



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE LOS CIRCUITOS NEURONALES INVOLUCRADOS Y DEL ROL
MODULADOR DE GHRELINA EN LOS ASPECTOS HEDÓNICOS DEL APETITO**

Bioq. Lesly Spring Valdivia Torres

Director: Dr. Mario Perelló

Codirectora: Dra. Jesica Raingo

2015

*Especialmente dedicada a mi familia y a
José por su paciencia y por acompañarme todos estos años*

Abreviaturas	4
Introducción	5
1. Control del apetito.....	7
2. Ghrelina como modulador clave del control del apetito.....	20
3. Desórdenes en el control del apetito y el rol de ghrelina en éstos.....	24
4. Modelos experimentales de atracón.....	29
Objetivos	32
Materiales y métodos	35
1. Animales.....	36
2. Dietas utilizadas.....	37
3. Reactivos.....	37
4. Procedimientos experimentales.....	39
5. Cirugías estereotáxicas.....	46
6. Análisis neuroanatómico.....	46
7. Análisis estadístico.....	54
Resultados	56
1. Estudio de los circuitos neuronales involucrados y del rol de ghrelina en el control de un único evento de ingesta de DRG.....	57
2. Estudio de los circuitos neuronales involucrados y del rol de ghrelina en el control de múltiples eventos de ingesta de DRG.....	83
3. Estudio de la participación de las neuronas CRF de la amígdala en los circuitos neuronales que se activan por uno o múltiples eventos de ingesta de DRG	100
Discusión	105
Conclusiones	130
Bibliografía	133
Trabajos Publicados	156

ACe	Amígdala Central
AgRP	Péptido relacionado con Agouti
AP	Área Postrema
AVT	Área Ventral Tegmental
CART	Transcripto regulado por cocaína y anfetamina
CCK	Colecistoquinina
CmPF	Corteza media pre frontal
CRF	Factor liberador de corticotropina
DC	Dieta Común
DRG	Dieta Rica en Grasa
GHSR	Receptor de ghrelina
HLat	Hipotálamo Lateral
ICV	Intracerebroventricular
IF	Núcleo Interfascicular
IHQ	Inmunohistoquímica
Ip	Intraperitoneal
LDTg	Núcleo tegmental latero dorsal
MCH	Hormona concentradora de melanina
NAc	Núcleo Accumbens
NArc	Núcleo Arcuato
NDM	Núcleo Dorsomedial
NPV	Núcleo Paraventricular
NPY	Neuropéptido Y
NTS	Núcleo del Tracto Solitario
PBP	Núcleo Parabraquial Pigmentado
PN	Núcleo Paranigral
TH	Tirosina Hidroxilasa
WT	<i>Wild Type</i>

Introducción

La ingesta de alimento es una función vital para el reino animal ya que proporciona las necesidades nutricionales y energéticas. Existen, al menos, dos circuitos neuronales complementarios que la regulan: un circuito relacionado a los aspectos homeostáticos, dependiente de las reservas energéticas; y otro que regula aspectos hedónicos, relacionado con la recompensa que generan alimentos específicos. Ambos circuitos se encuentran íntimamente integrados.

La ingesta de alimento, además, está fuertemente regulada por señales periféricas, como metabolitos y hormonas, que contribuyen a la regulación precisa de los circuitos neuronales que controlan el apetito. Dichas señales afectan principalmente los aspectos homeostáticos de la alimentación. Sin embargo, evidencias recientes indican que varias de estas señales actúan también sobre los circuitos neuronales que modulan los aspectos hedónicos de la ingesta de alimento. Entre las hormonas que regulan el apetito se destaca la ghrelina, la cual se produce en el tracto digestivo y es la única hormona peptídica conocida capaz de estimular la ingesta de alimento, lo cual ocurriría mediante su acción sobre ambos tipos de mecanismos de regulación.

El control de la ingesta de alimento puede sufrir alteraciones que derivan en diversas situaciones patológicas. Una de ellas es el llamado atracón alimentario (*binge eating*), el cual se observa con alta frecuencia y se define como un evento de hiperfagia en el que se consume una gran cantidad de alimento, en un período corto de tiempo y con la sensación de una pérdida de control de lo que se está consumiendo. En general, se considera que los atracones no son desencadenados por necesidades energéticas, aunque este punto se encuentra en discusión. Episodios de atracón alimentario se pueden observar en una gran variedad de situaciones patológicas como la bulimia, los desórdenes asociados al atracón alimentario (*binge eating disorders*) y algunas variantes de anorexia nerviosa, así como también pueden ocurrir en personas con sobrepeso u obesidad, e incluso en la población general ante circunstancias

específicas como el estrés o la depresión. La etiología de los episodios de atracón es actualmente desconocida y, lamentablemente, no existe ningún tratamiento farmacológico para mitigarlos. Debido a esto, hay un enorme interés en determinar los mecanismos moleculares y los circuitos neuronales implicados en este tipo de trastorno alimentario.

Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral fue estudiar en modelos murinos los circuitos neuronales activados por uno o varios eventos de ingesta de dieta rica en grasa y evaluar el potencial rol modulador de ghrelina sobre ellos.

1. CONTROL DEL APETITO

La acción de consumir alimentos es uno de los más primitivos instintos animales que llevan a la supervivencia. El control de la ingesta de alimento, ocurre a través de circuitos neuronales localizados en el sistema nervioso central que se han ido modificando con el pasar del tiempo y han proporcionado la capacidad de adaptarse y responder a distintos factores ambientales, como por ejemplo la escasez de nutrientes (Williams and Elmquist, 2012, Williams, 2014).

Los circuitos neuronales que regulan aspectos homeostáticos de la ingesta de alimento lo realizan de acuerdo al estado de las reservas energéticas del organismo y están principalmente localizados en el hipotálamo y el tallo cerebral (Morton et al., 2006). En el hipotálamo, el núcleo arcuato (NArc) es reconocido como el lugar que controla el balance energético mediante la regulación de la ingesta y del gasto de energía (Coppari et al., 2005, Wynne et al., 2005, Abizaid et al., 2006a). Para mantener la homeostasis, las neuronas del NArc deben integrar información de otras regiones del cerebro junto a señales hormonales y metabólicas de la periferia. Estas señales incluyen a la hormona ghrelina, así como también la leptina, la insulina, el péptido YY, la

colecistoquinina (CCK), y otras derivadas del sistema gastrointestinal (Williams and Elmquist, 2012).

Por otro lado, la ingesta de alimento está fuertemente afectada por procesos emocionales, motivacionales y de toma de decisiones incluso, cuando no existe balance energético negativo (Berthoud, 2002, Saper et al., 2002, Lutter and Nestler, 2009). Estos circuitos incluyen principalmente los núcleos pertenecientes a la vía mesolímbica (Fulton, 2010, Fernandes et al., 2013). Al igual que los circuitos homeostáticos, los circuitos asociados con la recompensa también pueden ser regulados por señales periféricas y, en general, su activación aumenta la ingesta y la preferencia por alimentos con elevado contenido calórico, como las grasas y los azúcares (Bodnar and Klein, 2005, Zheng and Berthoud, 2008, Liu and Borgland, 2015).

En este punto es importante mencionar, que en general, los mecanismos de recompensa (*reward*), permiten que un individuo desarrolle determinadas conductas en respuesta a un estímulo que le resulta placentero. Se puede asumir, que son una composición de múltiples procesos complejos, con componentes psicológicos que se corresponden con diferentes mecanismos neurobiológicos (Dickinson and Balleine, 2002, Berridge and Robinson, 2003, Kelley et al., 2005, Schultz, 2006, Berridge, 2009). Así, los mecanismos de recompensa incluirían diferentes aspectos (Berridge et al., 2009):

-*Liking*: se refiere exclusivamente al impacto de placer o impacto hedónico de una recompensa.

-*Wanting*: se refiere a la motivación por la recompensa, y los deseos conscientes de conseguir metas.

-*Learning*: se refiere a las asociaciones, representaciones y predicciones sobre futuras recompensas, basándose en experiencias pasadas.

Dentro de cada aspecto hay subdivisiones y niveles incluyendo procesamientos conscientes e inconscientes y además, se ha demostrado, que estos diferentes aspectos están mediados por circuitos neuronales parcialmente disociables (Berridge, 2007).

Actualmente, los circuitos neuronales que procesan los aspectos hedónicos de la ingesta de alimento están constantemente influenciados por señales provenientes de un entorno altamente obesogénico, que en última instancia, llevan a un incremento de la ingesta de alimentos. Ésto, combinado con una disminución del gasto energético asociado a un estilo de vida sedentaria, da como resultado un sobrante energético que, principalmente en individuos genéticamente predispuestos, resulta en un aumento de peso corporal (Berthoud, 2004a, b, 2012)

1.2 Circuitos neuronales que regulan aspectos homeostáticos del apetito

Los circuitos que regulan aspectos homeostáticos del apetito proveen un marco sobre el cual las señales de disponibilidad energética modulan la ingesta de alimentos (Schwartz et al., 2000, Williams and Elmquist, 2012). Por lo tanto, ésta ocurre en condiciones de balance energético negativo. Dos regiones importantes en el control de la homeostasis energética, son el hipotálamo y el tallo cerebral (Williams and Elmquist, 2012). El hipotálamo contiene varios núcleos implicados en la regulación de la ingesta de alimentos incluyendo el NArc, el núcleo paraventricular (NPV), el hipotálamo lateral (HLat), el núcleo ventromedial (NVM) y el núcleo dorsomedial (NDM) (Saper et al., 2002, Williams and Elmquist, 2012, Schwartz and Zeltser, 2013).

El NArc es considerado prioritario en relación con la recepción y relevamiento de señales relacionadas con la presencia de nutrientes provenientes de la circulación y, en general, se considera que controla la ingesta calórica total para mantener el balance energético constante (Cone et al., 2001, Coppari et al., 2005). Se ubica adyacente a la eminencia media, un órgano

circunventricular que permite el acceso rápido de señales circulantes al hipotálamo, de manera que puede integrar información de otras regiones del cerebro respondiendo también a hormonas, como la ghrelina, y a otras señales derivadas del sistema gastrointestinal (Saper et al., 2002). En el NARc existen dos poblaciones celulares consideradas las neuronas de primer orden que coordinan el control del balance energético. Una de ellas inhibe la ingesta de alimento y expresa el precursor anorexigénico pro-opiomelanocortina (POMC) y el neuropéptido transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) (Douglass et al., 1995, Kristensen et al., 1998, Cowley et al., 2001). Diversas hormonas, neuropéptidos y nutrientes, incluyendo la leptina y la insulina, regulan la expresión de POMC. En condiciones de ayuno, ésta se encuentra reducida, mientras que ante el aumento de las reservas energéticas su expresión aumenta (Schwartz et al., 1997, Porte et al., 2002, Cottrell and Mercer, 2012). El rol crítico de POMC en la regulación del metabolismo se evidencia en estudios que muestran que las personas con mutaciones en el gen de POMC desarrollan obesidad temprana (Krude et al., 1998, Krude and Gruters, 2000). La otra población neuronal del NARc, estimula la ingesta de alimento vía el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada a *Agouti* (AgRP) (Ollmann et al., 1997, Hahn et al., 1998, Baskin et al., 1999, Niswender and Schwartz, 2003). El NPY es el neuropéptido con mayor poder orexigénico conocido, que se expresa no sólo en el NARc, sino también, en otros núcleos del cerebro (Adrian et al., 1983). Los niveles de NPY en el NARc reflejan el estado nutricional del cuerpo; en forma consistente se observa por ejemplo, que ellos aumentan en el ayuno y disminuyen luego de la realimentación (Sanacora et al., 1990, Kalra et al., 1991). Por su parte, AgRP se expresa exclusivamente en el NARc (Shutter et al., 1997), y su expresión también se incrementa durante el ayuno (Swart et al., 2002) y disminuye luego de la realimentación (Ollmann et al., 1997).

Las neuronas de los núcleos hipotalámicos NPV, NDM e HLat reciben inervaciones de las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART del NArc actuando, al menos en parte, como neuronas de segundo orden de los circuitos que regulan aspectos homeostáticos de la ingesta de alimentos (Elias et al., 1998, Elmquist et al., 1998, Elias et al., 1999). El NPV también integra señales de otros sitios, incluyendo el núcleo del tracto solitario (NTS) del tallo cerebral (Sawchenko and Swanson, 1983a, b), el cual es también sensible a algunas hormonas periféricas como la CCK (Hamamura et al., 1991) y la leptina (Perello et al., 2006), entre otras. El HLat contiene un set de neuronas que expresan la hormona concentradora de melanina (MCH) (Marsh et al., 2002) y otras que expresan orexina (Sakurai et al., 1998, Wolf, 1998). El ayuno aumenta la expresión de MCH y de orexina, las cuales, a su vez, aumentan la ingesta de alimentos (Qu et al., 1996, Sakurai et al., 1998, Hagan et al., 1999). Las neuronas de orexina inervan diversas áreas del cerebro como por ejemplo el NPV, el NArc, el NTS y el área ventral tegmental (AVT), mediando cambios en la funcionalidad de estos núcleos (de Lecea et al., 1998, Peyron et al., 1998).

El NTS, en forma similar al NArc, está ubicado adyacente a un órgano circunventricular, en este caso al área postrema (AP), siendo esta una posición ideal para detectar señales circulantes (Saper et al., 2002). Además, se encuentra conectado recíprocamente con el hipotálamo (Ter Horst et al., 1989, Wang et al., 2015). De esta forma, el NTS regula principalmente el número y la duración de los eventos de ingesta, para lo cual integra información hipotalámica, información sensitiva del tracto gastrointestinal a través del nervio vago y otras rutas, así como también de hormonas y metabolitos (Kalia and Sullivan, 1982, Sawchenko, 1983). (Figura 1)

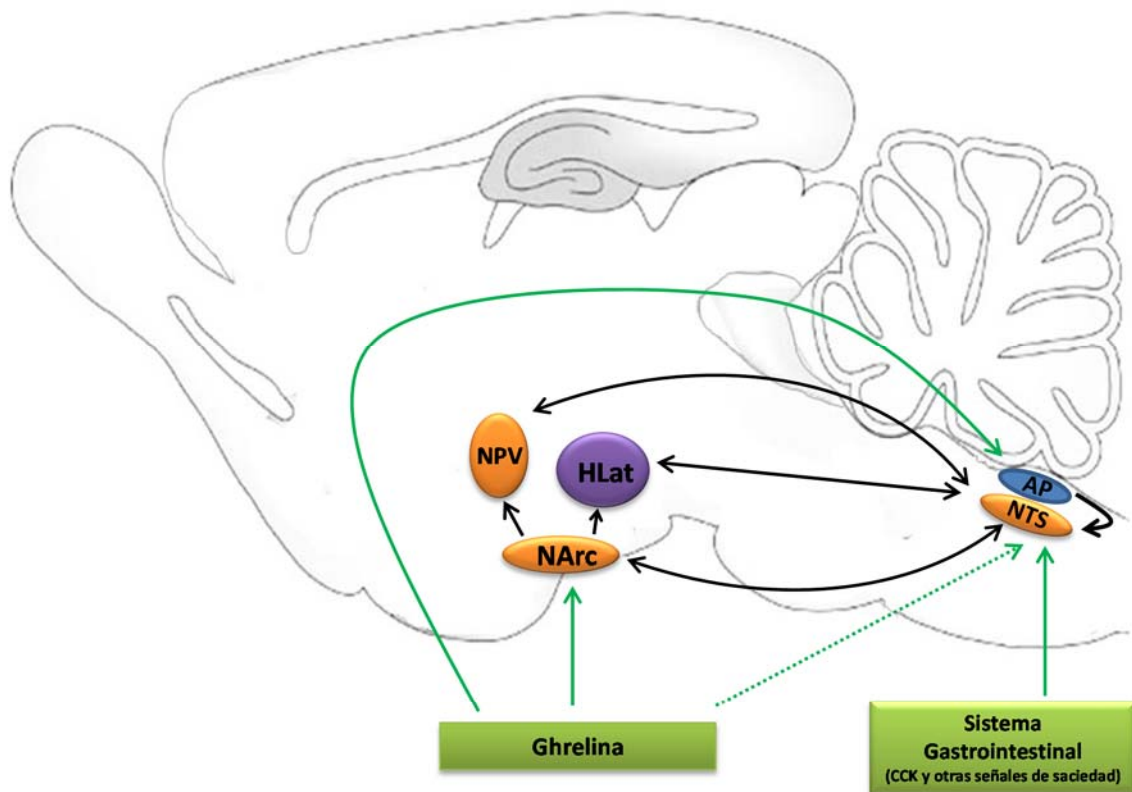


Figura 1. Circuitos homeostáticos que regulan la ingesta de alimento. En la imagen se muestran los principales núcleos cerebrales (en color naranja) y señales periféricas que participan en la regulación homeostática de la alimentación. El HLat se muestra en color violeta por ser un nexo entre los circuitos homeostáticos y hedónicos. El AP se muestra en color azul por ser un órgano circunventricular. Las flechas negras indican conexiones neuronales y la flechas verdes indican los sitios de acción de las señales periféricas.

