos del pálido

ventral (VP), el núcleo accumbens (NAc) y con el núcleo parabranchial (PBN). El sistema del «deseo» (verde) se guía por la conexión que hay entre el área ventral tegmental (VTA) y el NAc. El VP también está conectado mediante bucles mesolímbicos-talamocorticales que implican funciones cognitivas, motoras y de recompensa (círculo naranja). Se muestran el cíngulo anterior, la corteza orbitofrontal, la corteza insular y la corteza prefrontal ventromedial (azul); el tálamo (amarillo); el PBN (naranja); el VTA (verde); el VP (morado) y el NAc (rosa). Imagen modificada de (Berridge *et al.* 2009).

#### **2.2.4 Descripción anatómica y morfológica del NAc**

El NAc tiene un papel relevante en el circuito de recompensa y en el valor hedónico que se les asigna a los estímulos. Diversos autores se refieren a esta estructura como un «centro de placer», pues han identificado en este núcleo subregiones específicas (*hedonic hot spots*) cuya estimulación produce placer (Peciña *et al.*, 2006; Kelly y Berridge, 2000; Reynolds y Berridge, 2008). Puesto que el NAc se ha relacionado con la modulación de estímulos hedónicos, resulta muy importante para este trabajo, ya que los alimentos que se consumen en condiciones normales o cuando se presenta algún trastorno alimentario dependen del valor hedónico que se le asigne, más allá de su valor puramente nutricional (Cottone *et al.*, 2008).

El NAc se localiza debajo del caudado putamen (CPu) y del tercer ventrículo lateral, rodeando a la comisura anterior, y se extiende de manera paralela a la línea media. El NAc se diferencia en dos regiones: la primera de ellas es el núcleo accumbens *shell* (NAcSh) que se relaciona en general con el valor hedónico (de placer o displacer) que se les asigna a los estímulos (Peciña y Berridge, 2000; Ambroggi *et al.*, 2011; Durst *et al.*, 2018). La otra parte es el núcleo accumbens *core* (NAcC) que se relaciona, generalmente, con la parte motriz de las recompensas, esto es, la actividad motora que se asocia a una recompensa (Peciña y Berridge, 2000; Ambroggi *et al.*, 2011; Durst *et al.*, 2018). Sin embargo, tanto el NAcC como el

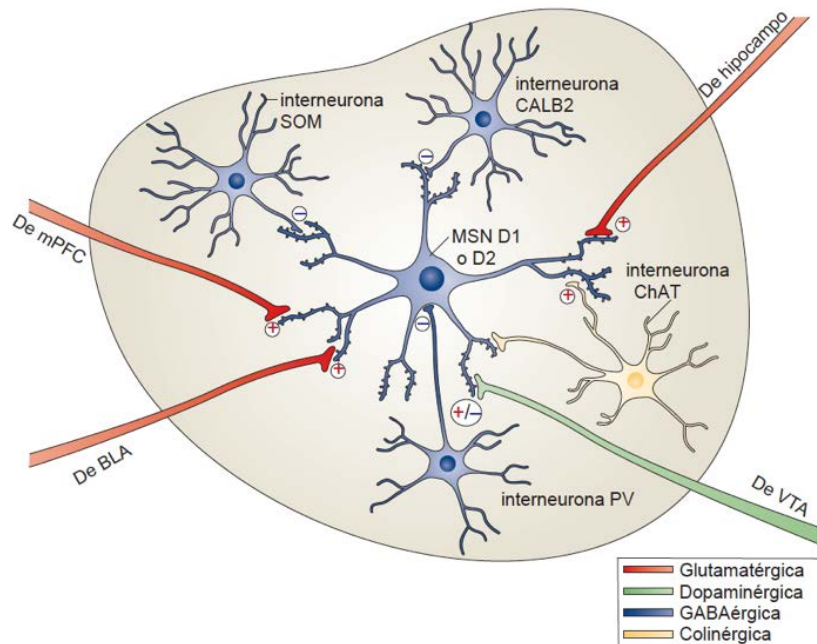
NAcSh codifican información similar, aunque tienen efectos conductuales diferentes dependiendo de las señalizaciones que reciban. Ambas partes del NAc participan de manera conjunta tanto en la parte homeostática como en la parte hedónica (Castro *et al.*, 2016).

Se sabe que, aproximadamente, el 95% de las neuronas en el NAc son neuronas espinosas medianas (NEM) GABAérgicas que se encuentran tanto en la parte *core*, como en la parte *shell*. Estas NEM se dividen en aquellas que expresan el receptor dopaminérgico D1 (D1-NEM) y las que expresan el receptor dopaminérgico D2 (D2-NEM). Cabe recalcar que las NEM son las únicas neuronas de proyección (Belleau y Warren, 2000; Russo y Nestler, 2013). El otro 4%, aproximadamente, de las neuronas del NAc está integrado por interneuronas GABAérgicas que expresan calretinina (CALB2), parvalbúmina (PV), somatostatina (SOM) o calbindina (CALB1) y el 1% restante se compone por grandes interneuronas colinérgicas que expresan la enzima colina-acetiltransferasa (ChAT) (Belleau y Warren, 2000; Tepper y Bolam, 2004; Gagnon, 2017; Russo y Nestler, 2013; Salgado y Kaplitt, 2014; Soares-Cunha *et al.*, 2018). Tanto las neuronas GABAérgicas del NAc que expresan receptores D1 como D2 tienen receptores GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR): N-metil-D-aspartato (NMDA), así como receptores ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Además, las NEM contienen también receptores metabotrópicos de glutamato del 1 al 5 (mGluR1-5) y receptores muscarínicos 1 y 4 (M1/M4) (Soares-Cunha *et al.*, 2018).

La actividad de las NEM del NAc es modulada principalmente por aferentes glutamatérgicas y dopaminérgicas (Lüscher y Ungless, 2006) (Fig. 5). Las entradas

glutamatérgicas que llegan al NAc provienen del hipocampo ventral y dorsal, del tálamo, de la mPFC y de BLA. Mientras que las proyecciones dopaminérgicas que llegan al NAc provienen del VTA (Floresco, 2015). Por otro lado, las principales proyecciones peptídicas que llegan hacia el NAc provienen del hipotálamo, específicamente del área preóptica lateral (LPO), LH y del ARH, que proyecta específicamente al NAcSh (Scofield *et al.*, 2016; Francis y Lobo, 2017). Las proyecciones peptídicas hacia el NAc son de suma relevancia, ya que se sabe que algunos péptidos de la familia del glucagón, como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) o el PACAP, pueden tener efectos anoréxigénicos u orexigénicos en las conductas de ingesta dependiendo de la región del SNC donde actúan (Mounien *et al.*, 2009; Ferrario *et al.*, 2016 Volkow *et al.*, 2017).

Sin embargo, los efectos de activación o de inactivación neuronal en el NAc por péptidos no se ha estudiado en su totalidad y es un campo de investigación que puede ser explorado.



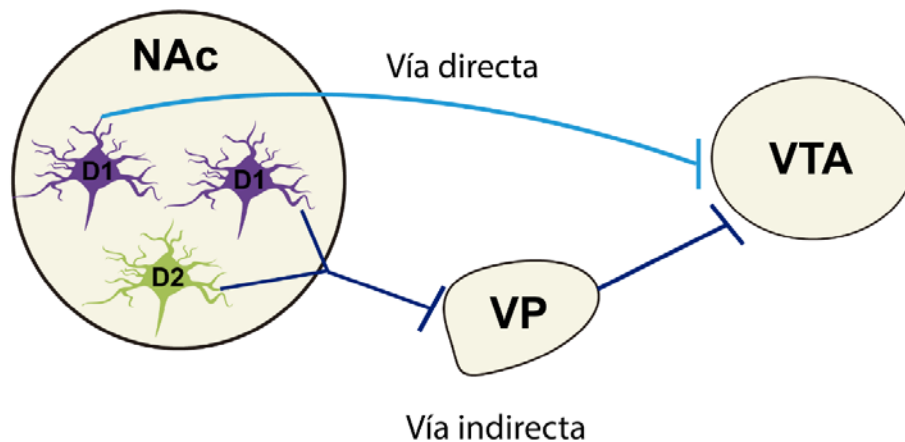
**Figura 5. Microcircuito local del NAc.** Esquema que describe las neuronas espinosas medianas (NEM) GABAérgicas que expresan receptores D1 o D2 (azul) y también muestra las interneuronas GABAérgicas (azul) que expresan calretinina (CALB2), parvalbúmina (PV), somatostatina (SOM) o calbindina (CALB1). También se muestra las aferencias glutamatergicas (rojo) que provienen del hipocampo, amígdala basolateral (BLA) y de corteza prefrontal medial (mPFC). Por último, se muestran las aferencias dopaminérgicas (verde) que vienen del VTA e interneuronas locales GABAérgicas (azul) y colinérgicas (amarillo). Imagen modificada de (Russo y Nestler, 2013).

Cabe destacar que la propia actividad GABAérgica del NAc (Fig. 5) es modulada por los diferentes tipos de interneuronas locales, tanto GABAérgicas como colinérgicas (Russo y Nestler, 2013; Swapna *et al.*, 2016; Soares-Cunha *et al.*, 2018). Las interneuronas colinérgicas también reciben entradas directas glutamatergicas del hipocampo, la mPFC y BLA. A su vez, la liberación de acetilcolina (ACh) por estas neuronas regula las terminales dopaminérgicas del VTA que hacen contacto con las NEM, aumentando la liberación de dopamina en el propio NAc. Esta regulación de dopamina mediante las neuronas colinérgicas se ejerce a



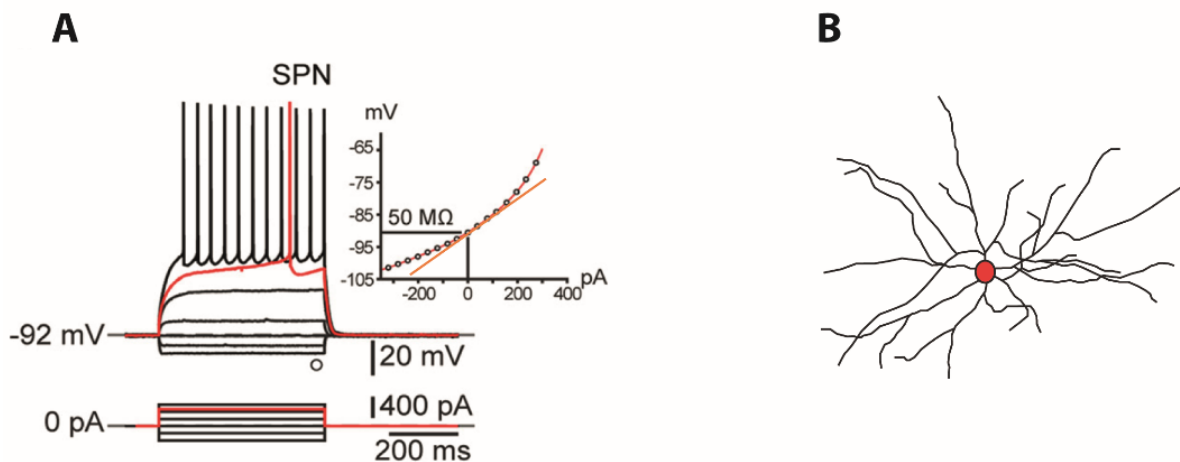
través de receptores nicotínicos que se encuentran en dichas terminales (Soares-Cunha, 2018).

Como se mencionó las NEM GABAérgicas del NAc tienen proyecciones hacia el VTA (Haber, 2011; Tolu *et al.*, 2013). Estas proyecciones dependen del tipo de receptor que expresen las NEM (Volkow *et al.*, 2017). Esto es, D1-NEM o D2-NEM. Clásicamente, se sabe que hay dos vías que van desde el NAc hacia el VTA (Fig. 6): la primera de ellas es la vía directa NAc-VTA, esta vía se origina de las D1-NEM; la segunda vía, o vía indirecta NAc-VP-VTA, se origina tanto de las D1-NEM como de las D2-NEM (Panagis *et al.*, 1997; Swanson, 1982; Soares-Cunha *et al.*, 2018).



**Figura 6. Vía indirecta y directa del NAc.** Se muestra un esquema representativo de la vía directa entre el NAc (azul claro) que se origina de las neuronas que expresan receptores D1 (morado) estas eferencias GABAérgicas son del NAc al VTA. También se muestra la vía indirecta (azul oscuro) que está regulada tanto por las neuronas que expresan receptores D1 (morado) como por las que expresan receptores D2 (verde) y tienen eferencias desde el NAc al pálido ventral (VP) y, después el VP tiene eferencias hacia al VTA, ambas eferencias son GABAérgicas. Imagen modificada de (Soares-Cunha *et al.*, 2018).

Las NEM del NAc se pueden diferenciar de las interneuronas GABAérgicas y de las ChAT por ciertas características electrofisiológicas y morfológicas (Figura 7). Las NEM GABAérgicas del NAc exhiben un potencial de reposo entre -70mV y -95 mV, un umbral de disparo de aproximadamente -50 mV y su resistencia de entrada ( $R_i$ ) se encuentra en un rango de 140 a 300  $M\Omega$  (Belleau y Warren, 2000; Willet *et al.*, 2018). Estas células muestran una rampa de despolarización lenta cuando se despolariza ligeramente por encima del umbral de disparo y presentan una corriente de potasio rectificadora entrante ( $K_{ir}$ ) a potenciales de membrana hiperpolarizados, respecto a su potencial de reposo (John y Manchanda, 2011). En cuanto a su morfología, las NEM se caracterizan por tener un soma pequeño y presentar profusas arborizaciones, al igual que las neuronas del estriado (Gagnon *et al.*, 2017). Estas características se presentan tanto en las neuronas del NAcSh como del NAcC (Belleau y Warren, 2000; Al-muhtasib *et al.*, 2018; Willet *et al.*, 2018).



**Figura 7. Propiedades electrofisiológicas y morfológicas de las neuronas espinosas medianas.** A) Se muestran las propiedades del potencial de acción de las NEM a diferentes inyecciones de corrientes hiperpolarizantes y despolarizantes, se puede apreciar que el potencial de

reposo se encuentra en -92 mV, que la resistencia de entrada es de 50 MΩ y que tiene una rampa de despolarización lenta cercana al umbral de disparo (trazo rojo). **B)** Esta imagen representa la reconstrucción en cámara lúcida de una neurona NEM del NAc que se caracteriza morfológicamente por tener un soma pequeño y por tener profusas arborizaciones dendríticas. Imágenes modificadas de Ibañez-Sandoval *et. al.* (2010) y Gagnon *et. al.* (2017).

### **2.2.5 NAcSh y conducta de ingesta**

Actualmente se sabe que el NAcSh está involucrado, principalmente, en las conductas de recompensa y de aversión (Berridge *et al.*, 2013; Soares-Cunha *et al.*, 2020). Berridge y colaboradores en 2013 reportaron que el sitio rostral del NAc se vincula con conductas relacionadas al placer, mientras que el área caudal de esta área se asocia a conductas displacenteras. Por otro lado, la parte medial del NAc es una mezcla de ambas conductas (Berridge y Kringelbach, 2013). Se ha reportado que, en sujetos que presentan trastorno por atracones, el NAc responde de manera similar al caso de abuso de drogas, es decir, se presenta un aumento en los niveles extracelulares de dopamina y de ACh, específicamente en el NAcSh (Rada *et al.*, 2005).

En estudios conductuales se han identificado sitios hedónicos que responden ante el placer (*hot spots*) o el displacer dentro del NAc. Se sabe que microinyecciones de agonistas opioides en el área rostral de NAcSh triplican el número de respuestas orofaciales, reacciones de placer provocadas por el sabor de sacarosa (Peciña *et al.*, 2006). En cambio, se ha reportado que microinyecciones de agonistas opioides en la parte caudal del NAcSh suprimen el impacto hedónico, ya que se observa una disminución en las respuestas orofaciales ante la sacarosa.

A estos sitios se les denomina (*cold spots*) por las respuestas displacenteras que evocan (Peciña *et al.*, 2006).

Las NEM del NAc, ya sea que expresen el receptor D1 o D2 también han sido investigadas y relacionadas con aspectos relacionados a conductas adictivas como el consumo de drogas y el consumo excesivo de alimentos. En 2016, Klenowski y colaboradores reportaron que las neuronas del NAcSh se ven alteradas morfológicamente después de un consumo de sacarosa a largo plazo. Las ratas que se condicionaron a un modelo de ingesta tipo atracón mostraron una longitud dendrítica menor que las ratas control. Otra investigación más específica reportó que las NEM que expresan el receptor D1 de la parte medial de NAcSh se relacionaba con la ingesta de alimentos palatables. En 2018, Durst y colaboradores identificaron una correlación positiva entre la activación de neuronas que expresan el receptor D1 y el consumo de leche condensada en ratas. También, se sabe que, al igual que en el consumo de drogas, el consumo de azúcares y la ingesta por atracón aumenta la cantidad de dopamina extracelular y de ACh en el NAcSh (Rada *et al.*, 2005).