1.2 Circuitos neuronales que regulan aspectos hedónicos del apetito

Existe actualmente gran cantidad de evidencia, tanto en roedores como en humanos, que avala la teoría de que tanto el consumo de drogas de abuso como de alimentos altamente apetecibles, está mediado por los circuitos neuronales que incluyen a la vía mesolímbica (Nestler, 2001, 2005a, b). El AVT es el punto clave de esta vía y es particularmente complejo, no sólo en su neuroanatomía, sino también en su funcionalidad (Ikemoto, 2007). Sus eferencias se dirigen principalmente al núcleo accumbens (NAc), aunque también a otras áreas del cerebro como la amígdala, la corteza media pre-frontal (CmPF) y el hipocampo (Saper et al., 2002, Hyman et al., 2006, Berthoud, 2011, DiLeone et al., 2012). El AVT, por su parte, recibe proyecciones de

varios núcleos, como el núcleo tegmental latero dorsal (LDTg) y el HLat, además de las áreas antes mencionadas que son inervadas por éste (Fadel and Deutch, 2002, Geisler and Zahm, 2005, Dickson et al., 2010). El neurotransmisor sintetizado predominantemente en el AVT es la dopamina, el cual se produce a partir del aminoácido L-tirosina. El paso limitante de su síntesis es catalizado por la enzima tirosina hidroxilasa (TH), por lo que es utilizada como un marcador bioquímico para la identificación de las neuronas dopaminérgicas (Vucetic and Reyes, 2010). La dopamina interactúa con receptores de membrana pertenecientes a la familia de los receptores acoplados a proteína G, cuya activación lleva a la formación de segundos mensajeros y finalmente a la activación o represión de rutas de señalización específicas (Baik, 2013). Se conocen 5 subtipos de receptores dopaminérgicos los que, basados en sus propiedades estructurales y farmacológicas, se subdividen en 2 grupos: los de tipo D1, que estimulan los niveles intracelulares de AMP cíclico y comprenden los receptores D1 y D5 (Dearry et al., 1990, Zhou et al., 1990, Grandy et al., 1991, Sunahara et al., 1991) y los de tipo D2 que inhiben los niveles intracelulares de AMP cíclico y comprenden los receptores D2, D3 y D4 (Bunzow et al., 1988, Dal Toso et al., 1989, Sokoloff et al., 1990, Van Tol et al., 1991). Los receptores D1 y D2 son los que se expresan más abundantemente en el cerebro (Baik, 2013). Los receptores D1 se encuentran exclusivamente en forma post-sináptica en las neuronas inervadas por las neuronas dopaminérgicas, como las neuronas GABAérgicas del NAc. Los receptores D2 (y también los D3) se expresan no sólo a nivel post-sináptico en células blanco de las neuronas dopaminérgicas sino también a nivel pre-sináptico en neuronas dopaminérgicas (Sokoloff et al., 2006, Rondou et al., 2010, Beaulieu and Gainetdinov, 2011). En función de la distribución neuroanatómica de las neuronas dopaminérgicas, el AVT puede dividirse en al menos 3 subregiones: el núcleo paranigral (PN), el núcleo parabraquial pigmentado (PBP) y el núcleo interfascicular (IF), el cual es considerado por algunos autores como un núcleo independiente (Swanson, 1982, Ikemoto,

2007, Ferreira et al., 2008). El AVT también posee neuronas GABAérgicas (Wolf et al., 1978, Stinus et al., 1982, Steffensen et al., 1998, Olson and Nestler, 2007) que en base a estudios electrofisiológicos y farmacológicos, se ha propuesto que, vía conexiones locales, inhiben tónicamente a las neuronas dopaminérgicas siendo la liberación de dopamina parcialmente controlada por estos mecanismos (Johnson and North, 1992, Steffensen et al., 2006).

El NAc es el principal blanco de las neuronas dopaminérgicas del AVT y juega un rol clave en muchas de sus funciones (Ikemoto and Panksepp, 1999). Forma parte del estriado y contiene predominantemente poblaciones neuronales GABAérgicas denominadas neuronas *medium spiny* (Kelley, 2004). Se divide en dos subregiones principales: el centro (*core*, tejido que rodea la comisura anterior) y el caparazón (*shell*, región que rodea medial, ventral y lateralmente el centro del núcleo) el cual a su vez puede subdividirse en caparazón lateral y caparazón medial (Kelley, 2004, Ikemoto, 2007). El centro y el caparazón presentan diferencias tanto en sus proyecciones aferentes y eferentes como en su especialización funcional (Zahm et al., 1999, Kelley, 2004). Las diferencias funcionales se deben, en parte, a la conectividad celular entre el AVT y el NAc. La parte medial del caparazón recibe inervación de la zona postero-medial del AVT y está más relacionada con los mecanismos de recompensa mientras que el caparazón lateral y el centro del NAc reciben inervaciones dopaminérgicas de la zona lateral del AVT y estarían más asociados a la realización de funciones motoras (Ikemoto, 2007). Debido a esto, el NAc es considerado una interfase en el procesamiento de las emociones, la motivación y las acciones motoras relacionadas con éstas (Mogenson et al., 1980, Kelley, 2004). El NAc se encuentra estratégicamente ubicado ya que recibe información directa relacionada al gusto y funciones viscerales desde el NTS (al caparazón medial) e indirecta, desde la corteza gustatoria vía proyecciones desde el núcleo parabraquial al tálamo gustatorio, que llegan al caparazón lateral y al centro (Ricardo and Koh, 1978, Saper, 1982). Las vías de señalización homeostática

que eventualmente llegan al NAc incluyen proyecciones desde el HLat al caparazón medial. Mientras que con respecto a las rutas eefectoras de comportamiento, la mayoría de las proyecciones desde el NAc se dirigen a circuitos de control motor de los ganglios basales, y al *ventral pallidum* (Kelley, 2004)

En cuanto al funcionamiento de la vía mesolímbica, se sabe que las neuronas dopaminérgicas del AVT liberan dopamina de forma tónica, la cual es más bien lenta e irregular, pero la liberación de dopamina ante algún estímulo ambiental motivacionalmente relevante, se vuelve rápida y en forma de trenes de disparos, llevando a un aumento fásico en la liberación del neurotransmisor (Overton and Clark, 1997). Este aumento transitorio de la concentración de dopamina altera las conductancias dependientes del potencial de membrana y genera cambios en la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria en los núcleos a los que las neuronas dopaminérgicas envían sus proyecciones (Nicola et al., 2000). Los alimentos o las señales que permiten predecirlos promueven justamente la liberación fásica de dopamina en el NAc, lo que lleva finalmente a la realización de comportamientos dirigidos a la adquisición de éstos (Schultz, 2006, Palmiter, 2007, Salamone and Correa, 2013).

Además de la vía mesolímbica, otros sistemas son importantes moduladores de los aspectos hedónicos de la ingesta entre los que se encuentran el sistema orexigénico del HLat, el sistema de opioides endógenos y el sistema del factor liberador de corticotropina (CRF). Estos sistemas juegan un rol esencial en el control de la ingesta de alimento tanto homeostática como hedónica, aunque los circuitos neuronales de los cuales participan son complejos y sólo parcialmente conocidos (Sakurai, 1999, Richard et al., 2002, Nogueiras et al., 2012).

El sistema de las orexinas, también llamadas hipocretinas, consiste en dos péptidos excitatorios, llamados orexina A (o hipocretina 1) y orexina B (o hipocretina 2), que son producidos por el clivaje de un mismo precursor denominado pro-orexina (Sakurai et al., 1999).

Las orexinas se unen a receptores acoplados a proteína G denominados Ox1 y Ox2. El Ox1 une con mayor afinidad orexina A, mientras que el Ox2 une ambas orexinas con similar afinidad (Sakurai et al., 1998). Las neuronas que producen orexina se encuentran exclusivamente en el HLat, a través del área perifornical y hacia el NDM (de Lecea et al., 1998, Sakurai et al., 1998), e inervan diversas áreas del sistema nervioso central y periférico, incluyendo el nervio vago, la medula espinal, el tallo cerebral, el hipotálamo, el tálamo, el sistema límbico y algunas regiones corticales (Peyron et al., 1998, Heinonen et al., 2008), donde ambos receptores de orexina se encuentran ampliamente distribuidos aunque en forma regionalmente selectiva (Calipari and Espana, 2012, Barson et al., 2013). Las neuronas de orexina se activan en respuesta a la hipoglucemia (Cai et al., 1999, Moriguchi et al., 1999), a la restricción calórica (Sakurai et al., 1998) y a la administración sistémica de leptina (Lopez et al., 2000), sugiriendo que este sistema regula los mecanismos homeostáticos de la alimentación. Notablemente, las neuronas de orexina también se activan en anticipación a la ingesta de alimentos apetecibles (Harris et al., 2005), lo que demuestra la capacidad del sistema orexigénico de responder a señales ambientales relacionadas a aspectos cognitivos de la ingesta de alimento. Además, en relación a la participación del sistema orexigénico en los comportamientos asociados a aspectos hedónicos del consumo de alimentos, se ha demostrado que la administración central de orexina A induce la ingesta preferencial de dieta rica en grasa (Sakurai et al., 1998, Clegg et al., 2002). Por otro lado, los receptores de orexina están presentes tanto en regiones hipotalámicas como mesolímbicas (Trivedi et al., 1998, Hervieu et al., 2001, Marcus et al., 2001). De hecho, se ha demostrado que la aplicación directa de orexina en el AVT induce la liberación de dopamina en el NAc (Narita et al., 2006) y que el bloqueo de la señalización orexigénica dentro del AVT atenúa la ingesta de alimentos inducida por opioides (Zheng et al., 2007). Por lo tanto, estos

datos sugieren que las vías de señalización orexigénica promueven la ingesta de alimentos, también, a través de la modulación de circuitos no homeostáticos del cerebro.

El sistema de opioides endógenos incluye los neuropéptidos: endorfinas, encefalinas, dinorfinas y endomorfina (Nogueiras et al., 2012). Las encefalinas, dinorfinas y endorfinas son producidas por clivaje proteolítico de proteínas precursoras conocidas como pro-encefalina, pro-dinorfina y POMC, respectivamente. Los péptidos opioides actúan a través de tres receptores diferentes: μ , δ y κ (también llamados MOR, DOR y KOR, respectivamente), los cuales son receptores acoplados a proteína G. Si bien existe cierta promiscuidad, las endorfinas actúan principalmente vía MOR, las encefalinas, vía DOR y MOR y las dinorfinas, vía KOR (Nogueiras et al., 2012). Los opioides y sus receptores están ampliamente distribuidos en el cerebro. Las endorfinas se expresan principalmente en el hipotálamo y el tallo cerebral aunque también en otras áreas cerebrales (Verhoef et al., 1982, Nogueiras et al., 2012). Las encefalinas están ampliamente distribuidas en el cerebro (Simantov et al., 1977, McGinty et al., 1984). Por su parte las dinorfinas se encuentran en la médula espinal, corteza y en otras zonas del cerebro como el hipotálamo (McGinty et al., 1984, Nogueiras et al., 2012). Los receptores de opioides se expresan principalmente en la corteza cerebral, el sistema límbico y el tallo cerebral. Los KOR y MOR coexisten en varios núcleos cerebrales, mientras que la distribución de DOR es más restringida (baja expresión en el hipotálamo, tálamo, mesencéfalo y tallo cerebral) (Akil et al., 1998, Le Merrer et al., 2009). El MOR se expresa mayormente en la amígdala (excepto en la amígdala central, ACE), el tálamo, el mesencéfalo y algunos núcleos del tallo cerebral. El KOR se expresa en el cerebro anterior, el tubérculo olfatorio, el estriado (incluyendo el NAc) y el hipotálamo. Por último, el DOR es el receptor más abundante en el tracto olfatorio, la corteza y el estriado (Le Merrer et al., 2009). Existe abundante evidencia de que los opioides y sus receptores juegan un rol importante en la regulación de la ingesta de alimentos, y de que el receptor MOR y sus

ligandos están particularmente implicados en los comportamientos asociados a la recompensa (Kelley et al., 2002, Bodnar and Klein, 2005, Gosnell and Levine, 2009, Le Merrer et al., 2009). Por ejemplo, se ha encontrado que los agonistas de opioides, como DAMGO, y los antagonistas, como la naloxona y naltrexona, son más efectivos en el aumento y la disminución de la ingesta de alimentos apetecibles, respectivamente (Will et al., 2003, Woolley et al., 2006, Baldo et al., 2010, Mena et al., 2011, Stice et al., 2013). En modelos animales el agonista MOR, DAMGO, estimula la ingesta de alimentos cuando es administrado directamente en diversas áreas cerebrales, incluyendo el NTS, el núcleo parabraquial, varios núcleos hipotalámicos, la ACE, el NAc y el AVT (Bodnar and Klein, 2005, Gosnell and Levine, 2009, Le Merrer et al., 2009) . Por otro lado, se ha asociado a los opioides no sólo a inducir la ingesta de alimento en sí, sino a la adjudicación del valor hedónico de los alimentos (Bodnar, 2015). Por la tanto, el sistema de opioides endógenos regulan principalmente la ingesta de alimentos apetecibles actuando tanto sobre procesos de *liking* y *wanting*, activando respuestas comportamentales asociadas a la búsqueda y obtención de éstos

El sistema CRF está formado por el péptido CRF (factor liberador de corticotropina) y las urocortinas I, II y III (UcnI, UcnII y UcnIII, respectivamente) (Bale and Vale, 2004), los cuales se unen a dos receptores, CRF-R1 y CRF-R2, también pertenecientes a los receptores acoplados a proteína G y que activan adenilato ciclasa (Perrin and Vale, 1999). El CRF-R1 se expresa con gran densidad en el cerebro anterior, estructuras límbicas subcorticales como la región septal de la amígdala y el AVT mientras que en el hipotálamo la expresión de CRF-R1 es baja en condiciones basales pero aumenta en situaciones de estrés. La distribución de CRF-R2 en el cerebro anterior se limita a estructuras subfornicales, como el septum lateral, amígdala e hipotálamo (Perrin and Vale, 1999). En el rombencéfalo, el CRF-R2 se expresa en el núcleo dorsal del Raphe, el AP, el NTS y el plexo coroideo (Stengel and Tache, 2010). El CRF se expresa mayormente en el NPV,

ACe, áreas corticales y septum (Bale and Vale, 2004). La ACe es uno de los lugares con mayor presencia de neuronas productoras de CRF, fuera del hipotálamo (Gallagher et al., 2008), es parte de un complejo circuito que regula respuestas autonómicas y de comportamiento, incluyendo el procesamiento de emociones como el aprendizaje del valor hedónico de estímulos tales como las drogas de abuso (Gray, 1999, Baxter and Murray, 2002). Una característica del sistema CRF es que su actividad está regulada por la proteína de unión a CRF (CRFBP), la cual se une con alta afinidad a CRF y a UcnI reduciendo su biodisponibilidad y previniendo su unión a los receptores (Bale and Vale, 2004). En el sistema nervioso central, la expresión de CRFBP parcialmente colocaliza con la de CRF, CRF-R1 y CRF-R2, permitiendo de esta forma la modulación de la actividad de este sistema (Binder and Nemeroff, 2010). Entre otras funciones que cumple el sistema CRF además de la regulación del eje hipotálamo hipofiso adrenal, existe evidencia de que tiene influencias en la regulación del balance energético durante situaciones de estrés (Stengel and Tache, 2014), en la mediación de la ingesta compulsiva de alimentos apetecibles, durante eventos repetidos de acceso a éstos (Cottone et al., 2009, Iemolo et al., 2013) así como en el desarrollo de obesidad (Rothwell, 1990, Sharma and Banerji, 2012). (Figura 2)

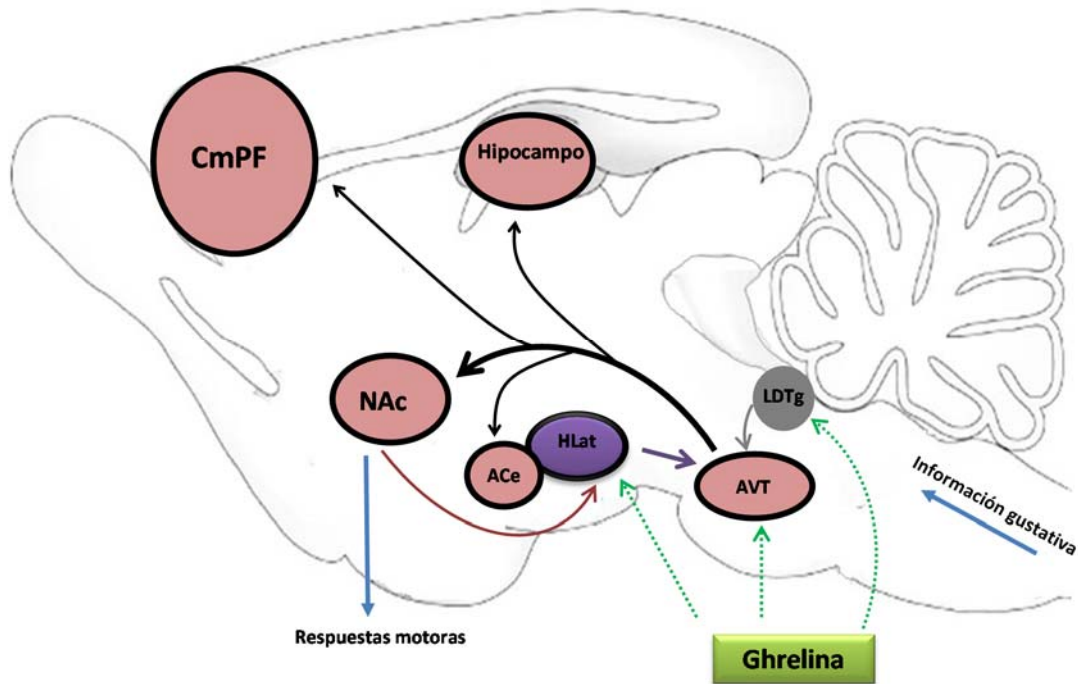


Figura 2. Circuitos hedónicos que regulan la ingesta de alimento. En la imagen los núcleos en rosa representan componentes de la vía mesolímbica, los cuales reciben inervaciones dopaminérgicas desde el AVT siendo la principal, la que llega al NAc (flechas negras). Por otro lado, el AVT recibe inervaciones que regularían su acción desde el LDTg (aferencias colinérgicas, flecha gris), y el HLat (aferencias orexigénicas, flecha violeta). A su vez, éste recibe inervaciones de neuronas gabaérgicas desde el NAc (flecha rosa). La regulación hedónica de la ingesta de alimento por parte de la hormona ghrelina se encuentra aún en estudio aunque podría ser principalmente debida a su acción sobre el AVT, aunque también sobre el HLat o el LDTg (flechas verdes punteadas). Un sistema importante en la regulación hedónica de la ingesta es el sistema de opioides endógenos, cuya acción se ha demostrado en la mayoría de los núcleos presentes en la figura, éstos se indican mediante el contorno en color negro.