La ingesta excesiva de alimentos está regulada por diferentes péptidos que funcionan como orexigénicos o anorexigénicos y se encuentran tanto en el sistema nervioso periférico (SNP) como en el sistema nervioso central (SNC). Ejemplo de estos péptidos son la secretina (SCT), el glucagón (GCG), el polipéptido activador de la enzima adenilato ciclasa pituitaria (PACAP), VIP, entre otros (Matsuda *et al.*, 2013). La baja o el alta de dichos péptidos influyen en la conducta de ingesta indicando que éstos participan en procesos homeostáticos, de balance energético y en conductas asociadas a estímulos hedónicos (Sekar *et al.*, 2017).

### 2.3 PACAP

Entre los péptidos que se sabe que participan en la regulación de la ingesta, se encuentra el PACAP, la SCT y la familia del GCG (Vaudry *et al.*, 2000). Estos neuropéptidos poseen una homología estructural (Cardoso *et al.* 2010) y se agrupan en los receptores acoplados a las proteínas G de la clase B, esto es, que pertenecen a la familia de la SCT y tienen un dominio N-terminal extracelular (Laburthe *et al.*, 1996). Sin embargo, a pesar de que comparten algunas funciones biológicas, tienen diferentes funciones fisiológicas (Sekar *et al.*.2017).

El PACAP se descubrió a partir de extractos hipotalámicos por el grupo de investigación de Arimura en 1989. Se sabe que el PACAP pertenece a la familia del péptido intestinal vasoactivo (VIP)/SCT/hormona reguladora del crecimiento (GHRH)/GCG. El PACAP se expresa en dos isoformas biológicamente activas: PACAP-38 y PACAP-27 (Miyata *et al.* 1989). El número final indica la cantidad de aminoácidos que conforman a estos neuropéptidos. Ambas isoformas (Fig. 8) tienen en común los últimos 27 aminoácidos de la función N-terminal (Kimura *et al.*, 1990) sin embargo, el PACAP 1-38 posee una hélice extra en la región C-terminal (Wray *et al.*, 1993).

Neuropéptido	Tipos de receptores	Antagonistas
PACAP 1-38	PAC <sub>1</sub>	PACAP 6-38 PA 8
	VPAC <sub>1</sub>	D-p-Cl-Phe <sup>6</sup> , Leu <sup>17</sup> -VIP
	VPAC <sub>2</sub>	VIP 6-28

PACAP 1-27	PAC <sub>1</sub>	PACAP 6-38 PA 8
	VPAC <sub>1</sub>	D-p-CI-Phe <sup>6</sup> , Leu <sup>17</sup> -VIP
VPAC <sub>2</sub>	VIP 6-28	

**Figura 8. Tipos de PACAP, receptores y antagonistas.** Esta tabla representa los tipos de PACAP que se expresan tanto en el SNC y en el SNP: PACAP 1-38 y PACAP-1-27. Sus tipos de receptores: VPAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>2</sub> y PAC<sub>1</sub>. Y finalmente los agonistas, respectivamente: D-p-CI-Phe<sup>6</sup>, Leu<sup>17</sup>-VIP, VIP 6-28, PACAP 6-38 y PA8 (Vaudry *et al.*, 2000).

El PACAP tiene la capacidad de estimular la formación de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) en las células de la hipófisis (Vaudry *et al.*, 2000). Además, el PACAP es un neuropéptido pleiotrópico. Se ha reportado que, en el periodo nocturno, el consumo de alimento redujo significativamente en ratones PACAP (-/-) en comparación con ratones PACAP (+/+), interesantemente, se reportó un aumento en el consumo de alimento en el periodo diurno en ratones PACAP (-/-) en comparación con ratones PACAP (+/+) (Nguyen *et al.*, 2020).

Algunos de los efectos que tiene el PACAP en el sistema nervioso (SN) son la regulación de la neurosecreción hipotalámica, procesos de aprendizaje y memoria, respuesta inflamatoria, funciones neurales ontogenéticas, control de la ingesta, etc. (Zhou *et al.*, 2002; Sekar *et al.*, 2017).

En los mamíferos, el PACAP-38 se encuentra de manera dominante, aproximadamente 90%, en el SNC mientras que PACAP-27 se expresa tan solo en un 10% (Sekar *et al.*, 2017). Se sabe que la secuencia de PACAP es idéntica en humanos, ratones, ratas y ovejas (Harmar *et al.*, 2012). Esto indica que es un

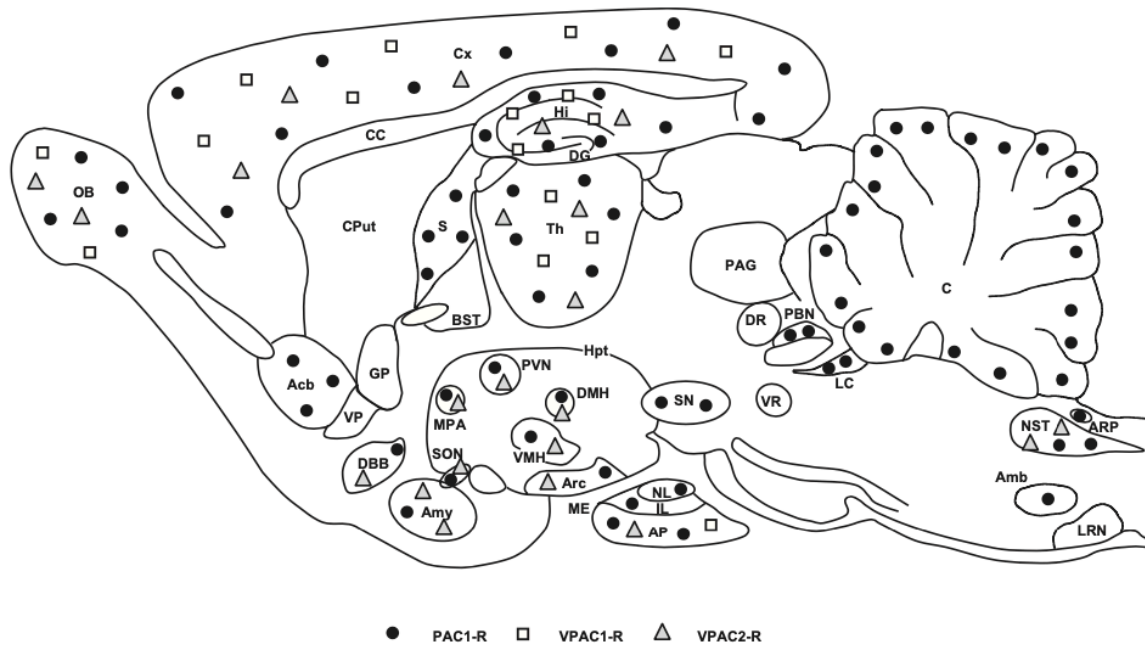
neuropéptido que ha sido evolutivamente conservado (Zhou *et al.*, 2006) y que está involucrado en diferentes funciones tanto del SNC como del SNP. Por ello, es posible estudiar los efectos del PACAP en el SNC y tener una buena aproximación con respecto a su expresión celular y los mecanismos de acción del PACAP en humanos. Se sabe que la isoforma de PACAP 1-27 se encuentra de manera predominante en el SNP y se expresa en neuronas sensoriales, neuronas preganglionares simpáticas y en neuronas ganglionares simpáticas (Sundler *et al.*, 1996).

Por otro lado, a nivel del SNC el PACAP se encuentra en la mayoría de las estructuras hipotalámicas y la isoforma que predomina es PACAP 1-38 (Masuo *et al.*, 1993; Hannibal, 2002). PACAP también se encuentra en la sustancia negra, en cerebelo, en la corteza cerebral, en el tallo cerebral y en el sistema límbico tanto en el tálamo como en el NAc (Masuo *et al.* 1993; Miyata *et al.* 1989; Hannibal, 2002).

Actualmente, se sabe que el PACAP tiene diferentes funciones, dependiendo de la etapa del desarrollo del encéfalo. En el cerebro en desarrollo, el PACAP controla mecanismos de proliferación, migración y diferenciación celular. En el cerebro adulto, el PACAP regula los ritmos circadianos, la ingesta de alimentos, el consumo de agua, la actividad locomotora, el dolor y las respuestas al estrés (Vaudry *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2020).

El PACAP-38 tiene tres subtipos de receptores metabotrópicos que se expresan ampliamente (Fig. 9), tanto en el sistema nervioso periférico como en el sistema nervioso central: PAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>1</sub> y VPAC<sub>2</sub> (Hirabayashi *et al.*, 2018). Algunas estructuras que expresan el receptor PAC<sub>1</sub>, son estructuras implicadas en la ingesta como el NAc, el tálamo y el VP. El estudio de estos receptores y su relación con las

conductas de ingesta no ha sido explorado en su totalidad. Es un tema importante de tratar en general en la investigación y en el presente trabajo.



**Figura 9. Receptores de PACAP.** La imagen muestra como PACAP 1-38 y PACAP 1-27 se acoplan a tres tipos de receptores: PAC<sub>1</sub> (●), VPAC<sub>1</sub> (□) y VPAC<sub>2</sub> (Δ). Abreviaciones: núcleo accumbens (Acb), amígdala (Amy), núcleo ambiguo (Amb), pituitaria anterior (AP), núcleo arcuato del hipotálamo (Arc), área postrema (ARP), núcleos del lecho de la estría terminal (BST), cerebelo (C), cuerpo caloso (CC), caudado putamen (CPut), corteza cerebral (Cx), banda diagonal de Broca (DBB), giro dentado (DG), núcleo dorsal del hipotálamo (DMH), núcleo dorsal de Rafé (DR), globo pálido (GP), hipocampo (Hi), hipotálamo (Hpt), lóbulo intermedio de la pituitaria (NL), núcleo del tracto solitario (NST), bulbo olfatorio (OB), periacueductual gris (PAG), núcleo parabranquial (PBN), núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), septum (S), sustancia nigra (SN), núcleo supraóptico (SON), tálamo (Th), núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH), pálido ventral (VP) y núcleo ventral de Rafé (VR). Imagen modificada de (Vaudry *et al.*, 2013).

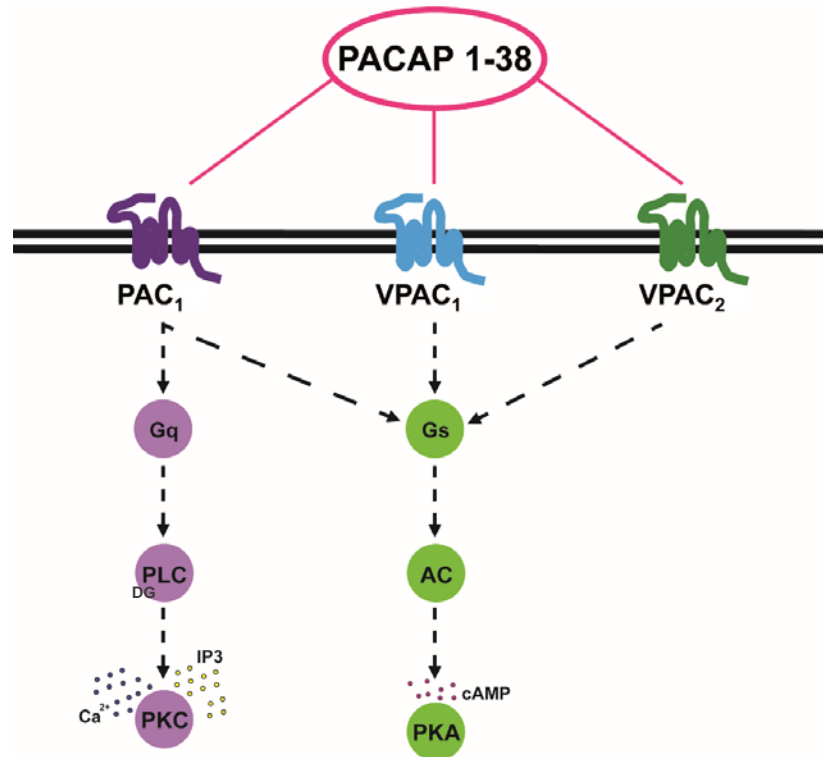
### 2.3.1 Vías de señalización del PACAP

Los receptores VPAC<sub>1</sub> y VPAC<sub>2</sub> se caracterizan por ser afines a PACAP como a VIP (Sekar *et al.*, 2017) y los receptores PAC<sub>1</sub> tienen mayor afinidad a PACAP-38 que a PACAP-27 (Vaudry *et al.*, 2013). Los receptores de PACAP (Fig. 10) se caracterizan



por tener siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G y al acoplarse a estas proteínas aumenta la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC) o la fosfolipasa C (PLC), incrementa la entrada de  $Ca^{2+}$ , modula la neurotransmisión y la inmunomodulación (Mucio-Ramírez *et al.*, 2004).

Al unirse PACAP 1-38 a VPAC1, VPAC2 y PAC1 se activa la proteína Gs cuya cascada de señalización comienza con la activación de la enzima adenilato ciclasa, la formación de AMPc y a la activación de la enzima proteína cinasa A (PKA) (Fig. 10) o a la proteína de intercambio directamente activada por AMPc (Vaudry *et al.*, 2009). Sin embargo, el receptor PAC<sub>1</sub> es el único de estos tres receptores que puede activar a la proteína Gq, como se ha reportado en células granulares del cerebelo (Vaudry *et al.*, 2009). La activación de la proteína Gq incrementa la actividad de la enzima fosfolipasa C (PLC), la cual, al escindir al fosfatidilinositol bifosfato de la membrana celular, forma los segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) e inositol 3-fosfato (IP3). El DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) mientras que el IP3 produce liberación de calcio de pozas intracelulares (Rubio-Beltrán *et al.*, 2018).



**Figura 10. Receptores de PACAP 1-38.** La imagen muestra como PACAP 1-38 (rosa) se une a tres tipos de receptores: PAC<sub>1</sub> (morado), VPAC<sub>1</sub> (azul) y VPAC<sub>2</sub> (verde). Siendo PAC<sub>1</sub> el receptor que se expresa más en el SNC, se ilustra su vía de señalización. PAC<sub>1</sub> es un receptor metabotrópico y que puede activar a dos tipos de proteína G (G<sub>q</sub> y G<sub>s</sub>). Si se activa la proteína G<sub>s</sub> (vía verde), se activa la cascada de señalización de la adenilatociclasa (AC) y esto genera la producción de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) activando a la proteína cinasa A (PKA). Por otro lado, se puede observar en la ilustración que cuando se activa la proteína G<sub>q</sub> (vía morada), se activa la fosfolipasa C promoviendo la formación de diacilglicerol (DG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). El DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) mientras que el IP<sub>3</sub> produce la liberación de calcio de pozas intracelulares. Por último, los receptores VPAC<sub>1</sub> y VPAC<sub>2</sub>, activan a la proteína G<sub>q</sub>. Imagen modificada de (Rubio-Beltrán *et al.*, 2018).

### 2.3.2 Efectos del PACAP en la conducta de ingesta

Se ha reportado que microinyecciones de PACAP 1-38 en el tercer ventrículo del hipotálamo reducen el efecto de las NPY que se caracterizan por ser neuronas orexigénicas (Morley *et al.*, 1992), así el PACAP tiene efectos anorexigénicos en la

vía homeostática en la conducta de ingesta de alimentos. Investigaciones recientes han demostrado que microinyecciones de PACAP 1-38 en el NAc tiene efectos anorexigénicos en la vía hedónica en la ingesta de alimentos palatables (Hurley *et al.*, 2016; Sekar *et al.*, 2017). También se ha demostrado que al aplicar microinyecciones de PACAP 1-38 en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), las ratas muestran una reducción en la ingesta de alimento y en el tiempo total dedicado a comer (Resch *et al.*, 2013).

Se sabe que el NAc tiene receptores del tipo PAC<sub>1</sub> (Vaudry *et al.*, 2009). Estudios conductuales, utilizando un modelo de ingesta tipo atracción que separa la ingesta homeostática de la ingesta hedónica, han mostrado que microinyecciones de PACAP 1-38 en el NAc reducen la ingesta de alimento palatable sin alterar la alimentación homeostática (Hurley *et al.*, 2016).

Sin embargo, el efecto del PACAP 1-38 sobre las neuronas del NAc no ha sido estudiado suficientemente.

El objetivo principal de este proyecto fue describir los efectos del PACAP 1-38 sobre la actividad de las NEM del NAc, utilizando técnicas electrofisiológicas. Asimismo, se utilizó la técnica de imagenología de calcio en rebanadas cerebrales para estudiar el efecto del PACAP 1-38 sobre la actividad poblacional, es decir, decenas de neuronas del NAc registradas simultáneamente. Una de las preguntas en el presente proyecto de tesis es saber cómo el PACAP 1-38 actúa en las neuronas de proyección del NAcSh, ya que se sabe que en esta área se encuentran receptores PAC<sub>1</sub> (Vaudry *et al.*, 2009).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los trastornos de la ingesta que se ha relacionado con el aumento de peso es el trastorno por atracón. El NAcSh se ha propuesto como un regulador fundamental en las señales de recompensa que participan en el trastorno por atracón (Berridge y Kringelbach, 2016). Se ha sugerido que microinyecciones de PACAP 1-38 en el NAc reduce la ingesta de alimento palatable (Hurley *et al.*, 2016). Sin embargo, los efectos del PACAP 1-38 sobre la actividad de las NEM, las cuales constituyen la principal población neuronal del NAcSh, no han sido estudiados.

El presente trabajo de tesis propone abordar el problema mediante técnicas electrofisiológicas, farmacológicas y de imagenología de calcio. Las primeras técnicas nos permitirán observar la respuesta de las neuronas individuales al PACAP 1-38, así como la identificación de las células registradas con base en sus características electrofisiológicas. Por otra parte, la técnica de imagenología de calcio nos permitirá visualizar el efecto del PACAP 1-38 sobre una población de decenas de neuronas, pero con resolución de célula única. Estas técnicas se consideran herramientas fundamentales para entender los mecanismos de acción de diversos neurotransmisores en el sistema nervioso central. Investigar los efectos del PACAP 1-38 sobre las NEM ayudará a entender sus mecanismos de acción en el NAcSh para regular la ingesta de alimento. Esto es relevante ya que se considera a este neuropéptido como un agente terapéutico potencial para los trastornos de ingesta. Asimismo, los datos resultantes del presente proyecto permitirán comprender mejor el papel que juega el NAc en la regulación motivacional de la conducta de ingesta de alimento.

## **4. HIPÓTESIS**

### **4.1 Hipótesis general**

La activación del receptor PAC<sub>1</sub> por su agonista PACAP1-38 aumentará la excitabilidad de las NEM del NAcSh.

### **4.2 Hipótesis específicas**

1. El PACAP 1-38 aumentará la excitabilidad poblacional de las NEM del NAcSh.
2. El PACAP 1-38 aumentará significativamente la frecuencia de disparo en las NEM del NAcSh.
3. El estado de reposo de las NEM cambiará a un estado despolarizado después de la aplicación de PACAP 1-38.
4. Si los receptores PAC<sub>1</sub> son expresados en el NAcSh, cuando se aplique el antagonista de estos receptores (PACAP 6-38), no habrá cambios en la frecuencia de disparo, en la actividad poblacional, ni en el potencial de reposo de las NEM suponiendo que el receptor no tiene actividad constitutiva.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Determinar el efecto del PACAP 1-38 sobre la actividad de las NEM del NAcSh mediante técnicas electrofisiológicas y de imagenología de calcio.

## **5.2 Objetivos Específicos**

1. Estudiar el efecto del PACAP 1-38 a diferentes concentraciones de sobre excitabilidad de las NEM del NAcSh mediante la técnica de imagenología de calcio.
2. Identificar a las NEM del NAcSh, con base en sus propiedades electrofisiológicas, mediante protocolos de registro en célula completa (*whole cell*) en fijación de corriente y fijación de voltaje.
3. Estudiar el efecto del PACAP 1-38 sobre la excitabilidad de las NEM mediante la construcción de curvas intensidad-corriente e intensidad-frecuencia.
4. Estudiar el efecto del PACAP 1-38 sobre la actividad espontánea de las NEM mediante la técnica de fijación de corriente.
5. Utilizar un antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub>, PACAP 6-38, para determinar la especificidad de los efectos del PACAP 1-38 en el NAcSh, tanto en experimentos electrofisiológicos como de imagenología de calcio.

## **6. MÉTODO**

### **6.1 Sujetos**

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la norma oficial mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y en conformidad con lo estipulado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Wistar de 21-25 días de edad con un peso aproximado entre los 28 y 35 g. Los sujetos se mantuvieron en cajas hogar con condiciones ambientales controladas: ciclo de luz-oscuridad 12-12 h, temperatura de  $21 \pm 2$  °C y humedad  $70 \pm 10$  %. Los sujetos tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento hasta el día de su sacrificio. Las ratas fueron obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM el mismo día el experimento.

Para la técnica de imagenología de calcio con PACAP 1-38 se analizaron los siguientes números de neuronas: n = 31 para 1 nM, n = 62 para 2.5 nM, n = 33 para 5 nM, n = 231 para 10 nM, n = 294, para 25 nM, n = 289 y para 50 nM, n = 171. Para observar los efectos del antagonista PACAP 6-38 se analizaron 186 células.

Con respecto a la técnica de electrofisiología se analizaron las siguientes neuronas: n = 7 con una concentración de PACAP 1-38 de 25 nM y n = 4 con una concentración de PACAP 6-38 de 50 nM y 25 nM de PACAP 1-38.

## **6.2 Obtención de tejido**

Los sujetos fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (85 mg/kg) y xilacina (15 mg/kg, i.p.). Después de 1 min, aproximadamente, fueron decapitados. El cerebro fue extraído y colocado en una solución de Krebs fría (4 °C) que contenía (en mM): 123.9 NaCl, 2.6 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.5 MgSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 6.5 C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> y 2.2 CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, con un pH = 7.35, una osmolaridad de 300mOsm/L y oxigenada con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Para todos los experimentos las rebanadas se mantuvieron en solución Krebs a temperatura ambiente 20-25 °C y con burbujeo constante de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, utilizando un vibratomo (Pelco 102, TedPella, INC), se obtuvieron rebanadas coronales de 300 µm de

grosor, las cuales contenían el NAcSh. Las rebanadas se mantuvieron a temperatura ambiente en la solución de Krebs durante al menos una hora, antes de iniciar los registros electrofisiológicos o de imagenología de calcio (Garduño *et al.*, 2012).

### **6.3 Electrofisiología**

Las rebanadas, que contenían NAcSh, se colocaron en una cámara de registro adaptada a un microscopio y fueron perfundidas con solución Krebs a una tasa de 4-5 ml/min que se contenía en una jeringa (Fisherbrand™) de un volumen de 60ml con un burbujeo constante de carbógeno (95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) para el mantenimiento de un pH de 7.35.

Se realizaron experimentos electrofisiológicos por medio de la técnica *patch-clamp* en la configuración de célula completa (*whole cell*) en las modalidades de fijación de voltaje y fijación de corriente en NEM del NAcSh. Se utilizaron micropipetas de registro con resistencia de 4-7 MΩ, que fueron llenadas con una solución interna cuyo contenido fue, en mM: 140 K-gluconato, 5 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0.02 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg<sub>2</sub>-ATP, 0.5 Na<sub>2</sub>GTP y 0.1% biocitina. Esta solución tuvo un pH = 7.2-7.3 y una osmolaridad de 280-300 mOsm/L. Los electrodos fueron hechos con tubos de vidrio de borosilicato (WPI, Sarasota, FL) utilizando un estirador de pipetas (Sutter Instrument, Novato, CA) para obtener una resistencia de 4-7 MΩ.

Se utilizó un amplificador Multiclamp 700B (Axon Instruments) para los registros electrofisiológicos. Las señales obtenidas fueron filtradas a 3 KHz y digitalizadas mediante una interfase análogo-digital (Digidata 1422A; Molecular Devices) a una velocidad de muestreo de 5 KHz. Los datos se guardaron en una



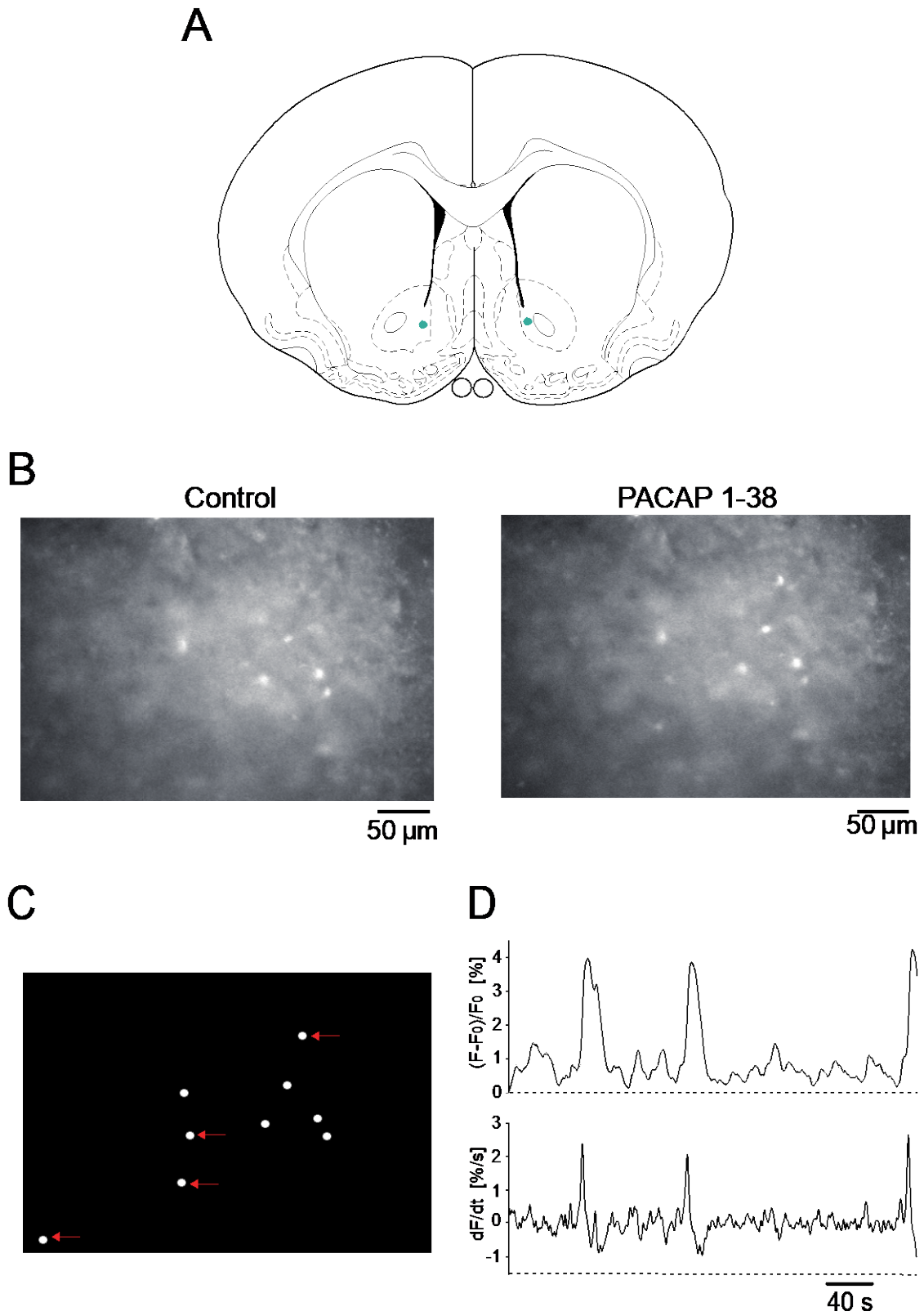
computadora equipada con el software pClamp 10 (Molecular Devices). Las neuronas fueron visualizadas mediante un microscopio vertical (BX51WI; Olympus Instruments) equipado con un objetivo de inmersión en agua 80X. Las neuronas, primeramente, fueron registradas mediante la técnica de fijación de corriente para examinar sus características electrofisiológicas y para asegurar que fueran NEM. Las características para considerar fueron las siguientes: potencial de reposo de -90 mV a -70 mV, umbral de disparo de  $-50 \pm 8$  mV, resistencia de entrada de  $143 \pm 76$  M $\Omega$  y una rampa de despolarización lenta cuando se despolariza ligeramente o por encima del umbral de disparo con una corriente intracelular (Belleau y Warren, 2000; Willet *et al.*, 2018). Sólo se seleccionaron neuronas que exhibieron un sobretiro (*overshoot*) de 10-20 mV, para asegurar la viabilidad del sello. Se registró una sola neurona por rebanada. Si la resistencia de entrada de la neurona registrada varió en más de un 15% durante el experimento, la célula fue descartada. Para construir las curvas corriente-voltaje (I-V) en fijación de corriente se aplicaron pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes que incrementaron gradualmente a partir de un potencial de mantenimiento de -70 mV. La curva corriente-frecuencia (I-F) se realizó de forma idéntica a la curva I-V, pero los pulsos despolarizantes continuaron hasta obtener la máxima frecuencia de disparo de la célula (Garduño *et al.*, 2012). La curva I-V se obtuvo también en fijación de voltaje aplicando comandos de voltaje que incrementaron gradualmente de -120 a +40 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -70 mV. El propósito de obtener la curva en fijación de voltaje fue obtener un rango mayor de valor de voltaje sin que el disparo de potenciales de acción interfiera con los registros. Los registros de actividad espontánea se hicieron solamente en fijación de corriente debido a que se observó,

particularmente, el disparo neuronal. Siguiendo este protocolo, una vez obtenido el sello, el potencial de membrana de la neurona se registró de manera continua en condiciones de inyección de corriente cero (potencial de reposo). En cada uno de los protocolos descritos, se comparó la condición control con la aplicación de los fármacos, PACAP 1-38 o PACAP 6-38.

#### **6.4 Imagenología de calcio**

Después de una hora de estabilización del tejido en solución Krebs a temperatura ambiente, las rebanadas fueron incubadas por 40 min a una temperatura de 35 °C en una solución conteniendo Fluo 4-AM (1-10  $\mu$ M) en 0.1% de dimetilsulfoxido (DMSO) (Invitrogen, Life Technologies). Posteriormente, cada rebanada se colocó en la cámara de registro (plexiglas) y se perfundió con solución Krebs a una tasa de 4-5 ml/min a temperatura ambiente, por medio de un sistema de perfusión por gravedad. Para la visualización de las células se utilizó un microscopio vertical (Nikon FN1 Eclipse) con un objetivo 16X de inmersión en agua. Para observar los cambios de fluorescencia, el tejido se estimuló con pulsos de luz (488 nm de longitud de onda) mediante una lámpara LED (Lambda HpX L5, Sutter Instruments) conectada mediante fibra óptica al microscopio. El tiempo de exposición fue de 15-30 ms. Los videos se obtuvieron mediante una cámara digital CCD (Cold SNAP MYO, Photometrics) controlada mediante un software personalizado y programado en LabView (National Instruments). La frecuencia de adquisición de las imágenes fue de 4 *frames* por segundo y los videos tuvieron una duración de 6 min (1440 *frames*). Cada *frame* es una ventana de tiempo de 250 ms de duración. Al finalizar el experimento se colocó una solución alta en K<sup>+</sup> (5 mM) para el cálculo total de las

neuronas que captaron el indicador de calcio dentro de los campos de registro. La actividad fue estimada mediante los transitorios de calcio generados por las neuronas. Las señales de fluorescencia dependientes a calcio se calcularon a partir de  $F_i - F_o / F_o$ . Donde,  $F_i$  es la fluorescencia en cualquier cuadro del video, mientras que  $F_o$  es la fluorescencia basal. Las condiciones que se registraron fueron 18 min control, 18 min con fármaco (PACAP 1-38 o PACAP 6-38) y 18 min de lavado. La técnica se ilustra en la Figura 11.



*Figura 11. Descripción de la técnica de imagenología de calcio. A)* Representación esquemática de un corte coronal que contiene NAc, en color azul se marcan el área de NAcSh donde se realizaron

las grabaciones de imagenología de calcio y el registro electrofisiológico. **B)** Imágenes de grabaciones de imagenología de calcio en condición control (izquierda) y aplicando 25 nM de PACAP 1-38 (derecha), cada imagen se obtuvo de un solo cuadro de video. **C)** Esquema que muestra el mapa de coordenadas de las neuronas activas construidas a partir del video, las flechas rojas indican las neuronas que se activaron después de la aplicación de PACAP 1-38 (15 min). **D)** Transitorios de calcio (parte superior) y primera derivada (parte inferior) de una neurona de NAcSh.