2. GHRELINA COMO UN MODULADOR CLAVE DEL CONTROL DEL APETITO

2.1 Sistema de ghrelina/GHSR1a

La ghrelina es una hormona peptídica de 28 aminoácidos sintetizada principalmente por células endócrinas del estómago (Kojima et al., 1999, Wang et al., 2002). Es el único péptido natural conocido que tiene uno de sus residuos aminoácidos (Serina-3) modificado post-traduccionalmente por un n-octanoílo, el cual es esencial para su actividad biológica (Kojima et al., 1999). Esta modificación post-traduccional es realizada por la enzima ghrelina O-aciltransferasa (GOAT) (Gutierrez et al., 2008, Yang et al., 2008, Mason et al., 2014).

La ghrelina es secretada de forma pulsátil y esta secreción se correlaciona con los episodios de ingesta de alimento y los ciclos de sueño (Tolle et al., 2002). Específicamente, se ha mostrado que la secreción de ghrelina en los seres humanos sigue un ritmo circadiano con un aumento antes de las comidas y un posterior descenso postprandial. Teniendo en cuenta este perfil secretorio se ha sugerido que el aumento de ghrelina es capaz de iniciar la ingesta de alimentos (Cummings et al., 2001).

La ghrelina actúa vía su receptor específico GHSR, inicialmente identificado por ser blanco de secretagogos de la hormona de crecimiento (Kojima et al., 1999). A partir del gen que codifica para el receptor, se genera el transcripto funcional GHSR1a que contiene dos exones; aunque también se puede generar otro subtipo de receptor, GHSR1b, el cual carece del exón 2 y contiene solo el 1 y unos pocos aminoácidos más que provienen de la secuencia del intrón antes del codón de terminación que se encuentra en el mismo (Howard et al., 1996). El GSHR1a, se acopla principalmente a proteína $G\alpha_{q/11}$, la que a su vez activa a la fosfolipasa C dando lugar a un aumento de inositol fosfato, activación de la proteína quinasa C y finalmente liberación de calcio desde compartimentos intracelulares (Frohman et al., 2000). La activación de GHSR1a también causa inhibición de canales de potasio permitiendo la entrada de calcio a través de canales operados por voltaje tipo L y T. Por otro lado, GHSR1a inhibe los canales de calcio tipo N a nivel presináptico. (Chen et al., 1996)

GHSR1a se encuentra expresado principalmente en el sistema nervioso central y su distribución específica ha sido obtenida por ensayos de hibridación *in situ*. Estos estudios muestran una gran cantidad del receptor en varios núcleos hipotalámicos, muchos de los cuales regulan el peso corporal y la ingesta de alimentos. Además, se ha encontrado en otras regiones incluyendo neuronas parasimpáticas preganglionares, los tres componentes del complejo dorsal

del vago (AP, NTS y el núcleo motor dorsal del vago) así como en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y el AVT (Guan et al., 1997, Zigman et al., 2006, Laviano et al., 2012).

Una característica sobresaliente de GHSR1a es que presenta una fuerte actividad constitutiva capaz de activar las vías de señalización independientemente de su unión a ghrelina. Por lo tanto, el aumento de la expresión de GHSR1a aumentaría la activación de las vías de señalización; afectando, consecuentemente, la regulación de la ingesta de alimentos y el peso corporal (Perello, 2014).

2.2 Circuitos neuronales a través de los cuales el sistema ghrelina/GHSR1a regula el apetito

La ghrelina es la única hormona peptídica conocida que estimula el apetito, estando también relacionada con la regulación de la homeostasis de la glucemia, la actividad locomotora, la motilidad gastrointestinal y la estimulación de la secreción de varias hormonas (Kojima et al., 2001, Wang et al., 2002, Briggs and Andrews, 2011).

Inicialmente se demostró que la ghrelina estimula la ingesta de alimentos actuando en los circuitos hipotalámicos (Nakazato et al., 2001), los cuales implican, como se ha mencionado anteriormente, las neuronas NPY/AgRP/GABA del NArc que expresan altos niveles de GHSR1a (Nakazato et al., 2001, Briggs and Andrews, 2011). La administración de ghrelina rápidamente induce la expresión del marcador de activación neuronal c-Fos y aumenta la frecuencia de disparo de potenciales de acción en dichas neuronas (Hewson and Dickson, 2000, Wang et al., 2002, Cowley et al., 2003); además aumenta la expresión de los mRNA de NPY y AgRP (Kamegai et al., 2000, Nakazato et al., 2001). Por otro lado, hay evidencias de que la ghrelina no estimula la ingesta de alimentos en ratones que carecen de NPY y AgRP (Chen et al., 2004), confirmando que estos péptidos median las acciones orexigénicas de la ghrelina. El efecto orexigénico de la ghrelina, se complementa con la acción inhibitoria sobre las neuronas POMC vía aferencias GABAérgicas desde neuronas NPY/AgRP (Cowley et al., 2003).

Como se mencionó anteriormente, GHSR1a está presente tanto en centros reguladores de la ingesta de alimento homeostáticos como hedónicos (Guan et al., 1997, Zigman et al., 2006, Skibicka and Dickson, 2011, Perello and Zigman, 2012). La presencia de GHSR1a en las neuronas dopaminérgicas del AVT, indica que la ghrelina también regula aspectos hedónicos de la ingesta de alimentos (Abizaid et al., 2006b, Zigman et al., 2006). En ratas, se ha observado que la infusión de ghrelina directamente en el AVT aumenta la ingesta de alimentos *standard* (Naleid et al., 2005) y en el caso de alimentos apetecibles, aumenta tanto la ingesta como la motivación para obtenerlos (Egecioglu et al., 2010). Además, se ha demostrado que la ghrelina se une a su receptor en neuronas dopaminérgicas y GABAérgicas del AVT, e incrementa de forma aguda la frecuencia de potenciales de acción, promueve la reorganización de aferencias sinápticas sobre las neuronas dopaminérgicas e incrementa el recambio de dopamina en el NAc (Abizaid et al., 2006b). Otra forma mediante la cual la ghrelina regularía la vía mesolímbica, podría ser indirectamente vía neuronas colinérgicas del LDTg (que presentan GHSR1a) (Dickson et al., 2010) ya que se ha observado que inyecciones intra-LDTg de ghrelina en ratones aumenta la liberación de dopamina en el NAc (Jerlhag et al., 2007) siendo ésta atenuada por el bloqueo de receptores de acetilcolina en el AVT (Jerlhag et al., 2008). La ingesta de alimentos inducida por la ghrelina parece depender también de las neuronas productoras de orexina del HLat, en donde se expresa GHSR1a (Olszewski et al., 2003, Toshinai et al., 2003). Se ha demostrado, que la acción de la ghrelina sobre la ingesta hedónica de alimentos requiere que la señalización de orexina esté intacta (Perello et al., 2010). Sin embargo, los circuitos neuronales mediante los cuales la ghrelina recluta a las neuronas productoras de orexina no se conocen.

La ghrelina también actúa sobre el hipocampo, una estructura implicada en la memoria y la toma de decisiones y que también expresa GHSR1a (Zigman et al., 2006), promoviendo la formación de sinapsis dendríticas y la generación de potenciación post-sináptica a largo plazo.

Debido a que el hipocampo está implicado en los comportamientos alimentarios (Born et al., 2010), el efecto de la ghrelina sobre los mismos también podría incluir a su acción sobre este núcleo (Diano et al., 2006).

3. DESÓRDENES EN EL CONTROL DEL APETITO Y EL ROL DE GHRELINA EN ÉSTOS

Los desórdenes en el control del apetito representan un conjunto de condiciones psiquiátricas caracterizadas por alteraciones en el comportamiento alimentario. Estos trastornos además de presentar alteraciones en los patrones alimentarios y la elección de la dieta, presentan percepciones psicológicas aberrantes distintivas hacia la comida, la ingesta, el peso y la imagen corporal (American Psychiatric Association, 2013). Los atracones son comportamientos característicos de los desórdenes alimentarios diagnosticados clínicamente como la bulimia nerviosa, los desórdenes asociados al atracón alimentario y la anorexia nerviosa subtipo purgativa/compulsiva (Bello and Hajnal, 2010, Berger S., 2013). La obesidad, aunque no es considerada como un desorden psiquiátrico, en algunos casos también presenta episodios caracterizados por los atracones (American Psychiatric Association, 2013). Un atracón se define como un episodio de ingesta descontrolado de una cantidad excesiva de alimento, generalmente apetecible, en un corto periodo de tiempo (Wolfe et al., 2009). Se ha reportado que el contenido calórico de un atracón alimentario puede ser mayor incluso a las 10.000 Kcal (Mitchell et al., 1981, Cooper et al., 1993, Wolfe et al., 2009). La magnitud del atracón alimentario depende fuertemente de la elección de la comida que se ingiere, estando ésta representada por alimentos de alto contenido calórico, teniendo como principales macronutrientes carbohidratos, grasas o una combinación de ambos (por ej. Postres y *snacks*) (Hadigan et al., 1989, Kales, 1990, Elmore and de Castro, 1991, Raymond et al., 2007). Los atracones ocurren, en general, de manera intermitente volviéndose problemáticos cuando son

muy frecuentes, es decir varias veces a la semana por meses o inclusive por años, dato que es importante en el momento del diagnóstico de las patologías asociadas a este comportamiento, de las cuales a continuación se dará una breve reseña.

La anorexia nerviosa es un desorden alimentario de etiología desconocida, en el cual los pacientes se caracterizan por presentar un peso corporal extremadamente bajo, miedo intenso a que éste se incremente y distorsión de la percepción de la imagen corporal (American Psychiatric Association, 2013).

La bulimia nerviosa es un desorden psiquiátrico caracterizado por episodios repetitivos de ingesta compulsiva de alimento seguidos por comportamientos compensatorios de forma de prevenir el aumento del peso corporal (American Psychiatric Association, 2013).

En los desórdenes asociados a atracones alimentarios (*binge eating disorders*), los pacientes presentan atracones periódicos pero, en contraste con la bulimia, sin comportamientos compensatorios por lo que generalmente presentan sobrepeso y riesgo de presentar en algún momento obesidad (American Psychiatric Association, 2013).

La obesidad (estrictamente, exceso de grasa corporal), resulta de la constante y elevada ingesta energética con respecto al gasto energético realizado. Existen varios factores que contribuyen al desarrollo de la obesidad, los cuales pueden variar entre los individuos, entre ellos genéticos, fisiológicos, comportamentales y ambientales. Aunque como se mencionó anteriormente, no es considerada una enfermedad psiquiátrica; existen fuertes asociaciones entre la obesidad y varios desórdenes mentales, como por ejemplo los desórdenes asociados al atracón alimentario, la depresión, los trastornos bipolares y la esquizofrenia. Además, el uso de algunos medicamentos psicotrópicos llevan al desarrollo de obesidad como efecto secundario, y es importante remarcar que la obesidad es un factor de riesgo para muchas enfermedades, entre ellas, enfermedades cardiovasculares, accidente cerebro vascular, diabetes tipo 2 y ciertos

tipos de cáncer (American Psychiatric Association, 2013, Ogden et al., 2014). En Estados Unidos, actualmente cerca del 35 % de la población adulta y el 17 % de la población infantil es obesa; siendo más propensos aquellos individuos que presentan atracones frecuentes (Ogden et al., 2014). Argentina no escapa al problema de la obesidad y las enfermedades asociadas. Los datos oficiales que revelan la prevalencia de esta problemática, son más bien recientes y provienen de la Encuesta Nacional de factores de riesgo (ENFR) realizada por el Ministerio de Salud de la Nación, que permitió contar con una línea de base y priorizar acciones de prevención y control. La primera se realizó en el año 2005 y la más reciente en el año 2009. Los datos obtenidos de estas encuestas, indican que existe un ambiente obesogénico, en el que predomina la mala alimentación y un alto nivel de inactividad física, dando como resultado una prevalencia nacional de obesidad del 18 %, cifra que aumentó luego de la primera medición en el año 2005 en el cual se había registrado un nivel de obesidad del 14,6 %. Otro dato alarmante asociado con el sobrepeso, es que éste resulta ser el causante del 58 % de la ocurrencia de diabetes, del 21 % de la enfermedad coronaria y de entre el 8 al 42 % de diversos cánceres. (Fuente: Ministerio de Salud de la Nación) Teniendo todos estos datos en consideración, es evidente que los atracones como síntoma característico del sobrepeso y la obesidad, y las co-morbilidades asociadas a esta última representan una importante problemática de salud a nivel nacional como internacional.

Diversos estudios han reportado la implicancia del sistema dopaminérgico en los trastornos alimentarios (Wang et al., 2001, Bello and Hajnal, 2010, Baik, 2013). Por ejemplo, estudios genéticos en humanos han mostrado que en las patologías con atracones alimentarios, existe un incremento en la frecuencia del polimorfismos asociados al transportador de dopamina y al receptor D2 (Noble, 2003, Shinohara et al., 2004, Davis et al., 2008, Davis et al., 2009, Hersrud and Stoltenberg, 2009) y que en individuos obesos, la disponibilidad de receptor D2 en el estriado se encuentra significativamente disminuida (Wang et al., 2001).

Por otro lado, se ha demostrado que el sistema de opioides endógeno está implicado en los episodios de atracones de forma similar a lo que ocurre con las drogas de abuso (Boggiano et al., 2005, Davis et al., 2009, Corwin et al., 2011). Para individuos obesos se ha encontrado que existe una baja disponibilidad de receptor MOR y que esto podría promover la ingesta excesiva de alimento de forma de compensar la respuesta hedónica disminuida en este sistema (Karlsson et al., 2015). Por otro lado, se ha mostrado que la ingesta intermitente de dieta rica en grasa genera adaptaciones del sistema opioide en la corteza media prefrontal las cuales serían responsables del desarrollo del atracón alimentario (Blasio et al., 2014) y que los atracones con azúcares disminuyen el mRNA de las encefalinas en el NAc (Spangler et al., 2004). Otros estudios postulan que los atracones podrían ser mediados por un proceso de mayor sensibilidad de los receptores de opioides, posiblemente como resultado de la repetida liberación de opioides endógenos debido a la ingesta de alimentos apetecibles (Welch et al., 1996, Kelley et al., 2003, Erlanson-Albertsson, 2005).

El rol de la ghrelina en los desórdenes alimentarios anteriormente mencionados, es aún materia de estudio. En lo que respecta a la obesidad aunque existen pocas asociaciones con la ghrelina o con mutaciones de su receptor (Gueorguiev et al., 2009, Liu et al., 2011), esta hormona parece jugar un papel relevante en el desarrollo y mantenimiento de esta condición patológica (Hillman et al., 2011). Muchos pacientes obesos poseen crónicamente bajos niveles de ghrelina circulante y no se observa en ellos el aumento nocturno de ghrelina plasmática en comparación con personas que no presentan obesidad (Tschop et al., 2001). Varios estudios muestran, que las personas obesas no presentan el descenso postprandial de ghrelina plasmática, lo cual aumenta el tiempo en el que existe sensación de hambre, siendo esta característica importante en la patofisiología de la obesidad (le Roux et al., 2005, Yang et al., 2009). Los niveles de ghrelina aumentan en individuos obesos luego de perder peso por la

realización de dietas, lo que contribuye a una posterior ganancia de peso (Cummings et al., 2002). Por otro lado, la marcada disminución en el peso de individuos que se han sometido a una cirugía de *bypass* gástrico podría deberse a la disminución de los niveles circulantes de ghrelina (Beckman et al., 2010). En los pacientes con anorexia, se ha encontrado que los niveles de ghrelina son mayores que en individuos sanos, aunque todavía no se conoce el porqué de este aumento (Ogiso et al., 2011). Por otro lado, se ha propuesto que la administración de ghrelina o agonistas de GHSR1a, podrían incrementar la ingesta de alimento en los pacientes con anorexia nerviosa (Broglia et al., 2004, Hotta et al., 2009), aunque un estudio mostró que estos pacientes son resistentes a los efectos orexigénicos de ghrelina (Miljic et al., 2006). Así como en la anorexia nerviosa, los pacientes con bulimia también presentan mayores niveles plasmáticos de ghrelina que los individuos controles (Tanaka et al., 2002, Kojima et al., 2005). Por otro lado se han encontrado polimorfismos en el gen de ghrelina asociados con cierta vulnerabilidad a padecer bulimia nerviosa (Cellini et al., 2006, Miyasaka et al., 2006, Ando et al., 2010). Diversos estudios que han investigado el rol potencial de ghrelina en la bulimia son inconsistentes, por lo que aún no está clara la relevancia de las disfunciones en el sistema de ghrelina asociadas a este desorden alimentario. (Cardona Cano et al., 2012). En relación a los desórdenes asociados al atracón, se ha observado que los pacientes tienen menores niveles de ghrelina previos a las comidas, los cuales disminuyen solo levemente luego de éstas contribuyendo a consumir mayor cantidad de alimentos (Geliebter et al., 2005). Sin embargo, otro estudio mostró que los niveles de ghrelina que aparecen durante el ayuno, no se correlacionan con la frecuencia y severidad de los episodios de ingesta compulsiva (Monteleone et al., 2005). Además, se ha asociado la presencia de un polimorfismo, Leu72Met, en el gen de ghrelina con cierta susceptibilidad genética a presentar atracones alimentarios (Monteleone et al., 2007).

4. MODELOS EXPERIMENTALES DE ATRACÓN

Como ya se mencionó anteriormente, el atracón alimentario consiste en un episodio de hiperfagia que ocurre en un período breve de tiempo (Wolfe et al., 2009, American Psychiatric Association, 2013). Este tipo de ingesta puede ocurrir en ausencia de hambre e implica períodos de angustia emocional, sentimientos de pérdida de control, culpa, depresión o vergüenza (American Psychiatric Association, 2013).