## **6.5 Análisis de imágenes**

En cada video obtenido en la técnica de imagenología de calcio, las células activas se seleccionaron usando un templete circular de tamaño variable (4-30  $\mu\text{m}$ ). Se generó automáticamente un mapa de coordenadas de neuronas activas a partir de las imágenes utilizando el software Im-Patch (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Las señales de calcio intracelular se pudieron observar como transitorios de calcio en cada región con una alta resolución temporal y espacial. Los transitorios de calcio y su primera derivada fueron tomados como indicadores de disparo neuronal (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Los transitorios con amplitudes 2.5 veces mayores a la desviación estándar del ruido basal fueron considerados para el análisis. El fotoblanqueo (*bleaching*), el fenómeno de los discos Airy y el ruido basal, se corrigieron al restar el fondo local de la célula de interés a la señal cruda de la misma célula, este protocolo se aplicó para todas las células registradas. A partir de los transitorios de calcio obtenidos en cada uno de los videos (3 control, 3 en presencia de PACAP 1-38 en el baño y 3 en lavado) se construyó una matriz binaria de 0 y 1. En esta matriz, cada fila representa una neurona activa y cada columna representa una ventana de tiempo «*frame*», donde 1 representa un *frame* activo y 0 representa un *frame* inactivo para cada una de las neuronas registradas. En la matriz, el eje «y»

representa el número de neuronas, mientras que el eje «x» representa el número de *frames* del video (1440 *frames*). Por último, las matrices se utilizaron para generar gráficas tipo «*raster*» (Temporal Raster Plots) que nos permiten observar la actividad de las neuronas a lo largo del tiempo.

## **6.6 Marcaje celular**

Para identificar las neuronas registradas, se utilizó un marcaje intracelular. Las células registradas fueron inyectadas con un biomarcador (biocitina). La biocitina fue disuelta en la solución interna con la cual se llenaron los microelectrodos de registro. Al finalizar el experimento, las rebanadas cerebrales se fijaron en una solución de paraformaldehído 4% y ácido pírlico 1% en un *buffer* fosfato salino (PBS) 0.1 M y un pH = 7.4 durante 10-13 h. Posteriormente, las rebanadas fueron lavadas en PBS y el tejido se infiltró con sacarosa 30% durante 30 min. Después, el tejido se colocó en un bloque de agar y se obtuvieron rebanadas de 40  $\mu\text{m}$  de grosor utilizando un vibratomo serie 100 (Pelco 102, TedPella, INC). Las rebanadas fueron incubadas de 4-6 h en PBS con 0.2% de Triton X-100 y se conjugaron con Cy3-estreptavidina (1 mg/ml; diluida 1:100; Zymed™) para detectar a las células registradas. Por último, las rebanadas fueron colocadas en un portaobjetos y examinadas en un microscopio confocal (MRC 1024; Bio-Rad) equipado con un láser de criptón/argón. Las imágenes digitalizadas se transfirieron a una computadora personal utilizando el software de captura de imágenes (Confocal Assistant, T. C. Brelje, Minneapolis, MN).

## **6.7 Farmacología**

El PACAP 1-38 (Tocris, bioscience) se utilizó en concentraciones de 1 nM, 2.5 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM y 50 nM para obtener la concentración de la EC<sub>50</sub>. Se disolvió en solución Krebs el día del experimento y se aplicó mediante un sistema de perfusión por gravedad con una tasa de 4-5 ml/min. Se tomó un registro control de 18 min con solución Krebs, posteriormente, el PACAP 1-38 se aplicó por 10 min para asegurar su perfusión en el tejido, ya que los receptores son metabotrópicos. Se registraron 18 min del efecto del PACAP 1-38. Por último, el PACAP 1-38 se retiró (lavado) del baño de perfusión y después de 20 min se hizo un registro de 18 min con solución Krebs el cual se tomó en cuenta para el análisis. Al final se utilizó una concentración de 25 nM que fue la dosis con la cual se obtuvo un efecto máximo.

Para determinar que la actividad neuronal observada se debía a los efectos del PACAP 1-38, se utilizó el antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub>, PACAP 6-38 (Tocris, bioscience). Se disolvió PACAP 6-38 en una concentración de 50 nM en solución Krebs el día del experimento y se aplicó mediante un sistema de perfusión por gravedad con una tasa de 4-5 ml/min. Se tomó un registro de 18 min con solución Krebs. Posteriormente se aplicó el antagonista PACAP 6-38 por 10 min y posteriormente se hizo el registro del efecto del antagonista por 18 min. Por último, se aplicó el agonista PACAP 1-38 en una concentración de 25 nM durante 20 min y posteriormente se hizo un registro de 18 minutos tomados para análisis.

Las manipulaciones farmacológicas fueron utilizadas tanto en la técnica de imagenología de calcio como en la técnica de electrofisiología.

## **6.8 Análisis estadístico**

Para el análisis de la curva dosis-respuesta se obtuvo el porcentaje de 0-100% de las células que se activaron en presencia de PACAP 1-38. Para cada dosis, al porcentaje de células activas se le restó la actividad basal para quedarnos con el número de células totales que se activaron en presencia del fármaco, esto es, una actividad normalizada. Con los datos obtenidos se utilizó el programa SigmaPlot (Systat Software, Inc) y hizo un análisis de los datos a partir de la ecuación de Hill. Posteriormente, se hizo un ajuste no lineal a partir del gráfico de Hill. Se tomaron en cuenta el coeficiente de determinación y el error estándar. Para el contraste de la normalidad de los datos se utilizó la prueba Shapiro-Wilk.

Para el análisis electrofisiológico se utilizó el programa Clampfit 10 (Molecular Devices). El análisis de los datos se realizó utilizando los paquetes para gráficas y análisis estadístico: Origin versión 8. OriginLab Corporation (Wellesley Hills MA); Igor Pro-6, (WaveMetrics Inc, Lake Oswego, OR) y GraphPad Prism 6 (San José CA, USA). Para el análisis de comparación de grupos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, las diferencias estadísticamente significativas se tomaron como válidas cuando  $p < 0.05$ .

Los datos obtenidos de los experimentos de imagenología de calcio fueron analizados utilizando rutinas personalizadas elaboradas en MatLab (Math Works), este programa se utilizó para analizar estadísticamente la actividad de células individuales, así como la actividad poblacional de las células en todos los experimentos realizados (Aparicio-Juárez *et al.*, 2017). Para evaluar la distribución acumulativa de la actividad de todas las células en las tres diferentes condiciones, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Por último, para la evaluación de las

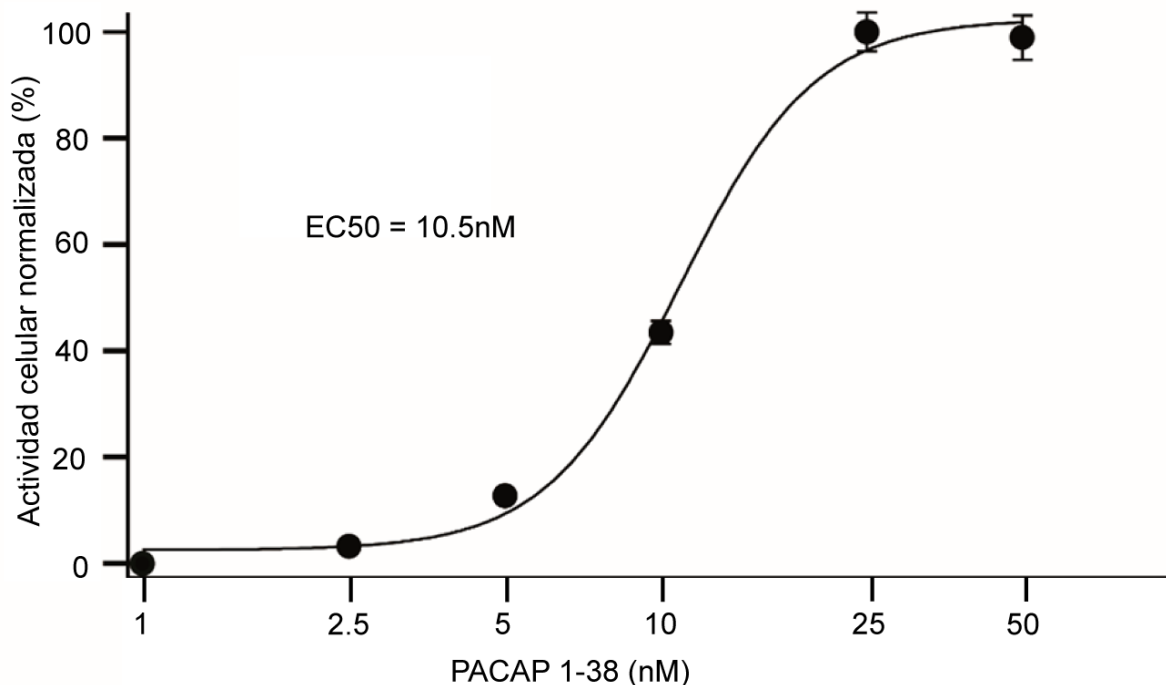


comparaciones de la actividad en las tres diferentes condiciones, se utilizó la prueba de Friedman. En ambas pruebas se tomaron los datos como estadísticamente significativos cuando  $p < 0.05$ .

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 *El efecto del PACAP 1-38 es dependiente de la concentración***

Para elegir la dosis de PACAP 1-38, se realizó una curva concentración-respuesta en experimentos de imagenología de calcio en el núcleo NAcSh (Fig.12). La respuesta medida fue el porcentaje de células que se activaron a cada concentración de PACAP 1-38: 1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM y 50nM, con respecto al control de cada célula analizada. La figura 12 muestra una curva concentración-respuesta donde se observa que el efecto del PACAP 1-38 es dependiente de la concentración y que la respuesta máxima o saturación se alcanza a 25 nM con una  $EC_{50}$  de 10.5 nM. Con base en estos datos, se decidió utilizar la concentración de 25 nM para los experimentos de imagenología de calcio y de electrofisiología con el fin de tener un efecto claro en la respuesta. A manera de control, cuando las imágenes fueron tomadas del neocórtex dorsal no se observó ningún efecto sobre la actividad de fluorescencia tras la administración PACAP 1-38 (no mostrado), puesto que no hay receptores  $PAC_1$  en este núcleo (Vaudry *et al.*, 2009).

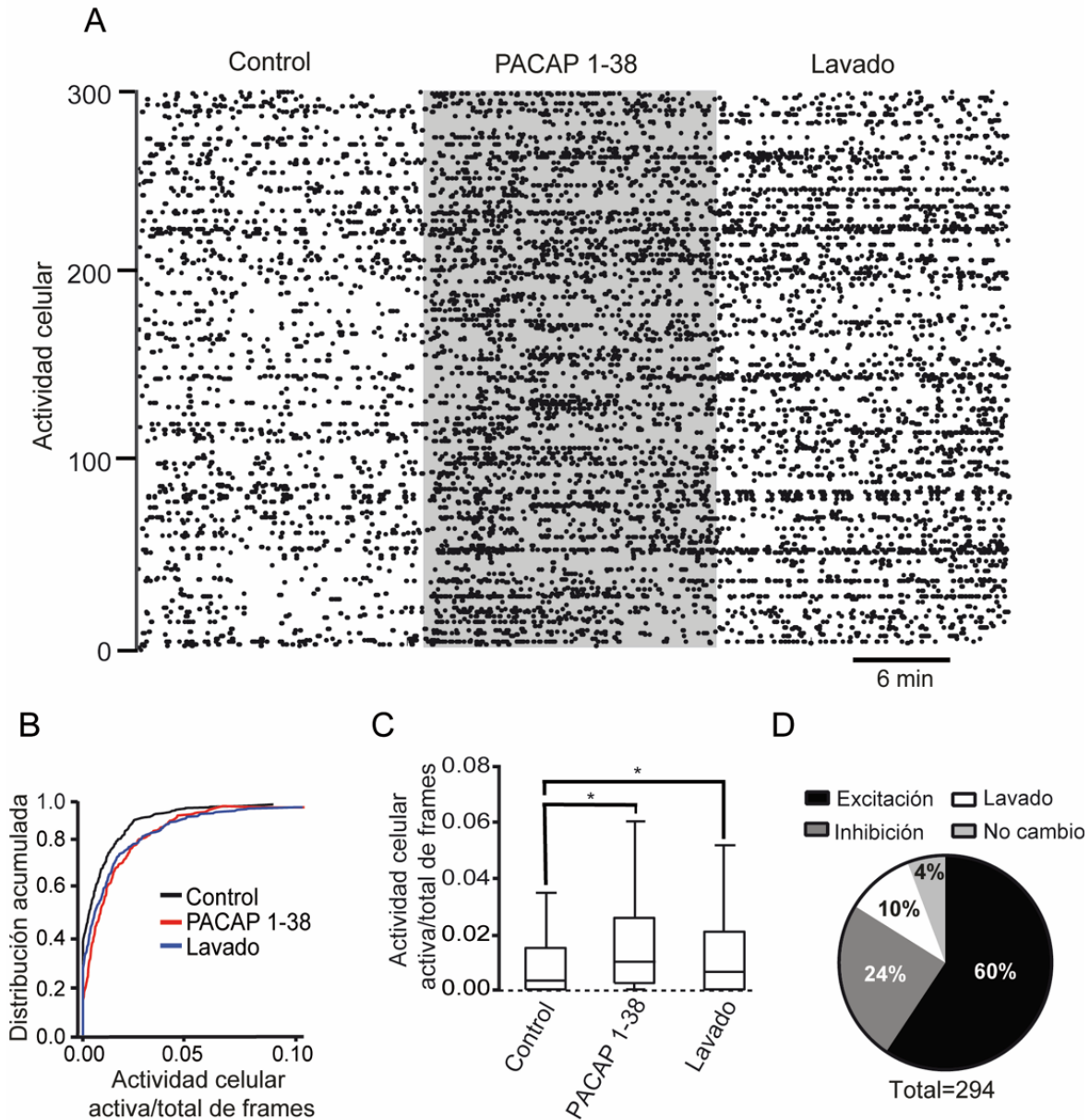


**Figura 12. Curva dosis-respuesta de PACAP 1-38.** Actividad celular normalizada  $n = 1111$  a diferentes concentraciones de PACAP 1-38 (1-50 nM) analizadas a partir de la técnica de imagenología de calcio. La respuesta máxima al PACAP 1-38 se observó a una concentración de 25 nM con una  $EC_{50}$  de 10.5 nM. El coeficiente de determinación obtenido fue  $R^2 = 0.99$  con un error estándar de  $SD = 0.82$ ; en la prueba de Shapiro-Wilk se obtuvo un valor de  $W = 0.95$ .

## 7.2 El PACAP 1-38 incrementó la actividad global de las NEM del NAcSh

Posteriormente, se realizaron experimentos de imagenología de calcio utilizando el PACAP 1-38 (25 nM) para observar su efecto sobre la actividad neuronal en el NAcSh. La figura 13 muestra un gráfico tipo *raster* que ilustra la actividad de 294 neuronas obtenidas de 7 experimentos. Cada fila representa la actividad de una neurona en función del tiempo y cada punto representa la actividad de la célula en una ventana de tiempo «*frame*» (Fig. 13A). El gráfico muestra tres condiciones: control, en presencia de PACAP 1-38 y lavado. Puede observarse que el PACAP 1-38 produjo un incremento en la actividad global (banda gris) y este efecto se

mantuvo al menos 20 min después de retirar la droga, esto es, en el lavado. La gráfica de distribución acumulada (Fig. 13B) muestra la actividad de cada célula durante el experimento. Esta fue expresada contando el número de *frames* durante los cuales la célula estuvo activa y dividiendo entre el número total de *frames* (activa /total de *frames*). La gráfica de distribución acumulada muestra que la aplicación de PACAP 1-38 produjo un desplazamiento de la curva (roja) hacia la derecha indicando un aumento de la actividad celular. Este desplazamiento permaneció al menos 20 min después del lavado de la droga (trazo azul). Tanto la condición de PACAP 1-38 como la condición de lavado fueron estadísticamente diferentes con respecto a la condición control (trazo negro) ( $p < 0.05$ , prueba Kolgomorov-Smirnov). La gráfica de cajas (Fig. 13C) también muestra las diferencias en la actividad celular entre las tres condiciones del experimento. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad celular en condiciones de PACAP 1-38 y se mantuvo en la etapa de lavado en comparación con el grupo control ( $p < 0.05$ , prueba de Friedman,  $n = 294$ ). La gráfica de pastel (Fig. 13D) demuestra que la respuesta de las neuronas del NAcSh al PACAP 1-38 fue heterogénea. Si bien la mayoría de las células (60%) aumentaron su actividad (excitación), otra población de neuronas fue inhibida por esta droga (24%, inhibición). Un tercer grupo aumentó su actividad durante el lavado del PACAP 1-38 (10%) y un último grupo de células no cambio su actividad durante todo el experimento (4%, no cambio).



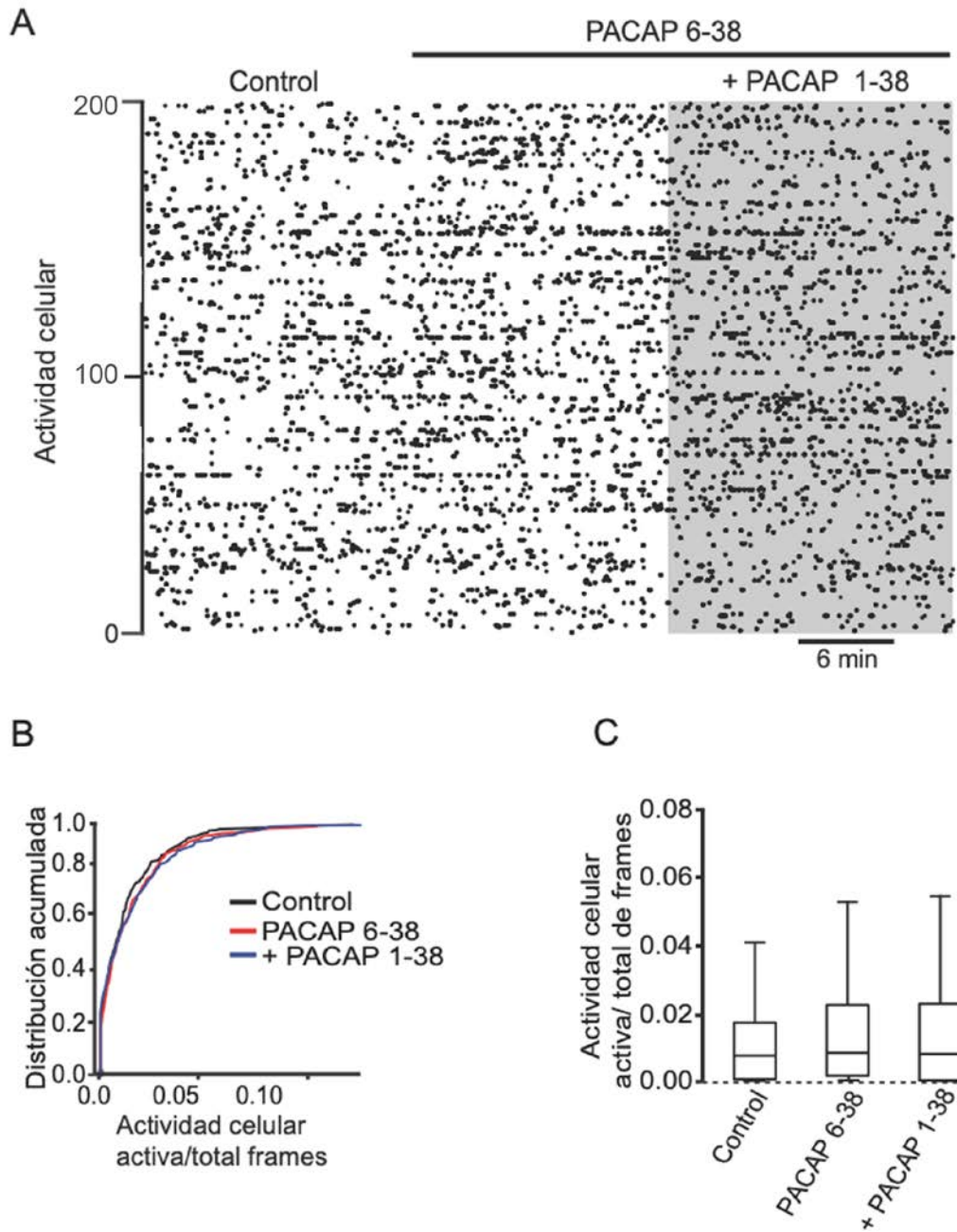
**Figura 13. El PACAP 1-38 incrementa la actividad neuronal en el NAcSh. A)** Gráfico tipo *raster* que muestra la actividad espontánea de 294 células registradas de 7 experimentos en la región rostral de NAcSh. La aplicación de PACAP 1-38 (25 nM) incrementó la actividad neuronal global (área gris) y el efecto se mantuvo durante el lavado del péptido. **B)** Gráfica de distribución acumulada de la actividad celular que muestra un desplazamiento de las curvas hacia la derecha producido por PACAP 1-38 (trazo rojo) y mantenido durante el lavado (trazo azul), lo cual representa una mayor actividad en estas condiciones con respecto al control (trazo negro) ( $p < 0.05$ , prueba Kolmogorov-Smirnov,  $n = 294$ ). **C)** Gráfico de cajas que representa la actividad celular en las tres condiciones

experimentales que también muestra diferencias estadísticamente significativas en la actividad celular en condiciones de PACAP 1-38 y lavado en comparación con la condición control (\* $p < 0.05$ , prueba de Friedman,  $n = 294$ ). **D)** Las células se clasificaron en cuatro grupos: el primero representa a las células que se activaron al aplicar PACAP 1-38 (Excitación), el segundo grupo representa a las células que se inhibieron al aplicar PACAP 1-38 (Inhibición), el tercer grupo representa a las células que se activaron únicamente después del lavado del PACAP 1-38 y el cuarto grupo representa las células que mantuvieron la misma actividad en las tres condiciones del experimento (No cambio).

### **7.3 El efecto del PACAP 1-38 fue bloqueado por PACAP 6-38, antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub>**

Para investigar si el efecto del PACAP 1-38 fue específico, es decir, mediado a través del receptor PAC<sub>1</sub>, se realizaron experimentos utilizando la técnica de imagenología de calcio en presencia de PACAP 6-38. PACAP 6-38 es un antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub> los cuales, se sabe, se localizan en el núcleo accumbens (Vaudry et al., 2009). El gráfico tipo *raster* (Fig. 14) muestra la actividad de 186 neuronas obtenidas de 4 experimentos. Después de tomar un control de 12 min se agregó el PACAP 6-38 (50 nM) y se mantuvo la perfusión por 18 min (3 videos). Posteriormente, se aplicó (PACAP 1-38) en presencia del antagonista y se tomó un registro adicional de 18-20 min. Se observó que en presencia del antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub>, el PACAP 1-38 no produjo ningún efecto sobre la actividad neuronal (Fig. 14A). La gráfica de distribución acumulada (Fig. 14B) muestra que ni el antagonista por sí solo, ni el PACAP 1-38 produjeron desplazamiento estadísticamente significativo de las curvas de distribución con respecto al control (trazo negro) lo cual indica que no hubo diferencia en la actividad neuronal entre los tres grupos experimentales ( $p > 0.05$ , prueba Kolgomorov-Smirnov). La gráfica de cajas (Fig.14C) confirma que no hubo diferencias

significativas entre las distribuciones de los datos de los tres grupos ( $p > 0.05$ , prueba de Friedman,  $n = 186$ ).



**Figura 14. El bloqueo los receptores PAC<sub>1</sub> suprime el efecto del PACAP 1-38.** A) Gráfico tipo *raster* que muestra la actividad espontánea de 186 células registradas de 4 experimentos en la región rostral de NAcSh. La aplicación, por sí sola, del antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub>, el PACAP 6-38

(50 nM, línea superior negra) no produjo cambio en la actividad celular con respecto al control. Al agregar PACAP 1-38 (25 nM, área gris) en presencia del antagonista tampoco provocó cambios en la actividad neuronal. **B)** Gráfica de distribución acumulada de la actividad celular en control (trazo negro), PACAP 6-38 (trazo azul) en presencia del agonista PACAP 1-38 (trazo rojo). La superposición de las tres curvas indica que el efecto fue bloqueado por el antagonista del PACAP 1-38 ya que no se mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ , prueba Kolmogorov-Smirnov,  $n=186$ ). **C)** Gráfico de cajas que representa la actividad celular. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad celular en las tres condiciones ( $p > 0.05$ , prueba de Friedman,  $n =186$ ).

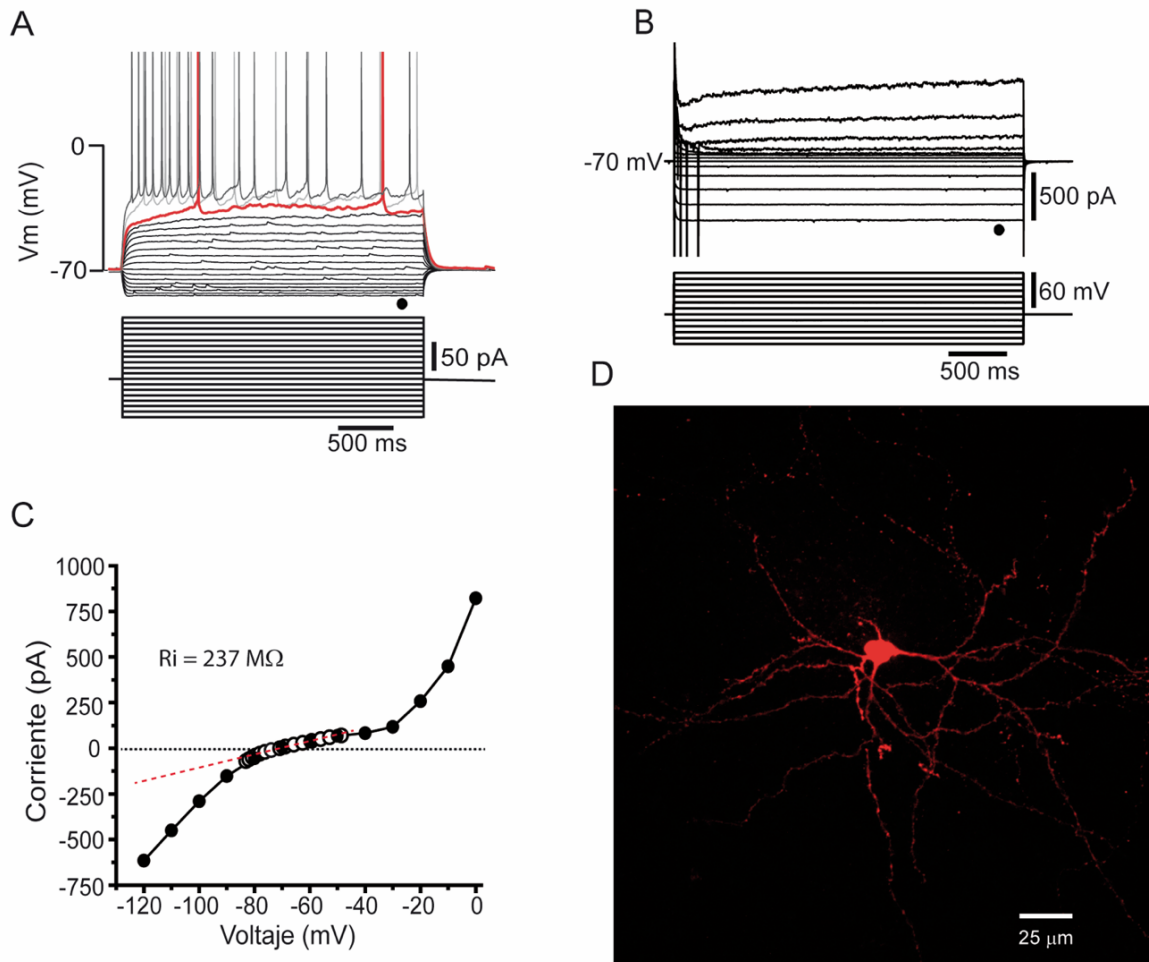
#### **7.4 Identificación electrofisiológica de las NEM de proyección del NAcSh**

Para estudiar el efecto del PACAP 1-38 sobre las NEM de proyección, las cuales representan el 95% del total de la población neuronal del NAc (Belleau y Warren, 2000; Gagnon, 2017; Russo y Nestler, 2013; Salgado y Kaplitt, 2014; Soares-Cunha *et al.*, 2018); estas neuronas fueron identificadas con base en sus características electrofisiológicas las cuales han sido descritas tanto en el estriado dorsal como en el NAc (Belleau y Warren, 2000; Al-muhtasib *et al.*, 2018; Willet *et al.*, 2018).

Se registraron las respuestas de las células a pulsos de corriente o comandos de voltaje hiperpolarizantes y despolarizantes medidas tanto en fijación de corriente (Fig. 15A) como en fijación de voltaje (Fig. 15B, ver Métodos). Estas repuestas fueron medidas en el estado estable del registro (círculo negro) y las mediciones fueron utilizadas para construir las curvas corriente-voltaje (I-V, ver Fig. 15C). La figura 15A muestra la respuesta del potencial de membrana de una NEM ante pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes de 2 s de duración, con aumentos graduales de 10 pA y obtenidos a un potencial de mantenimiento de -70 mV. Como

puede observarse, la neurona muestra un retardo en la generación del potencial de acción (PA) cerca del umbral de disparo (trazo rojo). Asimismo, a inyecciones de corriente mayores a 100 pA, la célula muestra adaptación del disparo de los PA. Además, la respuesta de voltaje muestra una rectificación a potenciales hiperpolarizados la cual, se sabe, se debe a la activación de canales de potasio que median una corriente rectificadora entrante ( $K_{ir}$ ) y que es característica de estas neuronas (Nisenbaum y Wilson, 1995). La figura 15C muestra las curvas I-V obtenidas de los registros en fijación de voltaje (círculos negros) y en fijación de corriente (círculos blancos) de la misma neurona ilustrada en 15A y 15B. La superposición de ambas curvas demuestra que la resistencia en serie fue compensada adecuadamente durante el experimento. La  $R_i$  de las células se obtuvieron ajustando una recta a las curvas I-V en los valores cercanos a la corriente cero. El valor de la  $R_i$  se obtiene calculando el inverso del valor de la pendiente de la recta de acuerdo con la ley de Ohm. Para el ejemplo que se muestra en la figura 15C el valor de  $R_i$  fue de 237 M $\Omega$ . Este valor cae dentro del rango reportado para las NEM tanto del estriado dorsal como en las NEM del NAc (Belleau y Warren, 2000; Willet *et al.*, 2018). Además de determinar sus características electrofisiológicas, las neuronas registradas fueron marcadas con biocitina disuelta en la solución interna con la cual se llena el electrodo de registro (ver Método). La figura 15D muestra una NEM típica del NAcSh cuyas características morfológicas coinciden con las que se han descrito previamente para las NEM de este núcleo. Estas características son: un árbol dendrítico profuso que se extiende aproximadamente, unas 180 micras alrededor de un soma pequeño de 12-15 micras de diámetro.