Una razón del limitado progreso en el desarrollo de estrategias para el tratamiento de los pacientes que presentan atracones, es que sus causas fisiológicas y neurológicas aún no están claras; así como tampoco de qué forma se mantiene este tipo de comportamiento en el tiempo. Por este motivo, se han desarrollado modelos animales, los cuales deben mostrar no sólo las características objetivas de un episodio de atracón, es decir el consumo de una gran cantidad de alimentos en un corto período de tiempo, sino que también otras características subjetivas, como la sensación de pérdida de control durante la ingesta (Perello et al., 2014). El uso de modelos con roedores ha sido esencial para el entendimiento de la patogénesis de muchas enfermedades; sin embargo, tratar de reproducir todas las características del atracón en un modelo animal es todavía un desafío (Corwin and Buda-Levin, 2004, Perello et al., 2014).

La evaluación de cualquier modelo animal es facilitada por el uso de un esquema de clasificación claro. Se ha propuesto que los modelos animales de desórdenes alimentarios pueden ser clasificados en cuatro tipos: (i) etiológicos, (ii) isomórficos, (iii) mecanísticos y (iv) predictivos (Smith, 1989). Los modelos etiológicos están basados en las causas de estos desórdenes, debido a que en este caso son desconocidas, no se han podido desarrollar este tipo de modelos aún. Los modelos isomórficos, en contraste, tratan de reproducir la sintomatología de las patologías humanas. Todos los modelos disponibles actualmente son isomórficos. Los modelos mecanísticos, están basados en los mecanismos neurobiológicos implicados en el

desarrollo y/o el mantenimiento de los eventos de hiperfagia, aunque todavía no hay una idea concreta sobre los mecanismos que regulan estos comportamientos. Por último, los modelos predictivos son usados para evaluar posibles intervenciones farmacológicas (Corwin and Buda-Levin, 2004)

Los aspectos subjetivos constituyen una condición del atracón que es complicada de reproducir directamente con los modelos animales. Sin embargo, medidas válidas asociadas con la depresión, la ansiedad, el estrés, entre otras, existen, y pueden relacionarse con estos aspectos (Crawley, 1999). Dadas las dificultades asociadas con la reproducción de aspectos subjetivos en animales, algunos autores han propuesto seguir los siguientes criterios objetivos para definir el atracón en los modelos animales isomórficos: (i) El comportamiento debería ocurrir repetidamente en el tiempo y (ii) debe existir hiperfagia en un corto período, el cual se ha establecido en 2 horas (Corwin and Buda-Levin, 2004, Wolfe et al., 2009). Con respecto al segundo punto, es importante remarcar la complejidad que existe en afirmar que un evento de hiperfagia es de hecho un atracón (Perello et al., 2014). Por lo tanto, no es extraño que no haya actualmente un consenso general con respecto a los criterios que un modelo animal debería cumplir, para ser considerado un modelo para el estudio de los aspectos neurobiológicos de éste tipo de comportamiento. A pesar de esto, hasta la fecha, varios modelos animales han servido para ir dilucidando las bases neuroquímicas del atracón. Por ejemplo, se ha mostrado que la ingesta diaria de una solución de sacarosa o de dieta rica en grasa genera liberación repetida de dopamina en el NAc (Rada et al., 2005, Liang et al., 2006, Avena et al., 2008). Los atracones con azúcares, además, disminuyen la unión de la dopamina al receptor D2 del estriado dorsal y la aumentan al receptor D1 en el NAc (Colantuoni et al., 2001), esto último llevaría a la activación de cascadas de señalización que incrementan la expresión del factor de transcripción Δ FosB, cambios que ya han sido observados en la dependencia a ciertas drogas (Volkow et al., 1993,

Hietala et al., 1994, Nestler et al., 2001, Hadad and Knackstedt, 2014). Los modelos animales de atracón, también han permitido revelar un rol para los opioides en este comportamiento, ya que se han mostrado alteraciones en la expresión de sus receptores en el NAc de ratas sometidas a eventos intermitentes de ingesta de azúcares o mezclas de azúcares con grasa (Colantuoni et al., 2001, Kelley et al., 2003, Spangler et al., 2004) y que los atracones, son estimulados por inyecciones de opioides en el NAc, lo cual es dependiente de la activación de la amígdala (Will et al., 2004). Por último, se ha podido demostrar un rol en el desarrollo del atracón para la acetilcolina del NAc (Rada et al., 2005, Avena et al., 2006) y para GABA (Buda-Levin et al., 2005, Corwin et al., 2011, Corwin et al., 2012). Por todo esto, el uso de modelos animales es crucial para el entendimiento de los cambios neuroquímicos que están relacionados al desarrollo del atracón.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral fue estudiar los circuitos neuronales activados por uno o múltiples eventos de ingesta de dieta rica en grasa (DRG), y evaluar el potencial rol modulador de ghrelina sobre ellos. Para esto, se utilizó una combinación de análisis comportamentales, neuroanatómicos y de trazado neuronal en ratones manipulados farmacológica- o genéticamente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1: Estudiar los circuitos neuronales involucrados y el rol de ghrelina en el control de un único evento de ingesta de DRG

- 1a. Estudiar el comportamiento de los ratones ante la presencia de un pellet de DRG.
- 1b. Determinar las áreas cerebrales activadas por el consumo de DRG.
- 1c. Estudiar la anatomía y funcionalidad de los grupos neuronales activados por el consumo de DRG.
- 1d. Determinar si la vía de señalización de ghrelina regula la ingesta de DRG mediante el uso de ratones deficientes de GHSR1a y la administración periférica de dicha hormona.

Objetivo 2: Estudiar los circuitos neuronales involucrados y el rol de ghrelina en la regulación de múltiples eventos de ingesta de DRG.

- 1a. Estudiar el comportamiento de los ratones ante la presencia diaria y por tiempo limitado de un pellet de DRG.
- 1b. Determinar las áreas cerebrales activadas por el consumo repetido de DRG.
- 1c. Estudiar la anatomía y funcionalidad de los grupos neuronales activados por el consumo repetido de DRG.

1d. Determinar si la vía de señalización de ghrelina regula la ingesta repetida de DRG mediante el uso de ratones deficientes de GHSR1a y la administración periférica de dicha hormona.

Objetivo 3: Estudiar la participación de las neuronas CRF de la amígdala en el circuito neuronal que controla uno o múltiples eventos de ingesta de DRG

3a. Realizar la validación neuroanatómica del ratón transgénico CRF-hrGFP

3b. Realizar la validación funcional del ratón transgénico CRF-hrGFP.

3c. Estudiar si las neuronas CRF de la amígdala participan en la regulación de uno o múltiples eventos de ingesta de DRG.

Materiales y Métodos

1. ANIMALES EXPERIMENTALES

En la presente Tesis Doctoral se utilizaron ratones machos adultos (2-3 meses de edad) de tres tipos:

1-Ratones salvajes (*wild type* , WT) de la cepa C57BL/6J.

2-Ratones deficientes de GHSR1a. Se utilizaron animales homocigotas, que se obtuvieron por el cruzamiento entre animales heterocigotas con una base genética C57BL/6J.

2-Ratones transgénicos CRF-hrGFP en los que la proteína verde fluorescente humanizada *Renilla reniformis* (hrGFP) se expresa bajo el control del promotor de CRF. Estos animales se generaron a través del uso de un cromosoma bacteriano artificial de CRF (BAC) que contiene una secuencia *upstream* del codón de inicio de CRF de aproximadamente 92,64 kb, la secuencia codificante de CRF y una secuencia final de aproximadamente 38,16 kb *downstream* del codón de terminación. Dentro de éste, se reemplazó la secuencia codificante de CRF por la de hrGFP, en los sitios de inicio transcripcional de CRF. Finalmente, el BAC modificado se microinyectó en el pronúcleo de embriones fertilizados en la etapa unicelular de ratones C57BL/6J.

Todos los ratones que se utilizaron se generaron en el bioterio del IMBICE.

Los ratones se mantuvieron en cuartos con ciclos de luz-oscuridad de 12 y 12 hs (de 7:00 hs a 19:00 hs), a temperatura constante (22 ± 1 °C) con libre acceso a agua y alimento balanceado comercial para ratón o dieta común (DC), excepto cuando se indique lo contrario. Los diferentes grupos experimentales se alojaron en jaulas colectivas, con no más de 5 animales por jaula, hasta 3 días antes del experimento correspondiente siendo transferidos en ese momento a jaulas individuales.

Los animales se sacrificaron de acuerdo a las normas internacionales aceptadas del “National Institutes of Health” (NIH). Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por

la Comisión de Bioterio del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), la cual actúa como comisión de bioética en la utilización de animales.

2. DIETAS UTILIZADAS

Se utilizaron en todos los experimentos DC y DRG, provistos por Gepsa (Grupo Pilar, Pilar, Buenos Aires, Argentina, www.gepsa.com). La DC posee un valor energético de 2,5 kcal/gr y su composición es la siguiente: 28,8% de carbohidratos, 25,5% de proteínas, 3,6% de grasas, 27,4% de fibras, 8,1% de minerales y 6,7% de humedad. Por otro lado la composición de la DRG es la siguiente: 22,5% de carbohidratos, 22,8% de proteínas, 21,1% de grasas, 23,0% de fibras, 5,6% de minerales y 5% de humedad. Los principales componentes de la DRG son ácidos mono-insaturados (44,7%), ácidos saturados (29,8%) y ácidos poli-insaturados (20,9%), entre otros. Es importante remarcar que los pellets de DC y DRG son similares en su apariencia general (color, textura etc.).

3. REACTIVOS

- 3-3'-diaminobenzidina (DAB)/ solución de Níquel (Sigma Aldrich, cat# 32750).
- Alcoholes (Biopack).
- Antagonista del receptor Ox 1, SB-334867 (Tocris, cat.# 1960).
- Anticuerpo Alexa-594 donkey anti-goat (Molecular Probes, cat#A11058)
- Anticuerpo anti-c-Fos generado en conejo (Calbiochem/Oncogene PC38 lot. 45133).
- Anticuerpo anti-c-Fos generado en conejo (Santa Cruz CS7202).
- Anticuerpo anti-conejo biotilado (Jackson Immuno Research Laboratories, cat. 711-065-152).

- Anticuerpo anti-conejo biotinilado (Vector BA1000).
- Anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa 594 (Invitrogen A21207 lot. 52958A).
- Anticuerpo anti-CRF (Santa Cruz. no. A-6455, lot 71B1).
- Anticuerpo anti-orexina generado en conejo (Phoenix Pharmaceuticals, cat# H-003-30).
- Anticuerpo anti-ratón biotinilado (Vector Laboratories, cat# BA-9200).
- Anticuerpo anti- TH generado en conejo (Santa Cruz H196).
- Anticuerpo anti-TH generado en ratón (Sigma-Aldrich, cat# T2928).
- Anticuerpo policlonal anti-hrGFP generado en ratón (Stratagene Vitality cat# 240142).
- Bálsamo de Canadá (Biopack).
- *Buffer* fosfato salino (PBS, del inglés, *phosphate buffered saline*) 0,01 M PH 7,4: Na₂HPO₄ 1,9 g, NaH₂PO₄ 0,32 g y NaCl 8,16 g/l.(Biopack).
- Colchicina (Sigma-Aldrich C2580000)
- DABCO (Sigma lot. 95H3458).
- DMSO (Merk K45190152 402).
- Fluoesferas (Red Fluorescent, Invitrogen cat.# F8793).
- Formaldehido (Biopack).
- Ghrelina esterificada con ácido n-octanoico (Global Peptide, cat. PI-G-03).
- Heparina (Calciparine. Sanofi Aventis).
- *Kit* comercial de complejo avidina- biotina-peroxidasa “VectaStain Elite ABC” (Vector Laboratories, PK-6200).
- LiCl (Sigma-Aldrich 746460).
- LPS (Sigma-Aldrich, cat. # L-3755).
- Sacarosa (Biopack).
- Suero Normal de Burro (Equitech-Bio.INC lote SD 30-2090).

- Tionina (Sigma, cat. T7029).
- TritónX.(Biopack)

4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

4.1 Estudio de los circuitos neuronales involucrados y del rol de ghrelina en el control de un único evento de ingesta de DRG

En la mañana del día experimental (9.00 am), ratones alimentados *ad-lib* con DC se expusieron a un pellet de DC o DRG por 2 hs (n=16 y 14, respectivamente). Para poder discriminar los efectos potenciales de la DRG en sí misma de aquellos producidos por la elevada ingesta de la misma, se incluyó un grupo control *pair-fed* que consistió en ratones expuestos a una cantidad de DRG similar a la consumida por los animales expuestos a DC (n=10). Se controló la ingesta total en las 2 hs de exposición a las correspondientes dietas. Luego los ratones se perfundieron, se extrajeron los cerebros y se cortaron en secciones coronales para realizar distintas inmunohistoquímicas (IHQs)

4.1.1 Bloqueo de la acción de orexina

En otro experimento, se usó el antagonista del receptor Ox1, SB-334867, para bloquear la vía de señalización de orexina. Este compuesto se llevó a 100mM en DMSO conteniendo HCl (en una concentración de 100mM), y se inyectó intraperitonealmente (ip) en una dosis de 5µg/gr de peso corporal en 200 µl de salina, a las 8:30 am. Se ha observado que dosis similares de SB-334867 han afectado el consumo de DRG en varios modelos animales, mientras que no afecta el consumo de DC disponible. Treinta minutos después de la inyección con vehículo o SB-334867, los ratones alimentados *ad-lib* con DC, se expusieron a un pellet de DRG por 2 hs (n=10 y 8, respectivamente). Se incluyó un grupo control *pair fed* para distinguir los efectos específicos del SB-334867 (n=9), que consistió en ratones inyectados con vehículo y expuestos a una cantidad

de DRG similar a la consumida por los ratones tratados con SB-334867. Se controló la ingesta total en las 2 hs de exposición a la DRG. Posteriormente los ratones se perfundieron y los cerebros se acondicionaron para realizar distintas IHQs.

4.1.2 Estudios de trazado neuronal

Para marcar la neuronas del hipotálamo lateral que inervan el AVT, se microinyectaron estereotáxicamente en ésta zona, fluoesferas como trazador retrógrado (n=6). Las fluoesferas, son partículas de latex (*latex beads*) esféricas de 0,04 μm , que se forman a partir del polímero amorfo poliestireno. Las coordenadas de ubicación que se utilizaron fueron AP -3,52, L 0,42, and V 4,27 mm con respecto al Bregma. Estas coordenadas se obtuvieron inicialmente del Atlas de Paxinos (Paxinos and Franklin, 2001) y luego fueron modificadas siguiendo los resultados de estudios pilotos. El inyector (33- *gauge*) se posicionó con un micromanipulador y se inyectaron 800 nl de una suspensión de fluoesferas al 2,5% en salina. Se dejó el inyector en el lugar por 10 minutos de forma de permitir la difusión del trazador. Para permitir el transporte de las fluoesferas y la recuperación de los animales, se dejaron transcurrir 6 días desde la cirugía. Durante este tiempo los ratones se alimentaron *ad-lib* con DC. En el día experimental, los ratones inyectados se expusieron a un pellet de DRG por 2 hs y luego se perfundieron, se extrajeron los cerebros y se acondicionaron para realizar una IHQ doble contra c-Fos y orexina. Este experimento se realizó específicamente para evaluar si las neuronas de orexina que se activan en respuesta al consumo único de DRG (evidenciado por la presencia de señal de c-Fos) envían sus proyecciones al AVT, por lo que se excluyó el grupo control con DC.

4.1.3 Experimento de *gavage*

En este experimento se administró mediante tubos plásticos para *gavage* oral (cat# FTP-20-38, Instech Solomon Laboratories) DC o DRG resuspendida en agua. El procedimiento de *gavage* oral se realizó por personal entrenado siguiendo el protocolo realizado anteriormente

(Perello et al., 2010). Se usó como referencia la distancia desde la punta de la cabeza del animal hasta la última costilla para establecer el largo del tubo de gavage, de forma de evitar la perforación del estómago. Los ratones se acostumbraron para la disminución del estrés mediante el manipuleo y la realización del procedimiento diariamente durante 4 días previos al día de experimentación. La cabeza del ratón se extendió hacia atrás de forma de generar una línea recta a través del cuello y el esófago. El tubo de *gavage* se colocó en el diastema de la boca y suavemente se avanzó a través del paladar superior hasta que se alcanzó el final del esófago. A los ratones (n=4) se les dio una infusión intragástrica conteniendo 310 mg de DC o DRG en un volumen de 1ml. De esta forma, el grupo control recibió aproximadamente 0,77 kcal mientras que el grupo de DRG recibió aproximadamente 1,21 kcal. Luego de la infusión, se removió lentamente el tubo siguiendo el mismo ángulo de inserción. Los ratones se perfundieron 2 hs después y los cerebros se acondicionaron para realizar una IHQ contra c-Fos.

4.1.4 Evaluación de la acción de ghrelina sobre la ingesta de DRG durante un único evento

Para esto, se utilizaron dos estrategias de forma de determinar si la vía de señalización de ghrelina afecta la ingesta de DRG durante un único evento:

- Administración periférica de ghrelina: En este experimento, los ratones se separaron en 4 grupos experimentales de acuerdo al tratamiento que recibirían (ghrelina o vehículo) y a la dieta que tendrían acceso DC o DRG. El día experimental, los animales se inyectaron con ghrelina (0,2 µg/g de peso corporal, subcutánea) o vehículo. El control de la ingesta de alimento se realizó a los 30, 60 y 120 minutos posteriores al tratamiento.
- Utilización de ratones deficientes del receptor GHSR1a, a los que se les ofreció DC o DRG durante 2 hs.

En ambos experimentos el control de la ingesta de alimento se realizó a los 30, 60 y 120 minutos posteriores al ofrecimiento del pellet. Luego los animales se perfundieron, se extrajeron

los cerebros y se cortaron en secciones coronales. Las secciones de cerebro se utilizaron para realizar distintas IHQs.

4.2 ESTUDIO DE LOS CIRCUITOS NEURONALES INVOLUCRADOS Y DEL ROL DE GHRELINA EN EL CONTROL DE MÚLTIPLES EVENTOS DE INGESTA DE DRG

Para realizar este experimento los ratones se separaron en 3 grupos experimentales: 1) DC *ad-lib*, a estos ratones (n=14) se los expuso a un pellet de DC de 9.00 a 11.00 am durante los 4 días del experimento; las 22 hs restantes de cada día tuvieron acceso libre a DC, 2) DRG *ad-lib*, a este grupo (n=8) se lo expuso de 9.00 a 11.00 am de cada día a un pellet de DRG mientras que las 22 hs restantes se le dio acceso ilimitado a DRG y 3) DRG diario, grupo con acceso diario y por tiempo limitado a DRG. A este grupo de ratones se lo expuso a un pellet de DRG de 9.00 a 11.00 am durante los 4 días experimentales y a su vez tuvo, acceso constante e ilimitado a DC durante todo el día. En todos los casos se controló la ingesta total en las 2 hs de exposición a DC o DRG. Los 2 primeros grupos se perfundieron a las 11 am del cuarto día. Mientras que los animales que tuvieron acceso diario a DRG se fueron perfundiendo a distintos tiempos: (i) Luego de las dos horas de exposición a DRG el primer día (n=10, DRG/ post día 1), (ii) A las 9.00 am del tercer día del experimento, antes del acceso al pellet de DRG (n=11/, DRG/pre día 4) y (iii) Luego de la exposición a DRG el último día del experimento (n= 28, DRG/post día 4). Para algunos ratones de los grupos DC *ad-lib* y DRG/post día 4 (n=11 y 24, respectivamente) se controló la ingesta de DC entre las 11 am y las 9 am del día siguiente (22 hs de ingesta de DC). Luego de las perfusiones, se extrajeron los cerebros y se acondicionaron para realizar distintas tinciones.

4.2.1 Análisis de la actividad locomotora anticipatoria

Los ratones se alojaron en cajas individuales blancas una semana antes del comienzo del experimento. Para documentar la actividad locomotora, éstas se colocaron en cajas de monitoreo aisladas acústicamente y ventiladas mecánicamente (55 x 35 x 90 cm), equipadas con

una cámara con iluminación LED regulable, en la parte superior de la caja. A las cajas individuales se les removió temporalmente su tapa y se reemplazó con una pared vertical, de forma de asegurar el confinamiento de los ratones y facilitar la grabación de los videos. Se habituó a los ratones al ambiente de grabación poniéndolos durante 90 minutos sin acceso a agua y a comida por 2 días consecutivos antes del inicio del procedimiento experimental. Éste consistió en sesiones de 150 minutos durante 5 días consecutivos, durante los cuales los ratones se pusieron en la cámara de grabación por 30 minutos sin acceso a agua y a comida, luego se les dio acceso, todavía en la caja, a un pellet de DC o DRG, por 60 minutos transfiriéndose posteriormente, al cuarto de ratones del bioterio con acceso a agua. Luego se retiró el pellet de DRG y se restituyó la DC hasta el día siguiente. Como control positivo de actividad locomotora anticipatoria, un grupo de ratones (n=3) se mantuvo con consumo restringido de DC (70% del consumo diario) durante los días de habituación y experimentales. Los videos de los primero 30 minutos de la actividad documentada se analizaron con el *software* SwisTrack.

4.2.2 Bloqueo de la acción de orexina

Así como se realizó el bloqueo de la vía de señalización de orexina en un evento único de ingesta de DRG, se usó el antagonista SB-334867 sólo para evaluar sus efectos en el grupo expuesto por 4 días a un pellet de DRG. Para esto, se inyectó intraperitonealmente vehículo o SB-334867 (n=10 y 8, respectivamente), en la misma dosis utilizada previamente (5µgr/gr peso corporal), 30 minutos antes de ofrecerles el pellet de DRG (8:30 am) durante los 4 días que duró el experimento. Se controló la ingesta de alimento durante las 2 hs de exposición al pellet. Luego los animales se perfundieron, se les extrajeron los cerebros y estos se acondicionaron para la realización de distintas IHQs.

4.2.2 Evaluación de la acción de ghrelina en eventos diarios de ingesta de DRG

De la misma forma que se realizó para un único evento de ingesta de DRG, se utilizaron 2 estrategias para estudiar si la vía de señalización de ghrelina afecta el consumo diario y por tiempo limitado de DRG.

- Utilización de ratones deficientes de GHSR1a: Siguiendo el mismo protocolo de múltiples eventos de acceso a DRG que se utilizó con el grupo DRG/post día 4, se utilizaron ratones deficientes del receptor de ghrelina y se les dio acceso a DRG (n=13) y a DC (n=3) por 4 días, de forma de poder comparar su comportamiento con los ratones WT del grupo mencionado.
- Administración periférica de ghrelina: En este experimento la administración de ghrelina subcutánea (en la misma dosis utilizada anteriormente, 0.2 µg/gr de peso corporal) o vehículo, se realizó inmediatamente antes de ofrecerles el pellet de DRG. Este protocolo se repitió durante los 4 días del experimento

Para ambos casos se controló la ingesta durante 2 hs, y el cuarto día los ratones se perfundieron, se les extrajeron los cerebros y estos se acondicionaron para la realización de diferentes IHQs.

4.3 ESTUDIO DE LA PARTICIPACION DE LAS NEURONAS CRF DE LA AMÍGDALA EN EL CIRCUITO NEURONAL QUE SE ACTIVA POR UNO O MÚLTIPLES EVENTOS DIARIOS DE INGESTA DE DRG

4.3.1 Validación del ratón transgénico CRF-hrGFP

Para la validación del ratón transgénico, se realizó una IHQ, revelada en color rojo, contra CRF en muestras de cerebro de : (i) ratones *naive* CRF-hrGFP (n=3); (ii) ratones CRF-hrGFP inyectados intracerebroventricularmente (ICV, coordenadas AP: -0,3 mm, L: 1,0 mm and V:-2,3 mm) con colchicina (32 µg en 4 µl) 72 hs previas al sacrificio (n=3); y (iii) ratones CRF-hrGFP

inyectados bilateralmente en la amígdala (coordinadas estereotáxicas, AP: -1,2 mm, L: -2,4 mm y V: 4,0 mm) con colchicina (32 μ g en 4 μ l) 72 hs antes del sacrificio (n=3). De las imágenes obtenidas, de los resultados de la IHQ, se cuantificó el número total de células fluorescentes verdes, de células fluorescentes rojas y de las colocalizaciones entre ambas a través de toda la amígdala.

4.3.2. Caracterización funcional de las neuronas CRF de la amígdala.

Diferentes grupos de ratones CRF-hrGFP alojados en cajas individuales, se sometieron a diferentes manipulaciones experimentales que se describen a continuación:

- Tratamiento con lipopolisacárido bacteriano (LPS): Los ratones se inyectaron con LPS (25 μ g/ratón, ip, n=3) o salina (n=2) y perfundidos luego de 2 hs de la inyección
- -Estrés por confrontación social: Los ratones se introdujeron de a uno por vez, por 10 minutos en una caja con un macho C57BL/6J dominante y agresivo de mayor edad. Seguido a esta exposición los ratones se devolvieron a sus cajas individuales y se perfundieron 2 hs después (n=5). Ratones control se introdujeron por 10 minutos en una caja limpia y luego se devolvieron a sus cajas individuales y se perfundieron 2 hs después (n=2).
- Experimento de ayuno y realimentación: Los ratones se ayunaron en sus cajas individuales a las 9.00 am del día experimental. Después de 48 hs, se perfundió un grupo de ratones (n=3) y a otro grupo se le dio acceso a DC por 2 hs al cabo de las cuales se perfundieron (n=3). Se controló la ingesta de alimento
- Ingesta de DRG durante una sola exposición: En la mañana del día experimental los ratones se expusieron a un pellet de DRG (n=5) y 2 hs después se perfundieron. Se controló la ingesta durante las 2 hs de exposición.

- Ingesta de DRG durante exposiciones múltiples: Durante la mañana de 4 días consecutivos se les dio a los ratones acceso libre por 2 hs a DRG (n=6) luego de las cuales los animales se perfundieron. Se controló la ingesta durante la exposición a DRG.
- Retiro de DRG: En este experimento se dio a los ratones, libre acceso a DRG durante todo el día por 2 semanas. Luego se separaron en 2 grupos, a uno de ellos se lo alimentó con DC (n=3) y al otro con DRG por 24 hs. Posteriormente se perfundieron.
- Aversión condicionada a DRG: En las mañanas del primer y segundo día experimental, los ratones se expusieron por 2 hs a DRG *ad-lib* y luego inyectados con LiCl (150mM, 12ml/kg, ip., n=6) o salina (n=3). En el tercer día, los ratones se expusieron nuevamente a 2 hs de DRG y luego se perfundieron.

5. CIRUGÍAS ESTEREOTÁXICAS

Todas las cirugías se realizaron en el cuarto de cirugía del bioterio del IMBICE, con material de cirugía adecuado y en las condiciones de asepsia normalmente requeridas. En todos los casos se utilizaron animales anestesiados con una mezcla de Ketamina (150mg/Kg de peso i.p) y Xilacina (15mg/Kg de peso i.p).

6. ANALISIS NEUROANATOMICO

6.1 Perfusión y preparación de muestras de cerebro

Para realizar la fijación de las muestras de cerebro, se perfundieron los animales con formaldehído al 4% como fijador. Para ello, los animales se sujetaron anestesiados a una mesa de cirugía por las extremidades con el abdomen hacia arriba. Luego, se abrió la cavidad torácica con el objetivo de acceder al corazón. Se conectó el sistema de perfusión directamente al ventrículo izquierdo del corazón con una aguja. Luego, se realizó una incisión en la aurícula

derecha para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos de lavado. Previo al pasaje del fijador, se pasó a través del sistema de perfusión una solución de lavado (PBS 0,01 M pH 7,4 conteniendo 10 UI/ml de heparina) a un flujo de 5 ml/minuto durante 2 minutos. Luego, se comenzó el pasaje de fijador, formaldehído al 4%, durante 10 minutos a un flujo de 5 ml/minuto. Luego de la perfusión, se aislaron los cerebros y se post-fijaron en solución de formaldehído al 4% durante 2 horas y finalmente se criopreservaron mediante la incubación en una solución de sacarosa al 20% durante toda la noche. Al día siguiente, se congelaron los cerebros y se cortaron en secciones coronales de 32 μm de espesor utilizando un crióstato.

6.2 Inmunohistoquímicas y tinciones

Todas las IHQs se realizaron sobre secciones coronales de cerebro en flotación.

Luego de cada IHQ se montaron las secciones secuencialmente en portaobjetos de vidrio, y se colocó el cubreobjetos con medio de montaje (Bálsamo de Canadá en el caso de IHQ cromogénica y solución de montaje para fluorescencia) para finalmente observarlas al microscopio.

Se realizaron controles para todas las IHQ, en los cuales se procesaron secciones de cerebro con los mismos protocolos que se describen a continuación para cada caso en particular, pero sin el agregado de anticuerpo primario o sin anticuerpo secundario.

6.2.1. IHQ cromogénica simple

Primero se lavaron las secciones coronales 3 veces durante 10 minutos cada una con PBS, luego se incubaron en H_2O_2 al 0,5% en PBS durante 30 minutos. Luego de otros tres lavados, se realizó una incubación en solución bloqueante (3% suero normal de burro y 0,25% TritonX en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente para luego realizar la incubación de las secciones coronales con el anticuerpo primario correspondiente. Luego, se realizaron otros tres lavados, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario

correspondiente de acuerdo al anticuerpo primario utilizado, se lavaron e incubaron durante 1 hora con el complejo avidina-peroxidasa biotinilada (kit Vectastain Elite ABC). Finalmente se revelaron con el sustrato 3,3'-diaminobencidina comercial en presencia o ausencia de Níquel de acuerdo a la IHQ realizada, generando un precipitado negro-violeta o marrón, respectivamente. Los anticuerpos primarios y secundarios se detallan en la Tabla 1

6.2.2 IHQ cromogénica doble (c-Fos/orexina o TH)

Luego de realizar una IHQ simple contra c-Fos revelada con DAB/níquel, las secciones de cerebro se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el segundo anticuerpo primario. Luego del tiempo de incubación correspondiente al anticuerpo utilizado, se lavaron las secciones y se incubaron con el anticuerpo secundario por 1 hora. Posteriormente, las secciones se lavaron, se incubaron por una hora con el kit avidina-biotina-peroxidasa y finalmente la señal visible se reveló con DAB sin solución de níquel (Tabla 1)

6.2.3 IHQ simple contra orexina y doble contra TH y orexina dentro del AVT

Secciones cerebrales conteniendo el AVT se usaron para la detección de señal inmunoreactiva para orexina usando el anticuerpo anti-orexina y se reveló la señal con DAB/Níquel obteniendo un precipitado negro/violáceo como se indicó anteriormente.

Secciones cerebrales independientes conteniendo el AVT se usaron en primer lugar para la detección de células inmunoreactivas para TH. Se obtuvo un precipitado marrón al revelarlo con DAB sin solución de níquel y luego se continuó incubando las mismas secciones cerebrales con el anticuerpo anti- orexina. Esta IHQ se reveló con DAB/ Níquel dando una señal negro/violácea.

6.2.4 IHQ fluorescentes

Las secciones coronales de los cerebros de ratón se lavaron y se incubaron directamente con solución bloqueante durante 1 hora. Luego se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente. Posteriormente, las secciones se lavaron y se incubaron con un anticuerpo secundario por 2 hs. (Tabla 1)

Específicamente, para las muestras provenientes de los experimentos de trazado neuronal, las secciones cerebrales a las que se les realizó una IHQ contra c-Fos, se utilizaron para la detección de señal inmunoreactiva de orexina mediante una IHQ fluorescente. Para esto, luego de lavar las secciones se incubaron con anti orexina. Al día siguiente, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 488 durante 2 hs.

6.2.5 Coloración de Nissl.

En primera instancia se montaron las secciones secuencialmente en portaobjetos de vidrio, luego se lavaron durante 1 minuto en agua destilada y se incubaron en solución de tionina durante 20 minutos. Posteriormente, se deshidrataron las secciones pasándolas 1 vez durante 1 minuto por agua destilada, luego 2 veces de 1 minuto cada una por alcohol 96°, 2 veces de 1 minuto cada una por alcohol 100° y por último 5 minutos por xilol. Finalmente, se colocaron los cubreobjetos con medio de montaje. Esta coloración sirve para teñir los cuerpos de Nissl, que son acumulaciones basófilas, que se encuentran en el citoplasma de las células nerviosas.

Tabla 1. Condiciones experimentales para cada IHQ cromogénica y fluorescente

Anticuerpo primario	Concentración	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación	Anticuerpo secundario	Tiempo de revelado
Anti c-Fos PC38	1:30000	4°C	48 hs	Anti conejo biotinilado Jackson 1:1000	10 min
Anti c-Fos Sta.Cruz	1:1000	4°C	48 hs	Anti conejo biotinilado Vector 1:1500	10 min
Anti hrGFP	1:1000	4°C	24 hs	Anti conejo biotinilado Jackson 1:1000	10 min
Anti TH Sigma Aldrich	1:400	4°C	48 hs	Anti ratón biotinilado 1:2000	5 min
Anti TH Sta. Cruz	1:5000	4°C	48 hs	Anti conejo biotinilado Vector 1:1500	5 min
Anti orexina	1:20000	4°C	48 hs	Anti conejo biotinilado Vector 1:1500	5 min
Anti CRF	1:200	4°C	48 hs	Anti conejo Alexa 594 1:1000-2hs	-

6.3 Análisis neuroanatómico cuantitativo

El análisis cuantitativo fue realizado de forma independiente por dos observadores bajo las mismas condiciones ópticas, en una de cada tres series de secciones coronales completa.

Los límites anatómicos de cada región cerebral analizada se identificaron usando el atlas de cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). De esta forma, los conteos se realizaron en secciones comprendidas entre los bregmas 0,86 y 1,18 mm para el NAc; -0,70 y -1,70 mm para la amígdala, -1,22 y -1,94 para el HLat y finalmente -3,28 y -3,92 mm para el AVT. Para el análisis, además, el NAc se subdividió en caparazón medial, caparazón lateral y centro (Kelley, 2004, Ikemoto, 2007), mientras que el AVT se subdividió en 3 subnúcleos: núcleo IF, núcleo PN y núcleo PBP (Hasue and Shammah-Lagnado, 2002, Ikemoto, 2007, Ferreira et al., 2008) (Figura 1)

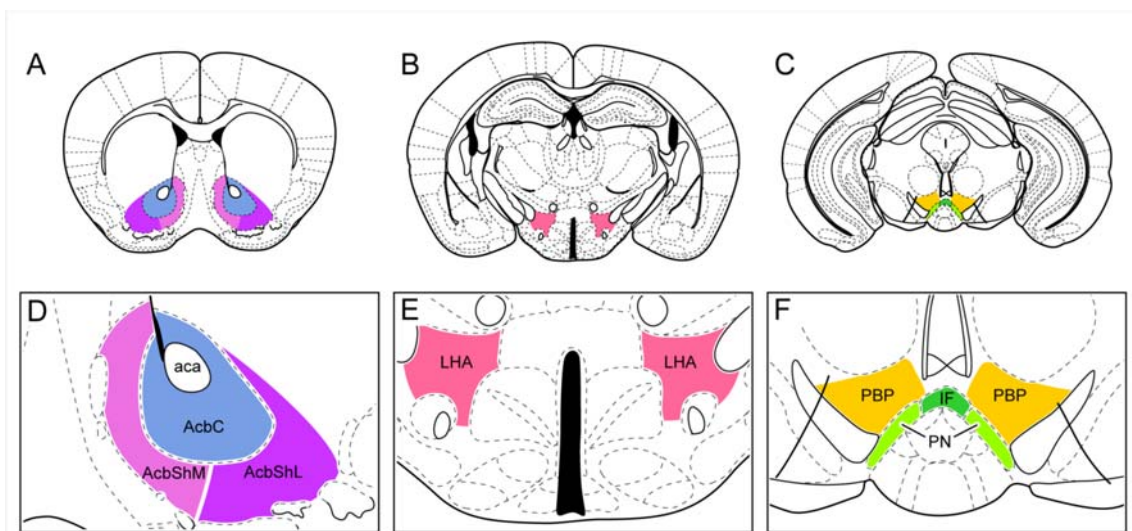


Figura 1. Los paneles A, B y C muestran secciones coronales representativas de las regiones cerebrales analizadas y los paneles D, E y F muestran las mismas secciones ampliadas (Paneles A y D, NAc; paneles B y E, HLat y paneles C y F, AVT)

Para determinar el número total de células inmunoreactivas para c-Fos en cada región cerebral, se cuantificaron las células que contenían precipitado nuclear negro/violáceo a través de todo el núcleo.