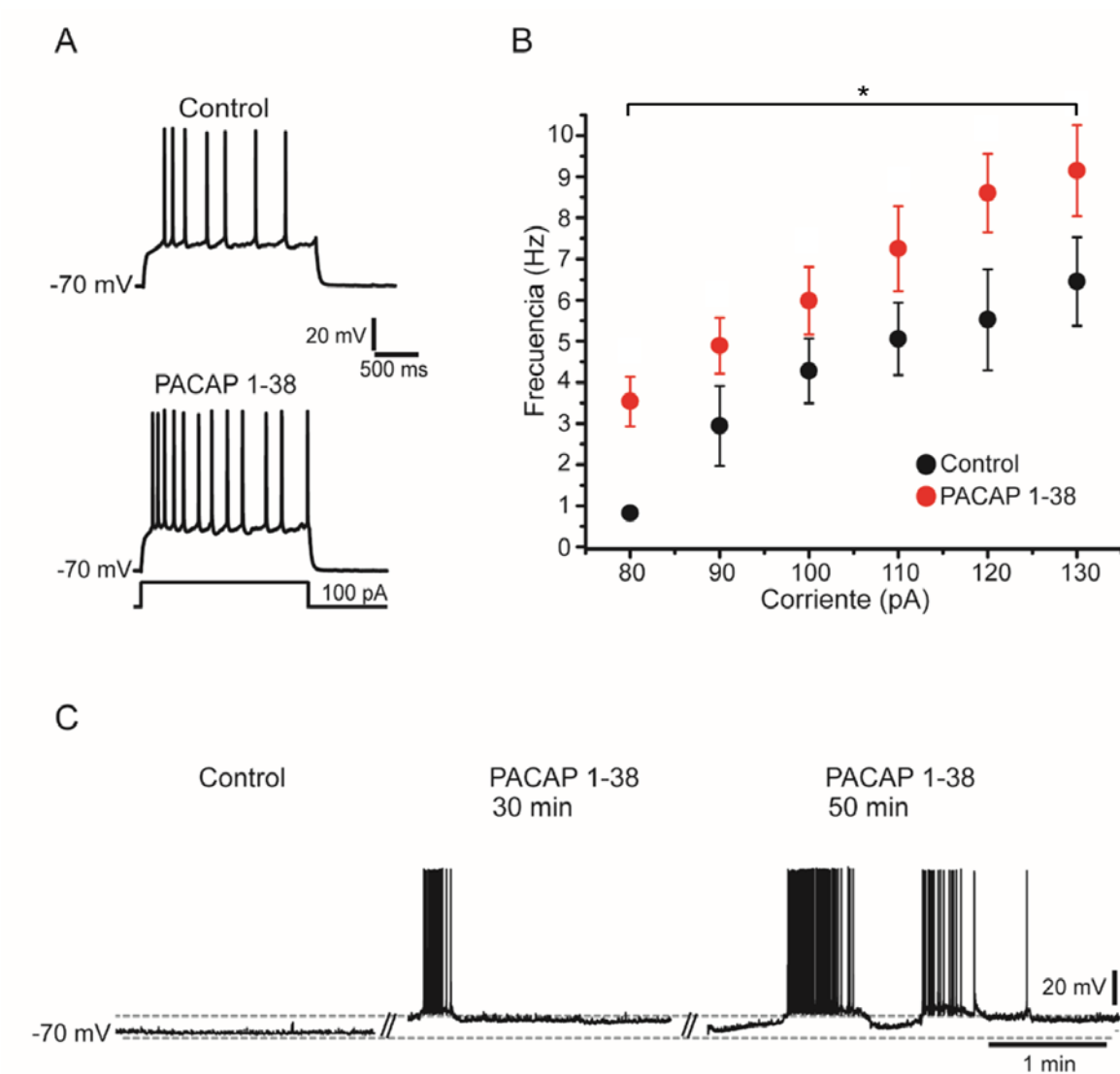




**Figura 15. Identificación electrofisiológica y morfológica de una NEM.** **A)** Trazos de voltaje (arriba) obtenidos como respuesta del potencial de membrana de una neurona NEM GABAérgica del NAcSh ante pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes (abajo). Notar la rectificación del voltaje durante la inyección de corriente hiperpolarizante **B)** Trazos de corriente (arriba) obtenidos como respuesta a comandos de voltaje desde -120 a 0 mV (abajo) con incrementos de 10 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -70 mV. **C)** Curvas I-V obtenidas en fijación de voltaje (círculos negros) y en fijación de corriente (círculos blancos) los valores de voltaje y de corriente se tomaron de A y B respectivamente, en el punto señalado con el círculo negro. Nótese la rectificación del voltaje observada como una inflexión de la curva a partir de la línea (roja) a valores negativos del voltaje. **D)** Microfotografía de una NEM típica, registrada en el NAcSh y marcada con biocitina. La densa arborización, el tamaño pequeño del soma y las espinas dendríticas son características morfológicas de estas células.

### **7.5 El PACAP 1-38 incrementa la frecuencia de disparo de las NEM del NAcSh**

Una vez identificadas las NEM de proyección del NAcSh se utilizó el protocolo para la obtención de las curvas de intensidad-frecuencia (I-F) en fijación de corriente, para estudiar el efecto del PACAP 1-38 sobre la tasa de disparo (ver Métodos). La figura 16A muestra las respuestas de una neurona a un pulso de corriente despolarizante de 100 pA, en condición control (trazo superior) y 20 min después de aplicar PACAP 1-38 (25 nM) en la solución de perfusión (trazo inferior). Como puede observarse, la aplicación de PACAP 1-38 produjo un claro aumento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción. La figura 16B ilustra las curvas I-F en condición control (círculos negros) y después de la administración de PACAP 1-38 (círculos rojos) de 7 células registradas. A todos los valores de corriente inyectada la frecuencia de disparo fue mayor en presencia del agonista de los receptores PAC<sub>1</sub>. La frecuencia alcanzada a la máxima corriente inyectada (130 pA) fue de  $9.2 \pm 1.0$  Hz vs  $6.3 \pm 0.7$  Hz en PACAP 1-38 y control, respectivamente (\*p < 0.05, n = 7). En la misma célula ilustrada en A, se probó el efecto del agonista sobre la actividad espontánea (Fig. 16C). Para ello, la neurona se registró a su potencial de reposo, esto es, sin inyección de corriente. Como puede observarse, el PACAP 1-38 provocó fluctuaciones en el potencial de membrana que osciló entre un estado de reposo y un estado despolarizado con disparo de potenciales de acción en ráfagas a partir de los 30 min de aplicación del fármaco. El efecto no se revirtió después de 50 min y las oscilaciones del potencial de membrana se hicieron más frecuentes y con mayor duración del disparo en ráfagas. Este tipo de actividad no se observó en la condición control.



**Figura 16. El PACAP 1-38 aumenta la tasa de disparo de las NEM del NAcSh. A)** Disparo típico de una neurona NEM del NAcSh ante un pulso de corriente despolarizante en condición control (arriba) y en presencia de PACAP 1-38 (25 nM) (abajo). Se observa un incremento en el disparo de potenciales de acción al agregar PACAP 1-38. **B)** Curvas I-F obtenidas en condición control (círculos negros) y después de agregar PACAP 1-38 (círculos rojos). A todos los valores de corriente inyectada, la frecuencia de disparo fue mayor en presencia del agonista de los receptores PAC<sub>1</sub> ( $p < 0.05$ , prueba U de Mann-Whitney,  $n = 7$ ). **C)** Registros del potencial de membrana espontáneo, sin inyección de corriente. Después de 30 min de la aplicación de PACAP 1-38, la neurona se despolariza y exhibe disparo en ráfagas (*up and downs*), el cual se hace recurrente a los 50 min de la administración del péptido.

### **7.6 El antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub> bloquea el incremento de la frecuencia de disparo producida por PACAP 1-38**

El protocolo para la obtención de las curvas de intensidad-frecuencia (I-F) se repitió en otro grupo experimental, pero en este caso el PACAP 1-38 se aplicó en presencia del antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub>, el PACAP 6-38 (50 nM), el cual se administró durante 15 min antes de aplicar el agonista. La figura 17A muestra la respuesta de una neurona a un pulso de corriente despolarizante de 160 pA (2 s de duración) en condición control (trazo superior) y después de aplicar PACAP 1-38 (25 nM) en presencia del antagonista (trazo inferior). Puede observarse que en estas condiciones el PACAP 1-38 no provocó ningún cambio en la frecuencia de disparo. La figura 17B muestra las curvas I-F obtenidas con solo el antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub> (círculos negros) y después de agregar PACAP 1-38 (círculos rojos) de 7 células. La sobreposición de ambas curvas demuestra que no hubo un efecto sobre la tasa de disparo. La frecuencia alcanzada a la máxima corriente inyectada (160 pA) fue de  $9.0 \pm 0.4$  Hz vs  $9.2 \pm 0.2$  Hz en PACAP 6-38 y PACAP 1-38, respectivamente ( $p > 0.05$ ,  $n = 6$ ). En presencia del antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub>, el PACAP 1-38 tampoco tuvo efecto sobre la actividad espontánea (Fig. 17C).

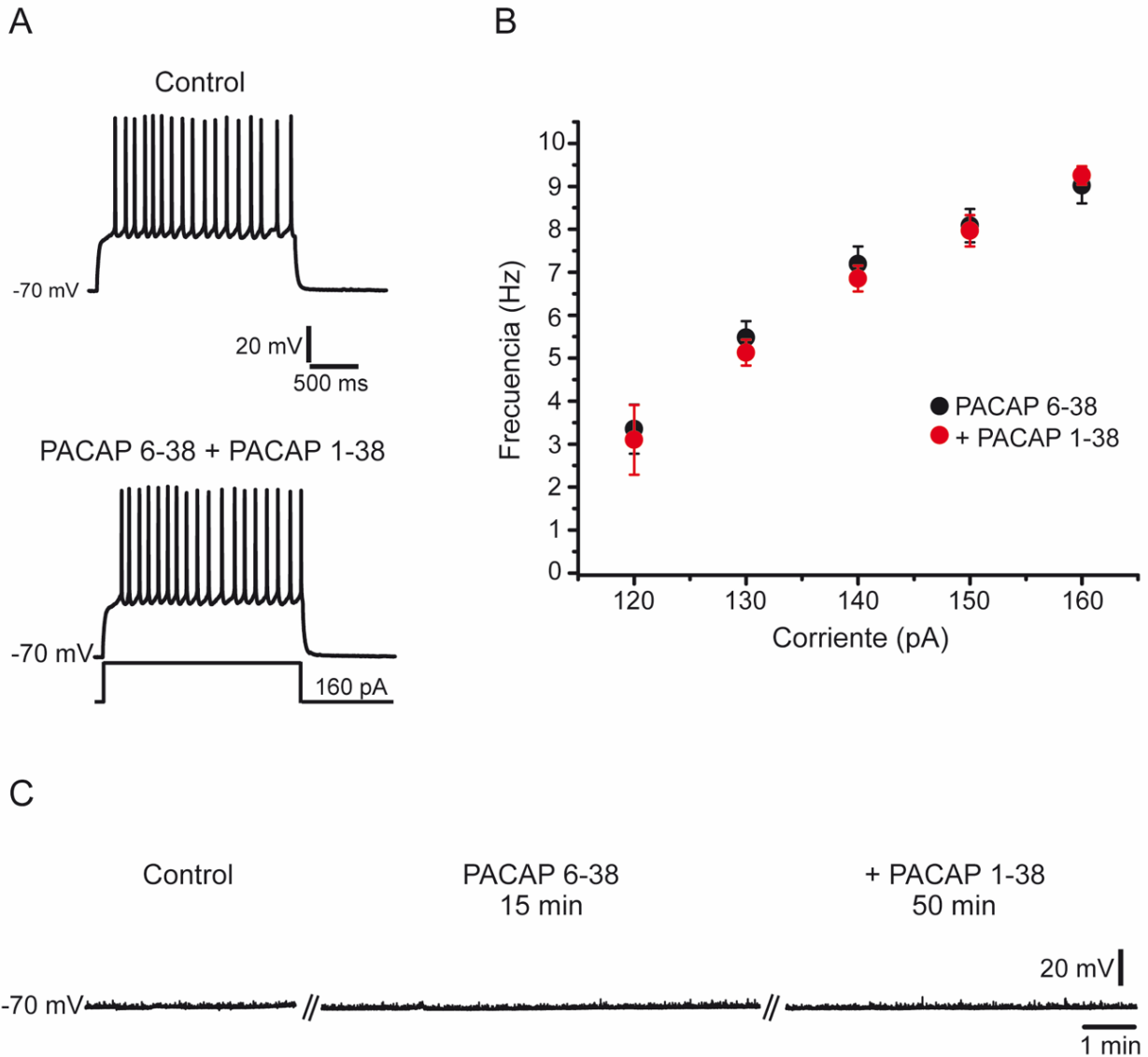


Figura 17. **El antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub> bloquea el incremento de la tasa de disparo producida por el PACAP 1-38.** **A)** Disparo de potenciales de acción de una neurona NEM del NAcSh ante un pulso de corriente despolarizante en condición control (arriba) y en PACAP 6-38 (50 nM) más PACAP 1-38 (25 nM) (abajo). El antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub>, suprimió el aumento del disparo producido por PACAP 1-38. **B)** Curvas I-F obtenidas en condición control (círculos negros) y después de agregar PACAP 1-38 en presencia del antagonista (círculos rojos). Las dos curvas se superponen indicando ausencia de diferencia entre las dos condiciones ( $p > 0.05$ , prueba U de Mann-Whitney,  $n = 7$ ). **C)** El PACAP 6-38 también bloquea el efecto sobre el disparo espontáneo producido por el agonista. A la izquierda, se muestra la respuesta de una neurona GABAérgica del NAc sin inyección de corriente. En medio se muestra la aplicación del PACAP 6-38, antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub> y a la derecha al agregar PACAP 1-38 en presencia de PACAP 6-38. Nótese que,

en presencia del antagonista, el PAC 1-38 no provocó desplazamiento del potencial de reposo ni causó disparo neuronal.

## **8. DISCUSIÓN**

Los resultados de la presente tesis muestran que el PACAP 1-38 ejerce un efecto excitatorio sobre la mayoría de las neuronas del NAcSh, de acuerdo con los porcentajes obtenidos con la técnica de imagenología de calcio. Este efecto excitatorio es dependiente de la concentración de PACAP y se obtuvo una  $EC_{50}$  igual a 10.5 nM a nivel poblacional. También se demostró que la excitación es mediada a través de receptores  $PAC_1$ , ya que al aplicar PACAP 6-38, un antagonista para estos receptores, se suprimió el efecto excitatorio inducido por el PACAP 1-38. Estos resultados concuerdan con estudios previos de inmunohistoquímica que reportan la presencia de receptores  $PAC_1$  (Vaudry *et al.*, 2009). Por otra parte, los experimentos electrofisiológicos permitieron identificar a las NEM del NAcSh las cuales representan el 98% del total de población neuronal de este núcleo y cuyas características electrofisiológicas, incluyendo la resistencia de entrada ( $R_i$ ), la corriente rectificadora entrante ( $K_{ir}$ ) y la latencia del disparo, entre otras, correspondieron con las descritas anteriormente para las NEM, tanto del NAc, como del estriado dorsal (Nisenbaum y Wilson, 1995; Belleau y Warren, 2000; Willet *et al.*, 2018). Además de los criterios electrofisiológicos, el marcado con biocitina de las neuronas registradas reveló una morfología consistente con la reportada para las NEM del NAc (Al-muhtasib *et al.*, 2018, ver Fig. 15). Los experimentos electrofisiológicos mostraron que el PACAP 1-38 ejerce un efecto excitatorio sobre las NEM del NAcSh. Este efecto consistió en un aumento en la frecuencia de disparo

y la facilitación de la actividad oscilatoria del potencial de membrana de las NEM del NAcSh. Es importante señalar que esta actividad oscilatoria, que se caracteriza por el disparo recurrente en ráfagas de potenciales de acción (*up and downs*), ha sido reportada en las neuronas NEM estriatales tanto *in vivo* (Wilson, 1993; Stern *et al.*, 1997) como *in vitro* (Vergara *et al.*, 2003; Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Más aún, en experimentos de imagenología de calcio realizados en el estriado dorsal, se ha demostrado que los transitorios de calcio se correlacionan perfectamente con el disparo recurrente en ráfagas lo que a su vez da lugar a los patrones espaciotemporales de actividad de las redes neuronales (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). En nuestros experimentos, tanto el incremento del disparo como la actividad oscilatoria exhibida por las NEM fueron bloqueados con el antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub>, lo cual concuerda con los datos obtenidos con la técnica de imagenología de calcio. Es importante notar que el efecto excitatorio del PACAP 1-38 tardó entre 20 y 30 min en observarse después de aplicar el péptido, una vez instalado dicho efecto fue persistente y se mantuvo por al menos 25 min después del lavado de la droga (ver Fig. 16). Esto es consistente con un efecto mediado por receptores metabotrópicos. El receptor PAC<sub>1</sub> es un receptor metabotrópico que puede estar acoplado a una proteína Gs o Gq las cuales tienen distintas cascadas de señalización celular (Vaudry *et al.*, 2009; Rubio-Beltrán *et al.*, 2018). Contrariamente al efecto excitatorio descrito en este trabajo, anteriormente se ha reportado un efecto inhibitorio del PACAP 1-38 sobre las neuronas del NAc (Hurley, 2016). Estas discrepancias pueden deberse a factores distintos en los protocolos experimentales. Primero, en el trabajo referido, los registros electrofisiológicos se hicieron principalmente en el NAcC. Segundo, los experimentos se realizaron en

presencia de CNQX y picrotoxina, bloqueadores de receptores AMPA/kainato y de GABA, respectivamente, lo cual pudo alterar la respuesta de las células al péptido. Tercero, en el trabajo citado, las neuronas no fueron identificadas ni morfológica ni electrofisiológicamente, por lo tanto, es posible que no todas las neuronas registradas fueran NEM. Además, el presente trabajo no descarta un efecto inhibitorio del PACAP 1-38. De hecho, nuestros resultados de imagenología de calcio muestran que el péptido tiene un efecto inhibitorio sobre una subpoblación (24 %) de neuronas del NAcSh, aunque en la mayor población se observa un efecto excitatorio (ver Fig. 13).