El total de neuronas inmunoreactivas para TH y neuronas inmunoreactivas para TH y con núcleo positivo para c-Fos se contaron en las diferentes subregiones del ATV. El total de neuronas inmunoreactivas para orexina y neuronas inmunoreactivas para orexina y con el núcleo positivo para c-Fos se contaron a cada lado del tercer ventrículo en el HLat.

Para la estimación cuantitativa de la densidad de fibras inmunoreactivas para orexina dentro de cada subregión del ATV, se obtuvieron imágenes con un objetivo 100x del AVT con señal para orexina, en áreas comparables y bajo las mismas condiciones ópticas y de luz. Las microfotografías se transformaron a imágenes de 8 bits en escala de grises, y se midió la densidad óptica (DO) promedio para cada imagen usando el Image J. La medida de la DO para cada imagen es el promedio gris de los píxeles siguiendo una escala de 256 grises como referencia. Se determinó el *background* no específico en el cerebro medio dorsal en donde no se encontraron fibras inmunoreactivas para orexina. El valor de DO para cada subregión del AVT se corresponde con la densidad promedio de fibras de orexina menos el *background* respectivo del nivel de la muestra.

Los datos se expresan como el número total de células inmunoreactivas en cada área cerebral, el cual fue calculado a partir de la fórmula de Königsmark. En ésta, el total de células es igual al número de células contadas multiplicada por el total de secciones comprendidas dentro del núcleo y dividida por el número de secciones en las que se realizaron los recuentos. (Königsmark, 1970). En los animales salvajes y deficientes de GHSR1a, el número total de neuronas inmunoreactivas para TH y positivas para c-Fos y, neuronas inmunoreactivas para orexina y positivas para c-Fos se cuantificó usando la misma estrategia. Todo los análisis fueron

corregidos por el doble conteo de acuerdo al método de Abercrombie (Abercrombie, 1946), en el cual el número total de células se multiplica por un factor de corrección igual al espesor de la sección dividido por la suma entre el espesor de la sección y el diámetro promedio de la célula o del núcleo. Para obtener este último dato, se cuantificaron al menos 40 células o núcleos en cada área cerebral y condición experimental utilizando el *software* Image J

Para la estimación cuantitativa del número de somas de las neuronas inmunoreactivas para TH contactadas por fibras inmunoreactivas para orexinas (botones axonales) se visualizaron utilizando un objetivo 100x, las secciones doblemente marcadas con TH y orexina de las cuales se obtuvieron imágenes que se trataron como se describió anteriormente. Por lo tanto, el total de neuronas inmunoreactivas para TH e inmunoreactivas para TH contactadas por fibras inmunoreactivas para orexina se contaron en fotos de alta magnificación y se expresaron como el total de neuronas inmunoreactivas para TH contactadas por fibras inmunoreactivas para orexina en cada subregión del AVT

En los estudios de trazado neuronal, se contaron por un lado las marcas simples: el total de neuronas positivas para c-Fos (precipitado negro/violáceo), el total de neuronas inmunoreactivas para orexina (señal fluorescente verde) y el total de neuronas que presentaron fluoesferas en su interior (señal fluorescente roja). Por otro lado, se contaron las neuronas doble y triplemente marcadas y las relaciones entre ellas se expresaron como porcentajes.

Para el análisis de la amígdala, ésta se subdividió en las siguientes regiones: (i) amígdala basolateral; (ii) IPAC, del inglés *interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure*, el cual es un núcleo que se encuentra en la unión del sistema pálido-estriatal y (iii) la ACe. En las secciones utilizadas para la validación del ratón transgénico CRF-hrGFP, se cuantificaron, de las imágenes fluorescentes obtenidas como resultado de la IHQ contra CRF, el número total de células con autofluorescencia verde y/o de células con señal fluorescente roja

a través de toda la amígdala. La estimación del total de células inmunoreactivas para hrGFP en la amígdala se cuantificó por el precipitado marrón en una de las 4 series de secciones coronales a través de todo el núcleo. Luego estos números se sumaron y se multiplicaron por 4. Los datos se corrigieron por el conteo doble mediante el método de Abercrombie.

6.4 Obtención de imágenes

Las imágenes fluorescentes y de campo claro se adquirieron con un microscopio Nikon Eclipse 50i y una cámara digital DS-Ri1 Nikon. Se utilizaron para la edición, ajuste de brillo y contrastede las imágenes los programas Adobe Photoshop CS4 y Corel Draw 3. Para la cuantificación de la DO se utilizó el programa Image J.

7. ANALISIS ESTADÍSTICO

El análisis se realizó con los programas GraphPad Prism 5.0 e IBM SPSS statistics 17.

Los datos se expresaron como la media \pm SEM.

No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de ratones WT (aquellos provenientes de cruzas entre ratones WT y los hermanos WT de los ratones deficientes de GHSR1a provenientes de cruzas de animales heterocigotas) en ninguna de las mediciones realizadas, por lo que fueron agrupados en el análisis.

Para el análisis de más de tres grupos experimentales se utilizó ANOVA de una vía, seguido por el test de Newman-Keuls cuando las varianzas eran homogéneas; o en caso contrario, por el test de Games-Howell. El análisis de igualdad de varianzas se realizó mediante los test de Bartlett o Levene.

Para comparar los datos provenientes del tratamiento con el antagonista de Ox1 vs los tratados con vehículo en el protocolo de múltiples eventos de ingesta de DRG se utilizó un t-Test, con la corrección de Welch cuando los datos no presentaban varianzas iguales.

Para comparar los datos provenientes de los experimentos con los ratones WT y deficientes de GHSR1a se utilizó un ANOVA de dos vías seguido por el test de Bonferroni en un único evento de ingesta de DRG y un ANOVA de una vía y t-Test para comparar los datos de múltiples eventos de ingesta de DRG.

La correlación entre las 2 hs de ingesta de alimento y las células inmunoreactivas para c-Fos en el IF se realizó por análisis de regresión lineal usando un modelo lineal general.

En todos los casos se consideraron diferencias significativas para $p < 0,05$.

Resultados

1. ESTUDIO DE LOS CIRCUITOS NEURONALES INVOLUCRADOS Y DEL ROL DE GHRELINA EN EL CONTROL DE UN ÚNICO EVENTO DE INGESTA DE DRG

1.1 El acceso a DRG induce hiperfagia espontánea de la misma

Con el objetivo de estudiar el comportamiento alimentario de ratones hacia la DRG, inicialmente se evaluó la ingesta de alimento al ofrecerles, por un tiempo limitado, un pellet de dicha dieta. Para esto, se los dividió en tres grupos experimentales:

- DC *ad lib*: ratones con acceso a DC durante 2 hs.
- DRG: ratones con acceso a DRG durante 2 hs.
- DRG *pair-fed*: ratones con acceso, durante 2 hs, a una masa de DRG similar a la consumida por los animales del grupo DC *ad lib*.

Los ratones utilizados estuvieron alimentados hasta el momento del experimento con DC *ad-libitum* y permanecieron con DC en sus cajas durante las dos horas que duró el experimento. Al cabo de las 2 hs, se cuantificó la cantidad total de alimento ingerida y los ratones se anestesiaron y perfundieron.

Es importante destacar que el color, textura y apariencia de la DRG utilizada es similar a la de la DC, por lo que se supone que la elección de la dieta consumida es principalmente debido a sus características gustativas y olfativas (Figura 1A).

Cualitativamente se observó que los ratones a los que se les ofreció DRG, comenzaron a comer espontáneamente y de forma prácticamente inmediata una vez depositado el pellet dentro de su caja y que el mayor consumo de dicha dieta se produjo dentro de la primera media hora del experimento. Cuantitativamente, se observaron diferencias significativas en la ingesta total de alimento entre los distintos grupos experimentales [$F(2,34) = 13,07$; $p < 0,0001$ (Figura 1B)]. El grupo DRG consumió una cantidad de alimento significativamente mayor que el grupo con acceso únicamente a DC. La cantidad de DRG ingerida por el grupo DRG *pair-fed* fue de 119

± 15 mg, la cual fue similar a la masa consumida por el grupo DC *ad-lib* (110 ± 27 mg). Debido a que la DC y la DRG no son isocalóricas, también se examinó el consumo en calorías de la dieta ingerida para los distintos grupos. Nuevamente se observó una diferencia significativa entre los grupos DC y DRG [F (2,34)= 22,64; $p < 0,0001$. Figura 1C], siendo la ingesta calórica consumida por el grupo DRG significativamente mayor que la consumida por el grupo DC *ad-lib*. Es importante mencionar, que para los grupos DC *ad-lib* y DRG *pair-fed* no se encontraron diferencias significativas en el consumo calórico registrado durante las 2 hs de acceso a sus respectivas dietas. ($p > 0,05$; Figura 1C).

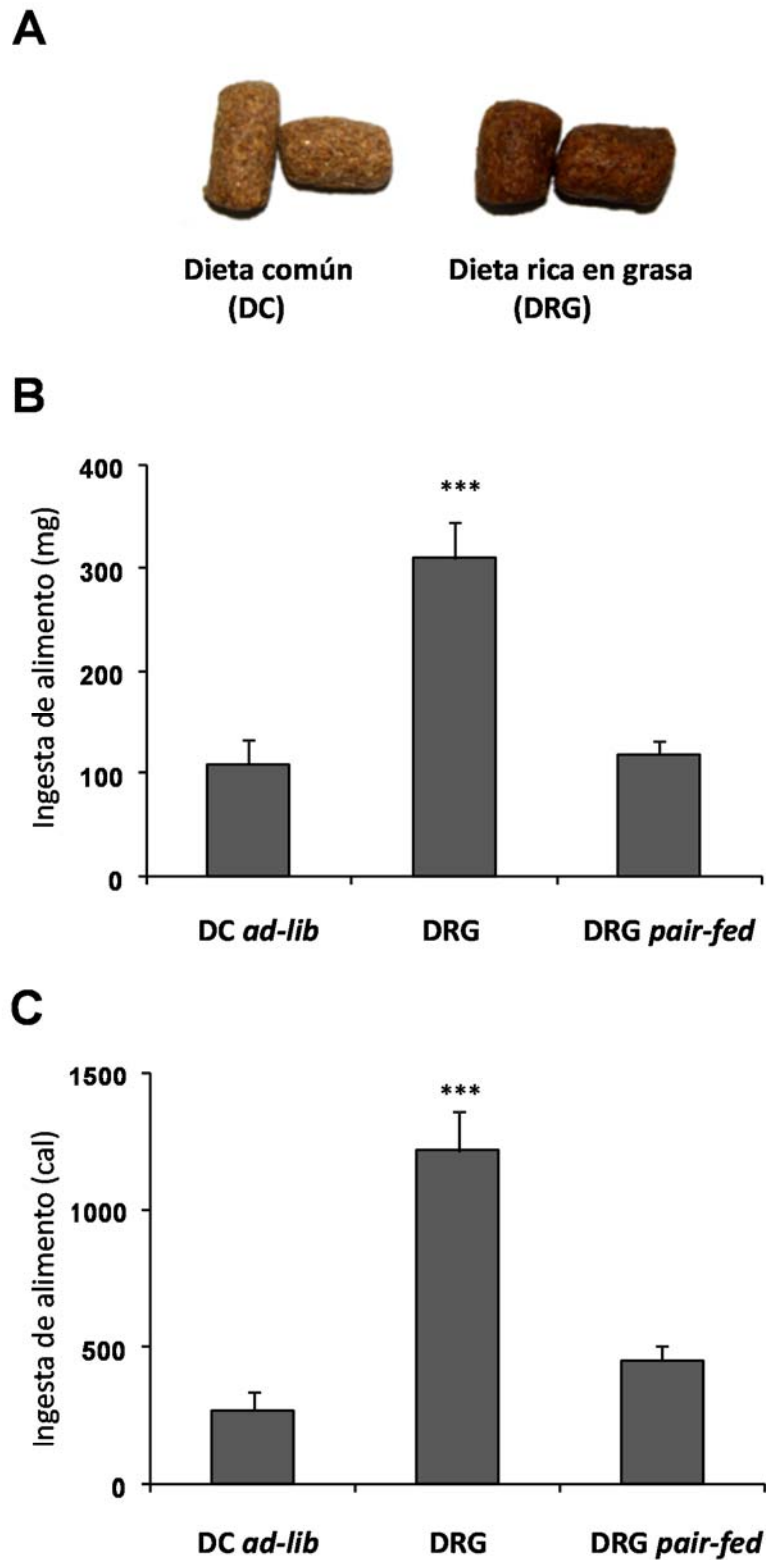


Figura 1. El acceso a DRG induce hiperfagia espontánea de la misma. El panel A muestra imágenes de las dietas utilizadas en este estudio. Los paneles B y C muestran la ingesta de alimento producida durante las 2hs del experimento en los grupos DC *ad-lib*, DRG y DRG *pair-fed* expresada en mg y en calorías respectivamente. Los valores se expresan como la media±SEM. *******, $p < 0,001$ vs. Grupos DC *ad-lib* y DRG *pair-fed*.

1.2 Un único evento de ingesta de DRG activa núcleos de la vía mesolímbica

Con el objetivo de realizar un mapeo de las áreas cerebrales que se activaron por la ingesta de DRG, se extrajeron los cerebros de los ratones pertenecientes a los tres grupos experimentales, se congelaron y se cortaron en secciones coronales. Luego, dichas secciones se procesaron para realizar una IHQ contra c-Fos.

La densidad de células positivas para c-Fos observada en núcleos cerebrales relacionados a la regulación homeostática y hedónica de la ingesta de alimento, se describe en la Tabla 1.

En relación a la ingesta homeostática, se analizaron distintos núcleos del hipotálamo y el complejo dorsal del vago. En éstos se observó que la densidad de células positivas para c-Fos fue moderada en los dos grupos que consumieron DRG, encontrándose enriquecida en el HLat, el cual es considerado un vínculo entre los dos circuitos que regulan la ingesta de alimento. (Figura 2A, tercera fila). Por otro lado, para los mismos grupos, la mayor cantidad de células positivas para c-Fos se observó en núcleos de la vía mesolímbica, relacionadas con la ingesta hedónica, como el NAc, la ACe (Figura 2A, primera y segunda filas, respectivamente) y el AVT (Figura 3A). Por esto, tanto para el HLat como para el NAc (centro y caparazón), la ACe y el AVT se realizó un análisis cuantitativo más detallado. En los tres primeros núcleos, se observaron diferencias significativas en el número de células positivas para c-Fos [Centro del NAc: $F(2,19) = 47,97$; $p < 0,0001$ (Figura 2B); Caparazón del NAc: $F(2,19) = 21,01$; $p < 0,0001$ (Figura 2C); ACe: $F(2,17) = 10,02$; $p = 0,0013$ (Figura 2D) e HLat: $F(2,9) = 14,82$; $p = 0,0014$ (Figura 2E)]. Para todos estos núcleos el número de células inmunoreactivas para c-Fos fue significativamente mayor en los grupos que consumieron DRG (DRG y DRG *pair-fed*), mientras que entre éstos últimos los niveles de c-Fos encontrados fueron similares entre sí.

Tabla 1. Densidad relativa de células inmunoreactivas para c-Fos en los tres grupos experimentales luego de un evento único de ingesta de DRG ¹.

	DC <i>ad-lib</i>	DRG	DRG <i>pair-fed</i>
Núcleo Arcuato-NArc	-	+/-	-
Núcleo Dorsomedial-NDM	+	+	+
Hipotálamo Lateral-HLat	+	++	++
Núcleo Paraventricular-NPV	-	+	+
Área Ventral Tegmental-AVT	-	++	+
Núcleo Accumbens-NAc	-	++	++
Amígdala Central-ACe	-	+	+
Núcleo Dorsal del Raphe –NDR	-	+	-
Área postrema–AP	-	-	-
Núcleo Motor Dorsal del Vago-NMDV	+	+	+
Núcleo del Tracto Solitario-NTS	+	+	+

¹ La estimación de la densidad de las células inmunoreactivas para c-Fos se hizo considerando tanto la intensidad de la señal como el número de células marcadas. ++, alta densidad. +, densidad moderada. +/- visualización inconsistente.