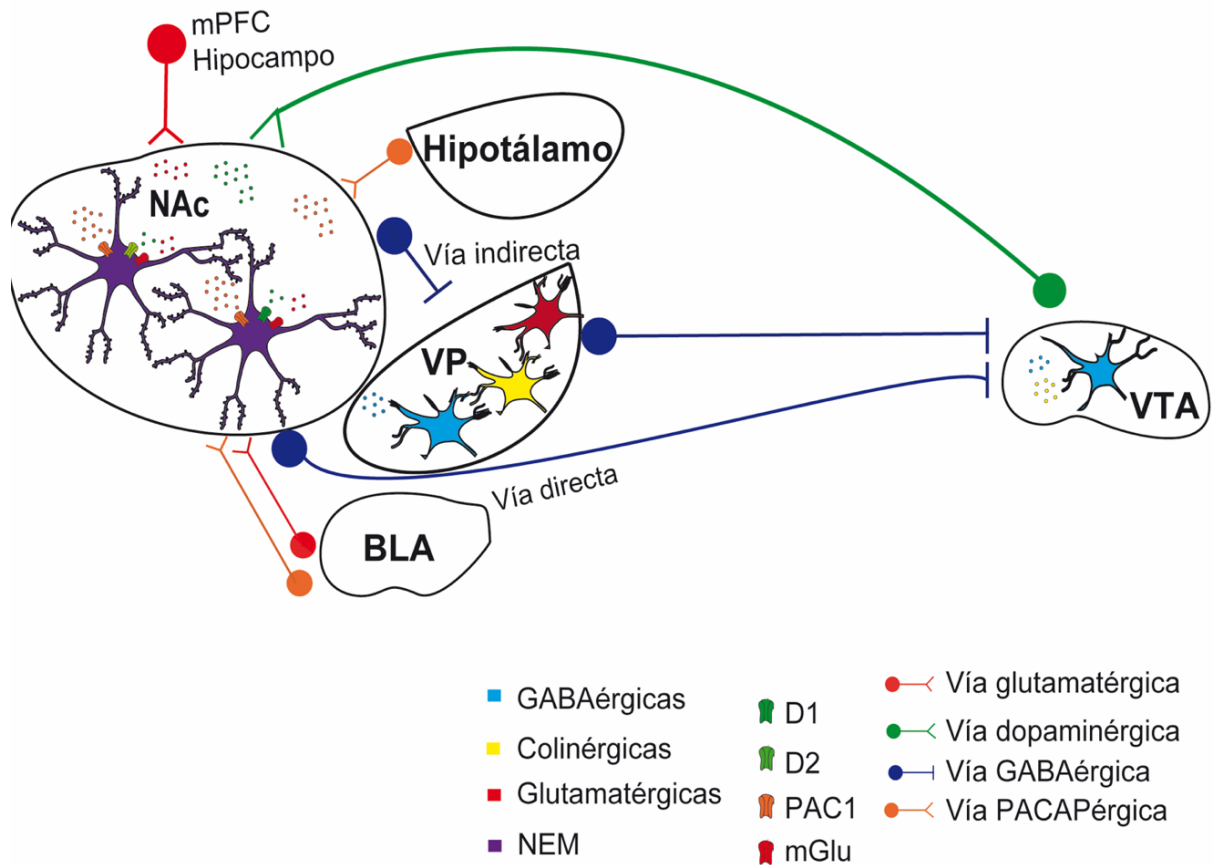
El NAc está relacionado con trastornos alimenticios y particularmente con el trastorno por atracón el cual se asocia a un aumento en los niveles de dopamina extracelular, sobre todo en el NAcSh (Rada *et al.*, 2005). Por otra parte, estudios conductuales han demostrado que el PACAP 1-38 inyectado en el NAc tiene un efecto anorexigénico reduciendo la ingesta de alimento palatable (Hurley *et al.*, 2016). Esto permite especular que el PACAP 1-38 podría producir un decremento en los niveles de dopamina en el NAc. Sin embargo, esto no ha sido demostrado y hacen falta estudios dirigidos a elucidar esta hipótesis. Nuestros resultados demostraron que el PACAP 1-38 aumenta la actividad global de las NEM de proyección del NAcSh y, como se sabe, este núcleo proyecta sus eferentes hacia el VTA a través de dos vías: una vía directa (NAc-VTA), la cual se origina de las NEM que expresan receptores dopaminérgicos D1 y una vía indirecta (NAc-VP-VTA), que va del NAc al VP y de ahí al VTA y se origina de NEM que expresan tanto receptores dopaminérgicos D1 como de NEM que expresan receptores



dopaminérgicos D2 (Haber *et al.*, 2011; Tolu *et al.*, 2013; Soares-Cunha *et al.*, 2018).

El efecto anorexigénico del PACAP 1-38 en el NAc podría explicarse por sus acciones a través de la vía directa (ver Fig.18). Al activar las NEM que proyectan hacia el VTA el PACAP 1-38 podría promover la liberación de GABA en este núcleo inhibiendo la liberación de dopamina en el NAcSh y por lo tanto inhibiendo la conducta de recompensa y motivacional del consumo de alimentos palatables, como fue reportado por Hurley y colaboradores en 2016.

Alternativamente, el PACAP 1-38 también podría inhibir las neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan al NAc a través de la vía indirecta. Aunque la mayor población de neuronas del VP son de naturaleza GABAérgica, es bien conocido que existen en este núcleo subpoblaciones de neuronas que expresan acetilcolina o glutamato (Záborszky y Cullian, 1992; Root *et al.*, 2016) y que estarían ejerciendo un efecto excitatorio sobre el VTA. Al activar las NEM del NAcSh, el PACAP podría inhibir estas entradas excitatorias al VTA reduciendo la liberación de dopamina en el NAc (ver Fig. 18).



**Figura 18. Diagrama de posibles efectos del PACAP 1-38 en el circuito de recompensa.** La imagen representa a las principales neuronas que hay en las diferentes estructuras relacionadas con la recompensa. En el NAc se muestran las neuronas GABAérgicas que expresan receptores dopaminérgicos D1 y D2 (verde), receptores PACAPérgicos PAC<sub>1</sub> (naranja) y receptores metabotrópicos glutamatérgicos mGlu (rojo). También, se representan las aferencias dopaminérgicas (verde) que provienen del VTA hacia el NAc, las aferencias glutamatérgicas (rojo) que provienen del hipocampo, corteza prefrontal medial (mPFC) y amígdala basolateral (BLA) y las señalizaciones PACAPérgicas (naranja) que provienen del hipotálamo y de BLA. En el esquema se ilustran las eferencias GABAérgicas (azul) del NAc hacia el VTA. La imagen también muestra la vía directa del NAc en la cual, hay proyecciones GABAérgicas (azul) directas desde el NAc hacia el VTA. Por último, se ilustra la vía indirecta en donde el pálido ventral (VP) tiene aferencias GABAérgicas (azul) del NAc y posteriormente el VP tiene eferencias GABAérgicas (azul) hacia el VTA.

Por último, como se mencionó anteriormente, las conductas motivadas están reguladas, principalmente, por la liberación de dopamina en el NAc. Particularmente, el aumento de dopamina en el NAcSh está asociado con el

componente hedónico de la ingesta de alimento (Rada *et al.*, 2005). Si se comprueba que el PACAP 1-38 decrementa la liberación de dopamina hacia el NAc mediante la activación de las NEM y la subsecuente liberación de GABA en el VTA. El receptor PAC<sub>1</sub>, podría proponerse como un blanco terapéutico para un posible tratamiento farmacológico de pacientes que presentan trastornos alimenticios como la ingesta por atracción, obesidad mórbida y en general, trastornos que se relacionan con el consumo excesivo de alimentos.

## 9. CONCLUSIONES

1. La administración de PACAP 1-38 aumenta la actividad poblacional de las NEM del NAcSh.
2. El efecto del PACAP 1-38 es específico y mediado a través de receptores PAC<sub>1</sub>, ya que se bloquea en presencia de PACAP 6-38, un antagonista de dichos receptores.
3. La administración de PACAP 1-38 produjo despolarización y aumento en la tasa de disparo de las NEM del NAcSh identificadas por sus características electrofisiológicas y morfológicas.
4. Asimismo, la aplicación de PACAP 1-38 también provocó disparo espontáneo y actividad oscilatoria (*up and downs*) la cual ha sido descrita en las NEM del estriado. Este efecto fue también bloqueado por un antagonista de los receptores PAC<sub>1</sub>.

Aunque los experimentos de imagenología de calcio mostraron un efecto predominantemente excitatorio (60%), también se observaron respuestas

inhibitorias o no efecto en otros grupos celulares, lo cual es congruente con la heterogeneidad de poblaciones neuronales que existen en el núcleo accumbens.

## 9. REFERENCIAS

- AL-MUHTASIB, N., Forcelli, P. A., Vicini, S. (2018). Differential electrophysiological properties of D1 and D2 spiny projection neurons in the mouse nucleus accumbens core. *Original Research: Physiological Reports*, 6, 1-13.
- AMBROGGI, F., Ghazizadeh, A., Nicola, S. M. y Fields, H. (2011). Roles of Nucleus Accumbens Core and Shell in Incentive-Cue Responding and Behavioral Inhibition. *The Journal of Neuroscience*, 31(18), 6820-6830.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th ed. Washington, DC, U.S.A.
- APARICIO-JUÁREZ, A., Duhne, M, Lara-González, E., Ávila-Cascajares, F., Calderón, V., Galarraga, E., Bargas, J. (2017). Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *European Journal Neuroscience*, 9, 1-15.
- APONTE, Y., Atasoy, D., y Sternson, S. M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature Neuroscience*, 14 (3), 351-5.
- ATASOY, D. Betley, J. y Sternson, S. M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*, 488 (7410), 172-7.
- AVENA, N., Bocarsly, M., Rada, P., Kim, A. y Hoebel, B. (2008). After daily bingeing on a sucrose solution, food deprivation induces anxiety and accumbens dopamine/acetylcholine imbalance. *Physiology and Behavior*, 94, 309-315.
- AVENA, N., Rada, P. y Hoebel, B. (2009). Sugar and Fat Bingeing Have Notable Differences in Addictive-like Behavior. *The Journal of Nutrition*, 139, 623-28.

- BELLEAU, M. L. y Warren, R. A. (2000). Postnatal Development of Electrophysiological Properties of Nucleus Accumbens Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 84(5), 2204-2216.
- BERRIDGE, K. y Grill, H. J. Isohedonic tastes support a two-dimensional hypothesis of palatability (1984). *Appetite*, 5, 221-231.
- BERRIDGE, K. (2009). 'Liking' and 'wanting' food rewards: Brain substrates and roles in eating disorders. *Physiology and Behavior*, 97(5), 537-50.
- BERRIDGE, K., Robinson, T. y Aldridge, W. (2009). Dissecting components of reward: liking', 'wanting', and learning. *Current Opinion in Pharmacology*, 9 (1), 65-73.
- BERRIDGE, K., Ho, C., Richard, J. y DiFeliceantonio, A. (2010). The tempted brains eats: Pleasure and desire circuits in obesity. *Brain Research*, 43-64.
- BERRIDGE, K. y Kringelbach, M. (2013). Neuroscience of affect: brain mechanisms of pleasure and displeasure. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(3), 294-303.
- BERRIDGE, K. y Kringelbach, M. (2016). Pleasure systems in the brain. *Neuron*, 86(3), 646-664.
- BERTHOUD, H. (2006). Homeostatic and Non-homeostatic Pathways Involved in the Control of Food Intake and Energy Balance. *Obesity*, 14, 197-200.
- BINDRA, D. (1974). A motivational view of learning, performance, and behavior modification. *Psychological Review*, 81(3), 199-213.
- BOLLES, R. (2006). Teoría de la motivación: investigación experimental, México, Ciudad de México: Trillas.

- BROWN, L. (1993). *The New Shorter Oxford English Dictionary on Historical Principles*. Oxford and New York: Clarendon Press: Oxford University Press.
- CARDOSO, J. C., Vieira, F. A., Gomes, A. S. y Power, D. M. (2010). The serendipitous origin of chordate secretin peptide family members. *Evolutionary Biology*, 6, 10-135.
- CARRILLO-REID, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernandez-Cruz A., Galarraga E., Drucker-Colin y R., Vargas J. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *Journal of Neurophysiology*, 99(3), 1435-1450.
- CASTRO, D. y Berridge K. (2014). Opioid hedonic hotspot in nucleus accumbens shell: mu, delta, and kappa maps for enhancement of sweetness 'liking' and 'wanting'. *Journal of Neuroscience*, 34, 4239–50.
- CASTRO, D., Cole, S. L. y Berridge, K. (2015). Lateral hypothalamus, nucleus accumbens, and ventral pallidum roles in eating and hunger: interactions between homeostatic and reward circuitry. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9(90), 1-17.
- CASTRO, D., Terry, R. y Berridge, K. (2016). Orexin in Rostral Hotspot of Nucleus Accumbens Enhances Sucrose 'Liking' Toward 'Disgust' and 'Fear'. *Neuropsychopharmacology*, 41(8), 2101-111.
- CENTRO NACIONAL DE EQUIDAD DE GÉNERO Y SALUD REPRODUCTIVA. (2004). *Guía de Trastornos Alimenticios*. México, DF: Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva.
- COLE, S. L., Robinson, M. J. F. y Berridge, K. C. (2018). Orogenetic self-stimulation in the nucleus accumbens: D1 reward versus D2 ambivalence. *Public Library of Science*, 13(11).

- COLEMAN, A. y Sharey, J. (2011). James-Lange Theory. *Encyclopedia of Child Behavior and Development*, 2, 844-846.
- COLL, A.P. (2007). Effects of pro-opiomelanocortin (POMC) on food intake and body weight: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science*, 113(4), 171-182.
- CONE, R.D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, 8, 571-78.
- CORWIN, R. (2006). Bingeing rats: a model of intermittent excessive behavior? *Appetite*, 46, 11–15.
- CORWIN, R., Wojnicki, F. H. E., Zimmer, D. J., Babbs, R. K., McGrath, L., E., Olivos, D., Mietlicki-Baase, E. G. and Hayes, M. (2016). Binge-Type Eating Disrupts Dopaminergic and GABAergic Signaling in the Prefrontal Cortex and Ventral Tegmental Area. *Obesity*, 24, 2118-2125.
- COTTONE, P., Sabino, V., Steardo, L. y Zorrilla, E. (2008). Intermittent access to preferred food reduces the reinforcing efficacy of chow in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and comparative physiology*, 295, (4).
- COTTONE, P., Wang, X., Won, J., Valenza, M., Blasio, A., Kwak, J., Iyer, M., Steardo, L., Rice, K., Hayashi, T. and Sabino, V. (2012). Antagonism of Sigma-1 Receptors Blocks Compulsive-Like Eating, *Neuropsychopharmacology*, 37, 2593-604.
- CUADRO, E. y Baile, J. I. (2015). Binge eating disorder: analysis and treatment, *Revista Mexicana de Trastornos Alimentarios*, 6, 97-107.



- DAS, S., Grunert, M., Williams, L. and Vincent, S. (1997). NMDA and D1 Receptors Regulate the Phosphorylation of CREB and the Induction of *c-fos* in Striatum Neurons in Primary Culture. *Synapse*, 25, 227-233.
- DE MACEDO, I., Soares, J. y da Silva, I. (2016). The Influence of Palatable Diets in Reward System Activation: A Mini Review. *Advances in Pharmacological Sciences*, 1-7.
- DURST, M., Könczöl, K., Balázsa, T., Eyre, M. y Tóth, Z. (2018). Reward-representing D1-type neurons in the medial shell of the accumbens nucleus regulate palatable food intake. *International Journal of Obesity*, 43, 1-11.
- DREWNOWSKI, A., Mennella, J., Johnson, S. y Bellisle, F. (2012). Sweetness and Food Preference. *The Journal of Nutrition*, 142(6), 23-30.
- ESPEL-HUYNH, H. M., Muratore, A. F. y Lowe, M. R. (2018). A narrative review of the construct of hedonic hunger and its measurement by the Power of Food Scale. *Obesity Science and Practice*, 4(3), 238-249.
- FAGET, L., Zell, V., Souter, E., McPherson, A., Ressel, R., Gutierrez-Reed, N., Hoon Yoo, J. y Hnasko T. (2018). Opponent control of behavioral reinforcement inhibitory and excitatory projections from the ventral pallidum. *Nature Communications*, 9(849).
- FERRARIO, C. R., Labouèbe, G., Liu, S., Nieh, E. H., Routh, V. H., Xu, S., O'Connor, E. C. (2016). Homeostasis Meets Motivation in the Battle to Control Food Intake. *The Journal of Neuroscience*, 36(45), 11469-11481.
- FRANCIS, T. C. y Lobo, M. K. (2017). Emerging Role for Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes in Depression. *Biological Psychiatry*, 81, 645-653.