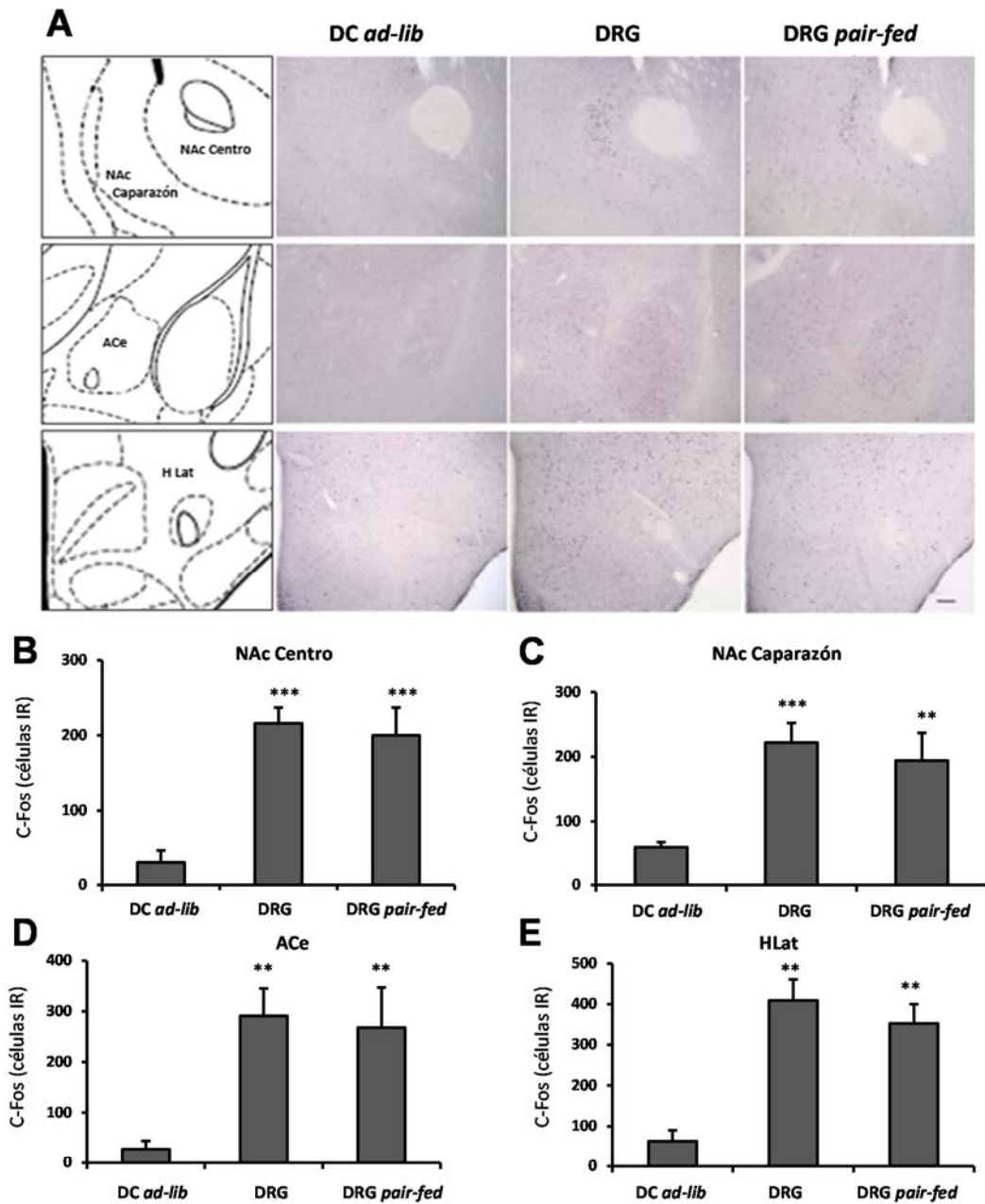


Figura 2. Un evento único de ingesta de DRG activa núcleos específicos de la vía mesolímbica y el HLat. El panel A muestra diagramas esquemáticos en secciones coronales de las regiones cerebrales en estudio (columna izquierda) y microfotografías representativas de una IHQ contra c-Fos en los tres grupos experimentales. Las filas superior, media e inferior de microfotografías muestran el NAc (centro y caparazón), la Ace y el HLat respectivamente. Escala 100 μ m. Los paneles B-E muestran los análisis cuantitativos de la IHQ contra c-Fos en el NAc Centro (B), NAc Caparazón (C), Ace (D) e HLat (E). Los histogramas representan el número total de neuronas inmunoreactivas (IR) para c-Fos en cada núcleo, para cada grupo experimental. Los valores se expresan como la media \pm SEM. **, $p < 0.01$ vs grupo DC *ad-lib*. ***, $p < 0.001$ vs grupo DC *ad-lib*.

En el AVT, también se observó una importante activación de los grupos que consumieron DRG (Figura 3A). De este núcleo se realizó un análisis más detallado ya que se cuantificó la cantidad de células inmunoreactivas en cada una de sus subregiones (IF, PN y PBP). Como resultado, se observó que un único evento de ingesta de DRG induce cambios significativos en el número de células inmunoreactivas para c-Fos en el PN [$F(2,30) = 6,826$; $p = 0,0036$], el PBP [$F(2,29) = 8,099$; $p = 0,0016$] y el IF [$F(2,26) = 19,03$, $p < 0,0001$]. Para el PN y PBP de los dos grupos que consumieron DRG, el número de células inmunoreactivas para c-Fos fue significativamente mayor que el encontrado para el grupo DC ad-lib (Figura 3B, C). Mientras que para el IF se encontró que el número de células positivas para c-Fos del grupo DRG fue significativamente mayor en comparación con los grupos DC *ad-lib* y DRG *pair-fed* (Figura 3D). Además para el IF pudo observarse una correlación positiva ($y = 0,429x + 41,75$; $r = 0,628$) entre la cantidad de DRG ingerida durante las 2 hs del experimento y el número total de las células inmunoreactivas para c-Fos (Figura 3E).

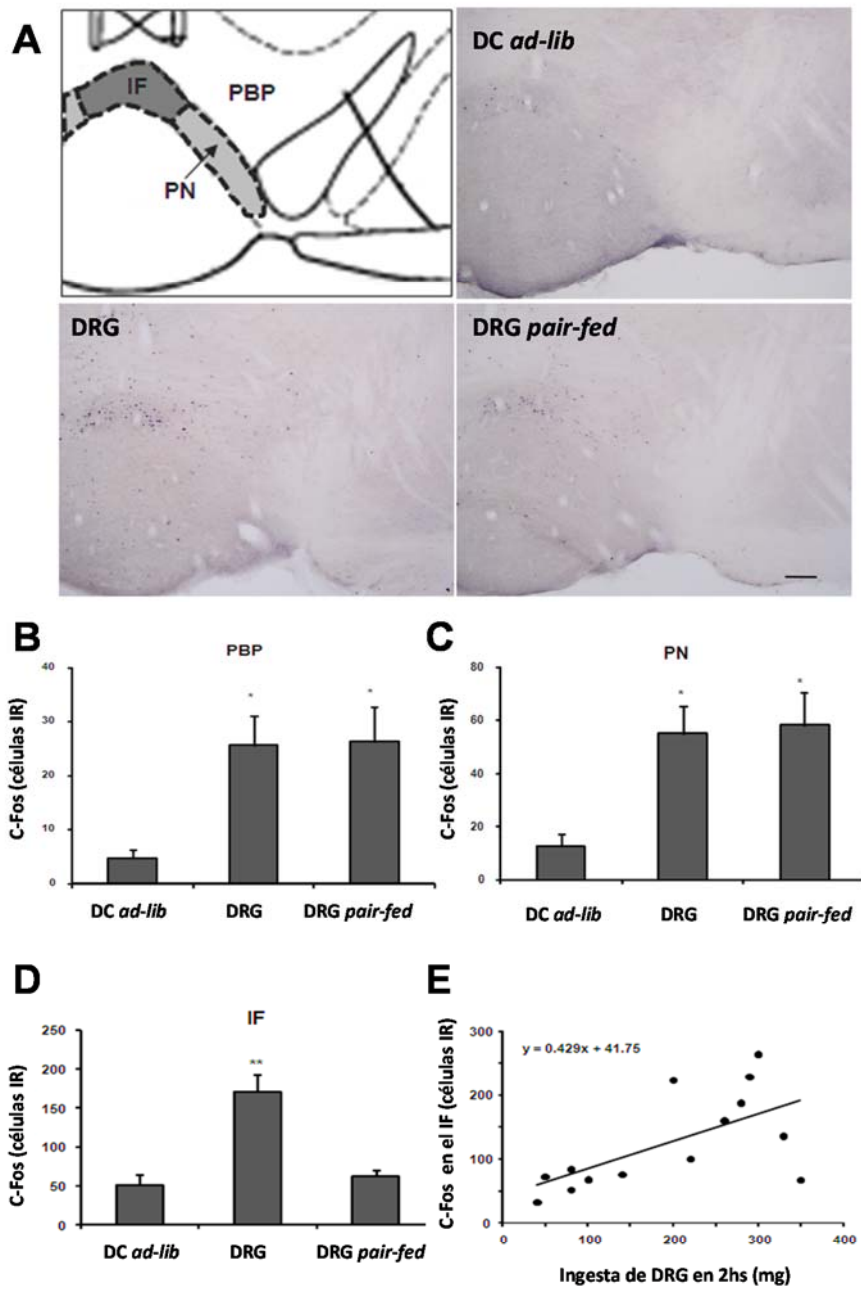


Figura 3. Un evento único de DRG activa las subregiones del AVT. El panel A muestra un diagrama esquemático en un corte coronal de las subregiones del AVT (extremo superior izquierdo) y microfotografías representativas de una IHQ contra c-Fos (señal negro violeta) para los grupos DC *ad-lib* (extremo superior derecho), DRG (extremo inferior izquierdo) y DRG *pair-fed* (extremo inferior derecho). Escala: 100 μ m. Los paneles B-D muestran el análisis cuantitativo de la IHQ contra c-Fos específico para cada subregión del AVT; PBP (B), PN (C) e IF (D). Los gráficos de barras representan el número total de células en el núcleo para cada grupo experimental. Los valores se expresan como la media \pm SEM. **, p 0,01 vs. grupo DC *ad-lib*. ***, p 0,001 vs. grupo DC *ad-lib*. El panel E muestra la correlación entre la ingesta de DRG durante las 2hs de experimento y las células IR para c-Fos en el IF para el grupo DRG ($r = 0,628$). Cada punto representa la medida de un único animal.

1.3 Un único evento de ingesta de DRG activa diferencialmente a las neuronas dopaminérgicas de las subregiones del AVT

Con el objetivo de analizar el perfil de activación del AVT luego de un único evento de ingesta de DRG, se realizó una inmunohistoquímica doble contra c-Fos y contra tirosina hidroxilasa (TH), enzima cuya actividad es la limitante en la velocidad de la biosíntesis de dopamina. La tinción contra TH se utilizó como criterio para decidir si las neuronas que resultaron activadas eran dopaminérgicas o no. Nuevamente, para determinar activación neuronal por el protocolo utilizado se realizó una tinción contra c-Fos.

En la Figura 4 se observan microfotografías representativas de esta inmunohistoquímica doble en las que se pueden visualizar las distintas áreas del AVT para dos de las tres condiciones ensayadas (grupo con DC *ad-lib* y grupo con acceso a DRG).

En coincidencia con lo reportado en trabajos previos realizados en el AVT de rata (Ikemoto, 2007), se encontró que las neuronas positivas para TH presentaron características citoarquitectónicas particulares en cada subregión. En el IF, las células inmunoreactivas para TH fueron pequeñas, de inmunoreactividad intensa y se encontraron densamente empaquetadas a lo largo de la línea media del subnúcleo (Figura 4, paneles 1 y 4). En el PN las neuronas TH positivas fueron relativamente homogéneas, mayormente de tamaño mediano, de inmunoreactividad intensa y con orientación en el eje semilateral (Figura 4, paneles 2 y 5). En el PBP fueron de tamaño variable aunque más grandes que las encontradas en el IF, de forma más irregular, de media a baja intensidad de inmunoreactividad y con una orientación no uniforme dentro del núcleo. (Figura 4, paneles 3 y 6).

Al comparar el número de neuronas inmunoreactivas para TH en el AVT, se observó que el total en cada subregión, para cada grupo experimental, no fue afectado por el consumo de DRG. Para el grupo DC *ad-lib* se estimaron 746 ± 91 , 1433 ± 153 y 365 ± 42 neuronas

inmunoreactivas para TH en el PN, PBP e IF respectivamente. Para el grupo DRG se estimaron 816 ± 76 , 1363 ± 126 y 352 ± 51 neuronas inmunoreactivas para TH en el PN, PBP e IF respectivamente. Por último para el DRG *pair-fed*, los valores estimados de neuronas inmunoreactivas para TH en el PN, PBP e IF fueron 856 ± 95 , 1416 ± 161 y 402 ± 57 respectivamente.

Sin embargo, se observaron cambios significativos en el número de células positivas para c-Fos e inmunoreactivas para TH cuando se compararon las tres subzonas del AVT entre los grupo experimentales [PN: $F(2,17) = 4,448$; $p = 0,0279$; PBP: $F(2,17) = 9,179$; $p = 0,0020$ e IF: $F(2,17) = 8,995$; $p = 0,0022$]. En el PN y PBP de los grupos que consumieron DRG, el número de neuronas doblemente marcadas fue significativamente mayor que el encontrado en el grupo que tuvo acceso únicamente a DC. Específicamente, en el PN, 13 ± 1 , 62 ± 15 y 52 ± 11 neuronas inmunoreactivas para TH fueron positivas para c-Fos en los grupos DC *ad lib*, DRG y DRG *pair-fed* respectivamente y en el PBP el cambio ocurrió en el mismo sentido, ya que 4 ± 4 , 17 ± 4 y 23 ± 6 células inmunoreactivas para TH fueron positivas para c-Fos en los grupos DC *ad lib*, DRG y DRG *pair-fed*, respectivamente. Mientras que en el IF, así como se observó para los niveles de c-Fos, el número de neuronas doblemente marcadas solamente del grupo que ingirió DRG fue significativamente mayor (51 ± 8) en comparación con los valores encontrados en los dos grupos restantes, DC *ad lib* (14 ± 6) y, DRG *pair-fed* (21 ± 2).

1.4 Un único evento de ingesta de DRG activa las neuronas productoras de orexina del HLat

Ya que existen evidencias que indican que el HLat está relacionado tanto con los circuitos homeostáticos y hedónicos que regulan la ingesta de alimento y que previamente en este trabajo se mostró que en éste núcleo se produce un importante activación luego de la ingesta espontánea de DRG, se decidió determinar si las neuronas productoras de orexina presentes en

el HLat fueron las que se activaron. Para esto se realizó una inmunohistoquímica doble contra c-Fos y contra orexina (Figura 5).

Al igual que lo ocurrido en el AVT, la ingesta de DRG en un único evento de 2 horas no afectó el número total de células inmunoreactivas para orexina del HLat siendo los valores encontrados 1510 ± 162 , 1428 ± 149 y 1486 ± 165 neuronas en los grupos DC *ad-lib*, DRG y DRG *pair-fed* respectivamente ($p > 0,05$).

Si se observó una diferencia significativa entre el grupo DC *ad-lib* y los grupos con acceso a DRG en el número de neuronas inmunoreactivas para orexina y positivas para c-Fos [$F(2,9) = 13,01$, $p = 0.0022$]. Específicamente se encontraron 16 ± 13 , 376 ± 60 y 297 ± 67 neuronas doblemente marcadas en los grupos DC *ad-lib*, DRG y DRG *pair fed*.

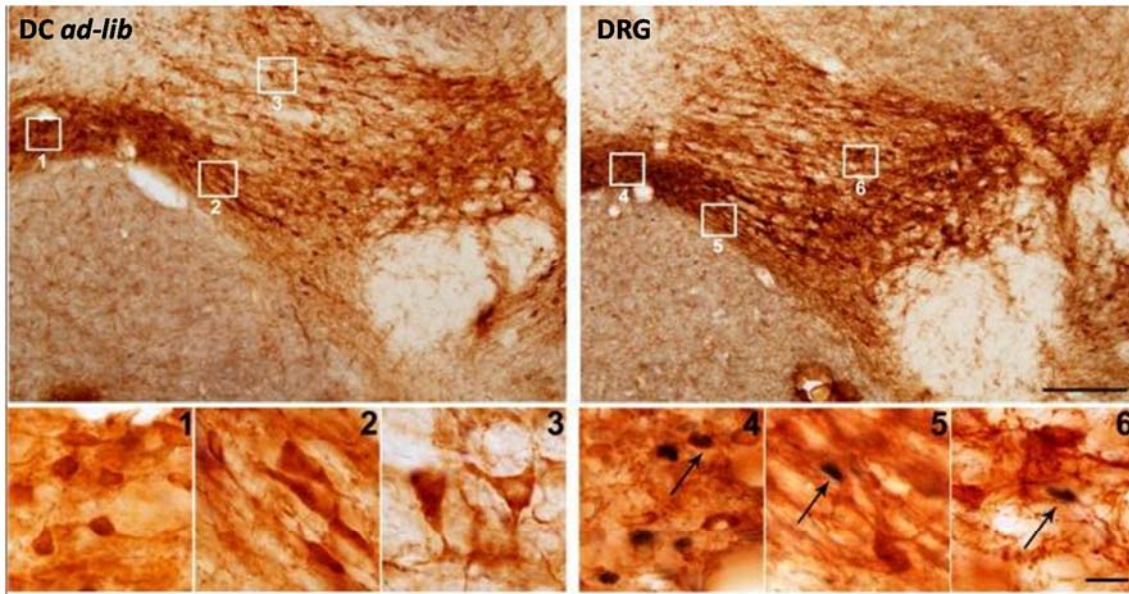


Figura 4. Un evento único de DRG activa diferencialmente las neuronas dopaminérgicas de las tres subregiones del AVT. Los paneles muestran microfotografías de secciones cerebrales sometidas a una IHQ doble contra c-Fos (señal negro/violeta) y contra TH (señal marrón). En los paneles superiores izquierdo y derecho se muestran microfotografías representativas a baja magnificación de los grupos DC ad-lib y DRG, respectivamente. Los paneles inferiores 1-6 muestran imágenes a alta magnificación de las áreas marcadas en los paneles superiores. IF (paneles 1 y 4), PN (paneles 2 y 5), PBP (paneles 3 y 6). Las flechas indican células doblemente marcadas. Escalas: 200 μ m (baja magnificación), 20 μ m (alta magnificación).