- FLORESCO, S. B. (2015). The nucleus accumbens: an interface between cognition, emotion, and action. *Annual Review of Psychology*, 3(66), 25-52.
- GAGNON, D., Petryszyn, S., Sanchez, M. G., Bories, C., Beaulieu, J. M., De Koninck Y., Parent, A. y Parent, M. (2017). Striatal neurons expressing D1 and D2 receptors are morphologically distinct and differently affected by dopamine denervation in mice. *Scientific Reports*, 7, 1-16.
- GARDUÑO, J., Galindo-Charles, L., Jiménez-Rodríguez, J., Galarraga, E., Tapia, D., Mihailescu, S., Hernández-López, S. (2012). Presynaptic  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors increase glutamate release and serotonin neuron excitability in the dorsal raphe nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 32 (43), 15148-15157.
- GUEVARA, R., Wong, R., Pinzón, E., Arce, M. I., García, D. E., Bravo, M. E., Ventura, R., Gutiérrez, L. Rivera, C. y Juárez, M., A. (2018). Manual operativo: Comité Interno para el cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). Ciudad de México, México.
- HABER, S. N. (2011). Convergence of limbic, cognitive, and motor cortico-striatal circuits with dopamine pathways in the brain. In L. L. Iversen, S. D. Iversen, S. B. Dunnett y A. Björklund (Eds.), *Dopamine handbook* (pp. 38-48). New York: Oxford University Press.
- HANNIBAL, J. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Journal Comparative Neurology*, 453, 389–417.
- HARMAR, A., Fahrenkrug, J., Gozes, I., Laburthe, M., May, V., Pisegna, J., Vaudry, D., Vaudry, H., Waschek, J. y Said, S. (2012). Pharmacology and functions

of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR Review 1. *British Journal of Pharmacology*, 166(1), 4-17.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, S. L., Bargas, J., Surmeier, D.J., Reyes, A., y Galarraga, E. (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *The Journal of Neuroscience*, 17(9), 3334-3342.

HIRABAYASHI, T., Nacamachi, T. y Shioda, S. (2018). Discovery of PACAP and its receptors in the brain. *The Journal of Headache and Pain*, 19(28).

HUDSON, J. I., Hiripi, E., Pope, H. G., Kessler, R. C. (2007). The prevalence and correlates of eating disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Biological Psychiatry*, 61, 348-358.

HURLEY, M., Maunze, B., Block, M., Frenkel, M., Reilly, M., Kim, E., Chen, Y., Li, Y., Baker, D., Liu, Q., Choi, S. (2016). Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide Regulates Hunger- and Palatability Induced Binge eating. *Frontiers in Neuroscience*, 10(383), 1-10.

HURLEY, M., Robble, M., Callan, G., Choi, S. y Wheeler, R. A. (2019). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) acts in the nucleus accumbens to reduce hedonic drive. *International Journal of Obesity*. 43(4), 928-932.

IBÁÑEZ-SANDOVAL O., Tecuepetla, F., UnaL, B., Shah, F., Koós, T. y Tepper, J. Electrophysiological and morphological characteristics and synaptic connectivity of tyrosine hydroxylase-expressing neurons in adult mouse striatum. *Journal of Neuroscience*, 30(20), 6999-7016.

ITEMOLO, A., Valenza, M., Tozier, L., Knapp, C., Kornetsky, C., Streado, L. y Cottone, P. (2014). Withdrawal from chronic, intermittent access to a highly palatable food induces depressive-like behavior in compulsive eating rats. *Behavior*, 593-602.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. 2012. Secretaría de Salud. México. 2012. Recuperado de: <http://ensanut.insp.mx/>.

JOHN, J. y Manchanda, R. (2011) Modulation of synaptic potentials and cell excitability by dendritic KIR and KAs channels in nucleus accumbens medium spiny neurons: a computational study. *Journal of Biosciences*, 36(2), 309–328.

KANDEL, E. R., Schwartz, J. H., Jesell, T. M., Siegelbaum, S. A. y Hudspeth, A.J. (2013). *Principles of Neural Science* (5th ed.). New York, McGraw-Hill, Health Professions Division.

KELLY, A. E. y Berridge, K. C. (2002). The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *Journal of Neuroscience*, 22(9), 3306-3311.

KIMURA, C., Ohkubo, K., Ogi, K., Hosoya, M., Itoh Y., Onda, H., Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R. R., Stibbs, H. H., Arimura, A. y Fujino, M. (1990). A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. *Biochemical Biophysical Res Commun*, 166, 81–89.

KLENOWSKI, P. M., Shariff, M. R., Belmer, A., Fogarty, M. J., Mu, E. W., Bellingham, M. C. y Batlett, S.E. (2016). Prolonged consumption of sucrose in a binge-like

manner, alters the morphology of medium spiny neurons in the nucleus accumbens shell. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 23, 10-54.

LABURTHE, M., Couvineau, A., Gaudin, P., Maoret, J. J., Rouyer-Fessard C. y Nicole P. (1996). Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. *Annals New York Academy of Sciences*, 805, 94–109.

LÜSCHER, C. y Ungless, M. A. (2006). The mechanistic classification of addictive drugs. *PLOS Medicine*, 3(11).

LUTTER, M. y Nestler, E. (2009). Homeostatic an Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. *The Journal of Nutrition*, 139, 629-32.

MAHLER, S. V., Smith, K. S. y Berridge, K. C. (2007). Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances `liking´ of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology*, 11(31), 2267-2278.

MANCINO, S., Mendonça-Netto, S., Martín García, E. y Maldonado, R. (2017). Role of DOR in neuronal plasticity change promoted by food-seeking behaviour. *Addiction Biology*, 22(5), 1179-190.

MARANO, D., Fonseca, G. y Egido, N. (2010). Binge eating disorder and depression: A systematic review. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 11(12), 199-207.

MASUO, Y., Suzuki, N., Matsumoto, H., Tokito, F., Matsumoto, Y., Tsuda, M. y Fujino, M. (1993). Regional distribution of pituitary adenylate cyclase activating

polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Research*, 602, 57–63.

MATSUDA, K., Hagiwara, Y., Shibata, H., Sakashita, A. y Wada, K. (2013). Ovine corticotropin-releasing hormone (oCRH) exerts an anxiogenic-like action in the goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 188, 118-122.

MICHA, R., Khatibzadeh, S., Shi, P., Fahimi, S., Lim, S., Andrews, K., Engell, R., Powles, J., Ezzati, M., Mozaffarian, D. (2014). Global, regional, and national consumption levels of dietary fats and oils in 1990 and 2010: a systematic analysis including 266 country-specific nutrition surveys. *British Medical Journal*, 384, 1-20.

MIYATA, A., Arimura, A., Dahl, R. R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang L., Culler, M. D. y Coy, D. H. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 164, 567–574.

MORLEY, J. E., Horowitz, M., Morley, P. M., Flood, J. F. (1992). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) reduces food intake in mice. *Peptides*, 13, 1133-1135.

MOUNIEN, L., Do, Rego, J. C., Bizet, P., Boutelet, I, Gourcerol, G., Fournier, A., Brabet, P, Costenin, J., Vaudry, H. y Jégou, S. (2009). Pituitary adenilate cyclase-activating polypeptide inhibits food intake in mice through activation of the hypothalamic melanocortin system. *Neuropsychopharmacology*, 34(2), 424-435.

- MUCIO-RAMIREZ, S., Miler-Pérez, C., Curras-Collazo, M. y León-Olea, M. (2004). El polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP): actualización de conocimientos. *Salud Mental*, 27(2), 55-69.
- NISENBAUM, E. S. y Wilson, C. J. (1995). Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *Journal of Neuroscience*, 15, 4449-4463.
- NGUYEN, T. T., Kambe, Y., Kurihara, T., Nakamachi, T., Shintani, N., Hashimoto, H. y Miyata, A. in the Ventromedial Hypothalamus Is Responsible for Food Intake Behavior by Modulating the Expression of Agouti-Related Peptide in Mice. *Molecular Neurobiology*, 57, 2101-2114.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2018). Obesidad y Sobrepeso. World Health Organization. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- PANAGIS, G., Nomikos, G. G., Miliareisis, E., Chergui, K., Kastellakis, A., Svensson T. y Spyraiki C. (1997). Ventral pallidum self-stimulation induces stimulus dependent increase in c-fos expression in reward-related brain regions. *Neuroscience*, 77(1), 175–186.
- PAXINOS, G. y Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. London: Academic Press.
- PECIÑA, S. y Berridge K. (2000). Opioid site in nucleus accumbens shell mediates eating and hedonic `liking´ for food: map based on microinjection. *Brain Research*, 863, 71-86.
- PECIÑA, S., Smith, K. y Berridge, K. (2006). Hedonic Hot Spots in the Brain. *The Neuroscientist*, 12(6), 500-11.

- PÉREZ-ORTEGA, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., Hernández-Cruz, A. y Bargas, J. (2016). Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiology Disease*, 91, 347-361.
- PETERSON, R. E., Latendresse, S. J., Bartholome, L. T., Warren, C. S. y Raymond, N. C. (2012). Binge Eating Disorder Mediates Links between Symptoms of Depression, Anxiety, and Caloric Intake in Overweight and Obese Women. *Journal of Obesity*, 12, 1-8.
- RADA, P., Avena, N. y Hoebel, G. (2005). Daily bingeing on sugar repeatedly release dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience*, 134, 737-44.
- RESCH, J., Maunze, B., Gerhardt, A., Magnuson, S., Philips, K., y Choi, S. (2013). Intrahypothalamic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates energy balance via site-specific actions on feeding and metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 305(12), 1452-63.
- REYNOLDS, S. M. y Berridge, K. C. (2008). Emotional environments retune the valence of appetitive versus fearful functions in nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, 11 (4), 423-425.
- ROGERS, P., y Smit, H. (2000). Food craving and food “addiction”: A critical review of the evidence from a biopsychosocial perspective. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 66(1), 3-14.
- ROOT, D. H., Melendez, R. I., Zaborsky L. y Napier, T. C. (2016). The ventral pallidum: Subregion-specific functional anatomy and roles in motivated behaviors. *Progress in Neurobiology*, 130, 29-70.



- RUBIO-BELTRÁN, E., Correnti, E., Deen, M., Kamm, K., Kelderman, T., Papetti, L., Vigneri, S., Maassen, Van Den Brink, A. y Edvinsson, L. (2018). PACAP38 and PAC<sub>1</sub> receptor blockade: a new target for headache? *The Journal of Headache Pain*, 19(1), 1-11.
- RUSO, S. J., Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(10), 609-625.
- SALGADO, S. y Kaplitt, M. (2014). The Nucleus Accumbens: A Comprehensive Review. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 93, 75-96.
- SCOFIELD, M. D., Heinsbroek, J. A., Gipson, C. D., Kupchik, Y. M., Spencer, S., Smith, C. W., Roberts-Wolfe, D., y Kalivas, P. W. (2016). The Nucleus Accumbens: Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis. *Pharmacological Reviews*, 68, 816-871.
- SEKAR, R., Wang, L., y Chong, B. (2017). Central Control of Feeding Behavior by the Secretin, PACAP, and Glucagon Family of Peptides. *Frontiers in Endocrinology*, 8(18), 1-14.
- SOARES-CUNHA, C., Coimbra, B., Domingues, A. V., Vasconcelos, N., Sousa, N. y Rodrigues, A. J. (2018). Nucleus Accumbens Microcircuit Underlying D2-MSN-Driven Increase in Motivation. *eNeuro Cognition and Behavior*, 5 (12), 1-16.
- SOARES-CUNHA, C., de Vasconcelos, N. A. P., Coimbra, B., Domingues, A. V., Silva, J. M., Loureiro-Campos, E., Gaspar, R., Sotiropoulos, I., Sousa, N. y Rodrigues, A. J. (2020). Nucleus accumbens medium spiny neurons

- subtypes signal both reward and aversion. *Molecular Psychiatry*, (25), 3241-3255.
- STERN, E. A., Kincaid, A. E. y Wilson, C. J. (1997). Spontaneous subthreshold membrane potential fluctuations and action potential variability of rat corticostriatal and striatal neurons *in vivo*. *Journal of Neurophysiology*, 77, 1697-1715.
- SUNDLER, F. (1997). The effects of axotomy and preganglionic denervation on the expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP), galanin and PACAP type 1 receptors in the rat superior cervical ganglion. *Brain Res Bull*, 775,166-182.
- SWANSON, L. W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Research Bulletin*, 9(1), 321–353.
- SWAPNA, I., Bondy, B. y Morikawa, H. (2016). Differential Dopamine Regulation of Ca<sup>2+</sup> Signaling and Its Timing Dependence in the Nucleus Accumbens. *Cell Reports*, 15, 563–573.
- TEPPER, J. M. y Bolam, J. P. (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology*, 14, 685-692.
- TOATES, F. M. (1994). Comparing motivational systems an incentive motivation perspective. In C. R. Legg y D. A. Booth (Eds.), *Appetite: Neural and Behavioral Bases*, 305-327. New York: Oxford University Press.
- TOLU, S, Eddine, R, Marti, F, David, V, Graupner, M, Pons, S. (2013). Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Molecular Psychiatry*, 18 (3), 382–393.

- TSAI, H. C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G. D., Bonci, A, de Lecea, L. y Deisseroth, K. (2009). Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science*, 324(5930), 1080-1084.
- VAUDRY, D., Gonzales, B. J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A. y Vaudry, H. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors from structure to functions. *Pharmacological Reviews*, 52, 269–324.
- VAUDRY, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Badillr, M., Burel, D., Wurtz, A., Fournier, A., Chow, B., Hashimoto, H., Galas. L. y Vaudry, H. (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological Reviews*, 61(3):283-357.
- VAUDRY, D, Nakamachi, T., Basille, M., Wurtz, O., Fournier, A., Vaudry, H. y Shoida, S. (2013). *Handbook of Biologically Active Peptides* (2nd, ed.). Academic Press.
- VERGARA, R., Rick, C., Hernandez-Lopez, S., Laville, J. A., Guzman, J. N., Galarraga, E., Surmeier, D. J. y Bargas, J. (2003). Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *The Journal of Physiology*, 553, 169-182.
- VOLKOW, N., Wise, R. y Baler, R. (2017). The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *Nature Reviews*, 18(12), 741-52.
- WILLETT, J. A., Will, T., Hauser, C. A., Dorris, D. M., Cao, J., y Meitzen, J. (2016). No Evidence for Sex Differences in the Electrophysiological Properties and Excitatory Synaptic Input onto Nucleus Accumbens Shell Medium Spiny Neurons. *eNeuro*, 3(1), 1-12.

- WILLETT, J. A., Johnson, A. G., Vogel, A. R., Patisaul, H. B., McGraw, L. A., y Meitzen, J. (2018). Nucleus accumbens core medium spiny neuron electrophysiological properties and partner preference behavior in the adult male prairie vole, *Microtus ochrogaster*. *Journal of Neurophysiology*, 119(4), 1576-1588.
- WISE, R. A. (1985). The anhedonia Hypothesis: Mark III. *The Behavioral and Brain Sciences*, 8, 178-186.
- WISE, R. A. (2005). Forebrain substrates of reward and motivation. *Journal of Comparative Neurology*, 493(1), 115-121.
- WILSON, C. J. (1993). The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Progress in brain research*, 99, 277–297
- WRAY, V., Kakoschke, C. Nokihara, K. y Naruse, S. (1993). Solution structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 32, 5832–5841.
- KELLEY, A. E., Bakshi, V. P., Haber, S. N., Steininger, T. L., Will, M. J., Zhang, M. (2002). Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiology Behavior*, 76, 365–77.
- KENNY, P. J. (2011). Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(11), 638-651.
- ZAHM, D. (2000). An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 24(1), 85–105.
- ZÁBORSZKY, L. y Cullian, W. E. (1992). Projections from the nucleus accumbens to cholinergic neurons of the ventral pallidum: a correlated light and electron

microscopic double-immunolabeling study in rat. *Brain Research*, 570, 92-101.

ZHOU, Y., Wu, H., Li, S., Chen, Q., Cheng, X. W., Zheng, J., Takemori, H. y Xiong, Z. Q. (2006). Requirement of TORC1 for late-phase long-term potentiation in the hippocampus. *Public Library of Science*, 1, (e16).