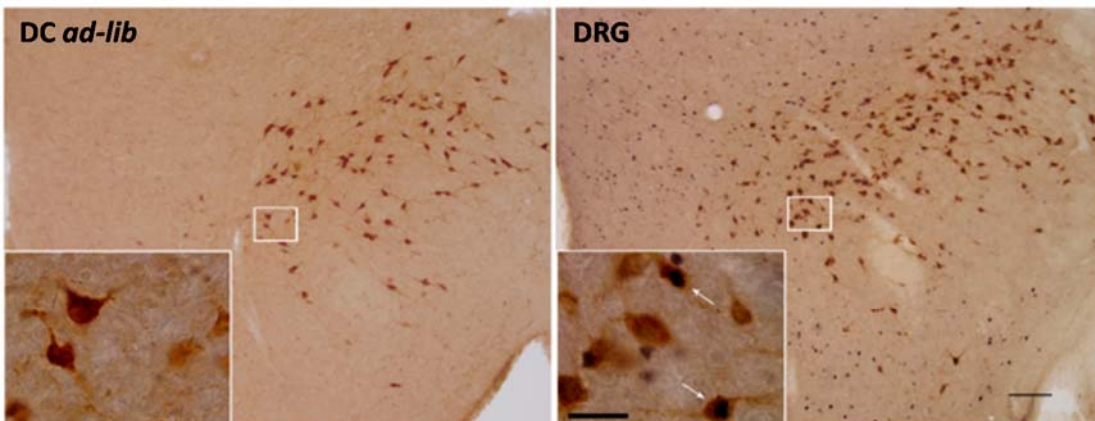


Figura 5. Un evento único de ingesta de DRG activa las neuronas productoras de orexina del HLat. Los paneles muestran microfotografías representativas de secciones cerebrales sometidas a una IHQ doble contra c-Fos (señal negro/violeta) y contra orexina (señal marrón). El panel izquierdo es representativo del grupo DC ad-lib y el derecho del grupo DRG. Los insertos muestran imágenes en alta magnificación de las áreas marcadas en la microfotografías a baja magnificación. Las flechas indican células doblemente marcadas. Escalas: 200 μ m (baja magnificación), 20 μ m (alta magnificación).

1.5 El bloqueo del receptor de orexina Ox1 disminuye la cantidad de alimento ingerido y la activación de las neuronas dopaminérgicas en el AVT inducida por un único evento de ingesta de DRG

Considerando la activación observada en el HLat, se determinó si la acción de la orexina vía el receptor Ox1 se requiere para que se produzca el consumo espontáneo de DRG y la activación de la vía mesolímbica. Para realizar esto, se administró el antagonista específico del receptor Ox1, SB-334867, a un grupo de ratones y a otro grupo, que se utilizó como control, se le inyectó el mismo volumen de vehículo. Este procedimiento se realizó 30 minutos antes de permitirles el acceso a DRG.

Como resultado se observó que el tratamiento con SB-334867 redujo significativamente la ingesta de DRG [$F(2,23) = 4,18$; $p < 0,0283$. Figura 6]. Al igual que lo hecho anteriormente y con la intención de discriminar si los posibles cambios en los niveles de c-Fos en los núcleos de la vía mesolímbica se deben a cambios en la masa de alimento ingerido o al tratamiento farmacológico, se agregó un grupo *pair-fed* al experimento al cual se trató con vehículo pero sólo se le permitió ingerir una cantidad de DRG similar a la ingerida por los animales tratados con SB-334867.

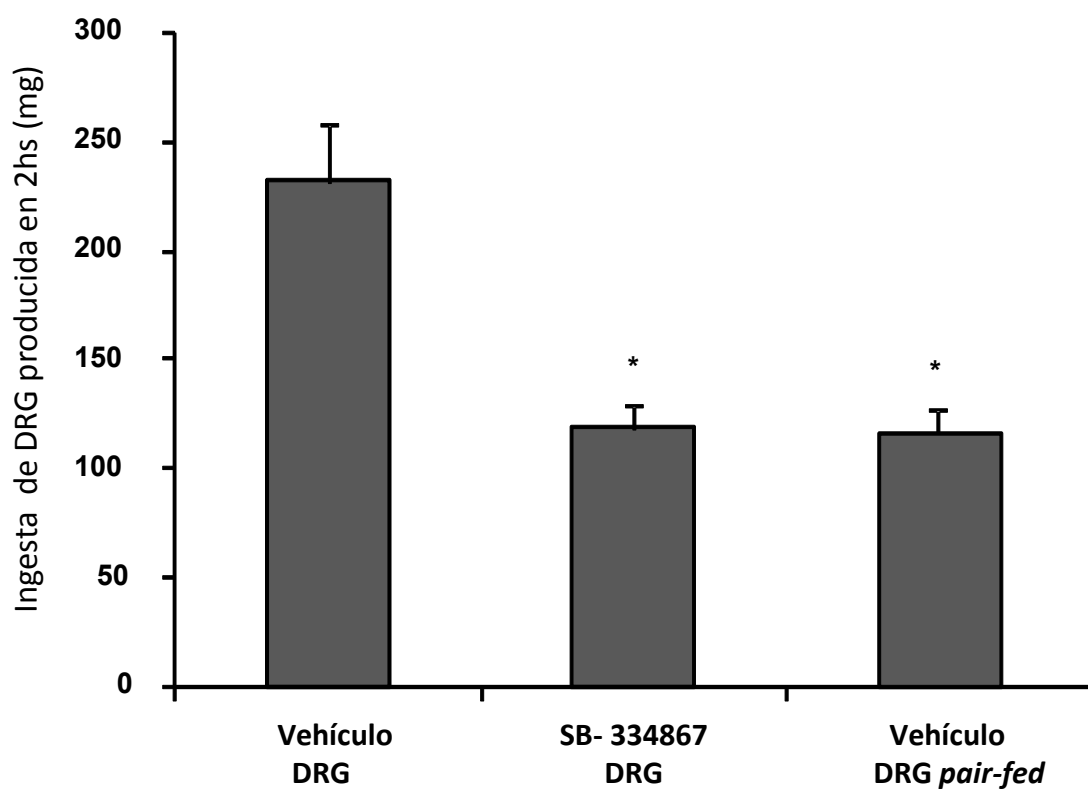


Figura 6. El bloqueo del receptor Ox1 disminuye la cantidad de alimento ingerido inducido por un único evento de ingesta de DRG. El gráfico muestra la ingesta de DRG producida durante 2hs para los grupos vehículo- DRG, SB-334867- DRG y vehículo- DRG *pair-fed*. Los valores corresponden a la media \pm SEM. *, $p < 0.05$ vs. Grupo vehículo-DRG .

Además de afectar la cantidad de DRG ingerida, el tratamiento con el antagonista del receptor Ox1 indujo cambios significativos de los niveles de c-Fos en las tres subregiones del AVT [PN: $F(2,21) = 5,868$; $p = 0,0095$; PBP: $F(2,21) = 6,230$, $p = 0,0075$; IF: $F(2,20) = 8,396$; $p = 0,0023$]. En particular en el PBP y PN (Figura 7A y B respectivamente) de los animales tratados con el antagonista SB-334867, se observó que el número de células inmunoreactivas para c-Fos fue significativamente menor que el encontrado en los grupos tratados con vehículo, DRG y DRG *pair-fed*. En el IF, la disminución significativa en el número de células positivas para c-Fos se encontró tanto en el grupo tratado con el antagonista como en el grupo *pair-fed* con respecto al grupo vehículo-DRG (Figura 7C). Por otro lado, el aumento en el número de células inmunoreactivas para c-Fos inducido por la ingesta de DRG en el caparazón del NAc, no se vio afectado ($p = 0,8923$; Figura 7D). Además, el tratamiento con el SB-334867 tampoco afectó el número de células inmunoreactivas para c-Fos en el centro del NAc, ACe e HLat inducido por la ingesta espontánea de DRG (datos no mostrados).

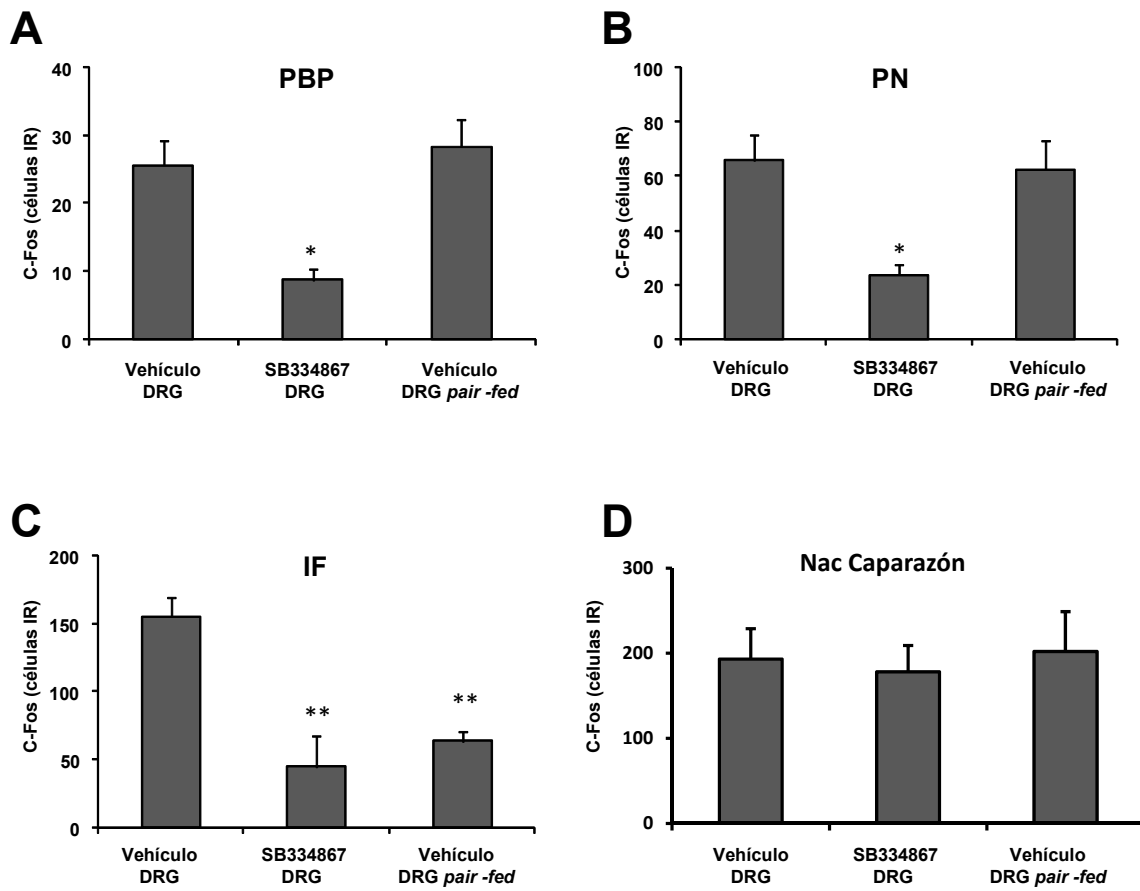


Figura 7. El bloque del receptor Ox-1 disminuye la activación de las neuronas dopaminérgicas del AVT pero no las de el caparazón del NAc. Los paneles A-D muestran el análisis cuantitativo para las subregiones del AVT; PBP (A), PN (B), IF (C) y el caparazón del NAc (D) en los tres grupos experimentales. Los histogramas representan el número total de las neuronas inmunoreactivas para c-Fos en cada núcleo. Los valores están expresados como la media±SEM. *, $p < 0,05$ vs Grupo vehículo DRG y DRG pair-fed. **, $p < 0,01$ vs. Grupo vehículo DRG.

1.6 Las neuronas productoras de orexina del HLat que se activan en respuesta a un único evento de ingesta de DRG inervan el AVT

Considerando el resultado anterior, en el cual se mostró que el bloqueo del receptor Ox1 influye en el número de células positivas para c-Fos encontradas en el AVT, se estudió la conexión entre éste núcleo y el HLat. Para esto, inicialmente, se realizó una IHQ contra orexina en secciones coronales que contenían el AVT y se cuantificaron las fibras inmunoreactivas para orexina en las tres subregiones de dicho núcleo. Como resultado se observó, que la densidad relativa de las fibras inmunoreactivas para orexina en el PN, PBP e IF fue $46,3 \pm 4,2$; $48,2 \pm 6,4$ y $43,6 \pm 2,2$ unidades de DO/campo 100x, respectivamente. Además, en cuanto a sus características anatómicas, se observó que las terminales inmunoreactivas para orexina presentaron un aspecto predominantemente varicoso en las tres subregiones del AVT (Figura 8A).

Posteriormente, con el objetivo de determinar si las vías aferentes que provienen de las neuronas productoras de orexina inervan diferencialmente a las neuronas dopaminérgicas localizadas en las distintas subregiones del AVT, se realizó una inmunohistoquímica doble contra TH y contra orexina en secciones coronales del mesencéfalo. (Figura 8B). Como resultado, se observó que las terminales de orexina se encuentran en estrecho contacto con las neuronas inmunoreactivas para TH en todas las subregiones del AVT. Por su parte, el análisis cuantitativo indicó que el número de neuronas inmunoreactivas para TH con contactos aparentes de fibras inmunoreactivas para orexina no fue diferente en las distintas subregiones del AVT. En particular, por sección coronal del PN, PBP and IF se estimaron $84,6 \pm 8,8$; $86,7 \pm 6,6$ y $95,9 \pm 8,7$ neuronas inmunoreactivas para TH con contactos aparentes de fibras inmunoreactivas para orexina, respectivamente.

Finalmente, se evaluó si las neuronas productoras de orexina que inervan el AVT se activan por un único evento de ingesta de DRG. Para esto, los ratones fueron inicialmente inyectados en el AVT, mediante cirugías estereotáxicas, con un trazador retrógrado fluorescente rojo (fluoesferas). Luego de una semana en la que el trazador es trasladado a los cuerpos neuronales que inervan el sitio de inyección, a los ratones se les ofreció un pellet de DRG durante 2 hs. Luego los ratones se anestesiaron, se perfundieron y los cerebros extraídos se acondicionaron para la realización de una IHQ doble contra c-Fos y orexina (Figura 9). En 4 de los 6 animales se observó la presencia del trazador en las tres subregiones del AVT, y dichos animales fueron utilizados para realizar un análisis anatómico-funcional. Así, en el HLat de estos animales, se observaron cuerpos neuronales conteniendo fluoesferas; algunas de estas neuronas fueron inmunoreactivas para orexina, mientras que otras fueron negativas. Las neuronas doblemente marcadas con fluoesferas y para orexina se distribuyeron a través de todo el HLat y representaron el $18,4 \pm 2,1$ % de todas las células inmunoreactivas para orexina. Sumado a esto, el análisis cuantitativo indicó que el $93,2 \pm 2,9$ % de estas neuronas doblemente marcadas fueron también positivas para c-Fos.

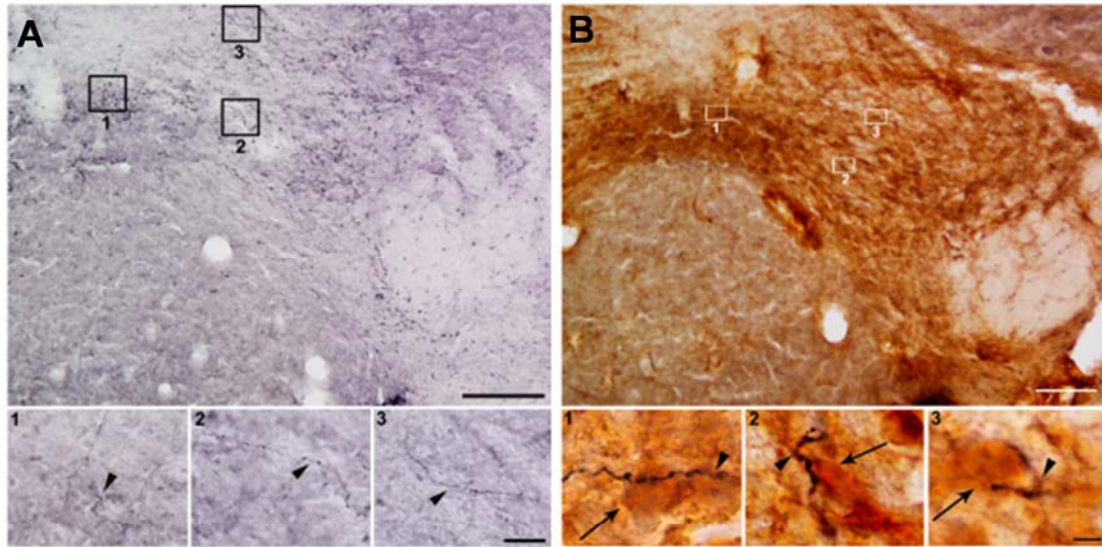


Figura 8. Las neuronas productoras de orexina inervan las tres subregiones del AVT. Los paneles muestran microfotografías a baja magnificación de secciones cerebrales del AVT sometidas a una IHQ contra orexina (señal negro/violeta, panel A) y a una IHQ doble contra orexina y contra TH (señal marrón, panel B). Los paneles inferiores muestran microfotografías a alta magnificación del IF (paneles 1), PN (paneles 2) y PBP (paneles 3). Las cabezas de flecha indican fibras inmuno-reactivas para orexina y las flechas indican las neuronas inmunoreactivas para TH en contacto con fibras inmunoreactivas para orexina. Escalas: 200 μm (baja magnificación), 20 μm (alta magnificación). 1, 2 y 3 del panel A) y 5 μm (alta magnificación . 1, 2 y 3 del panel B).

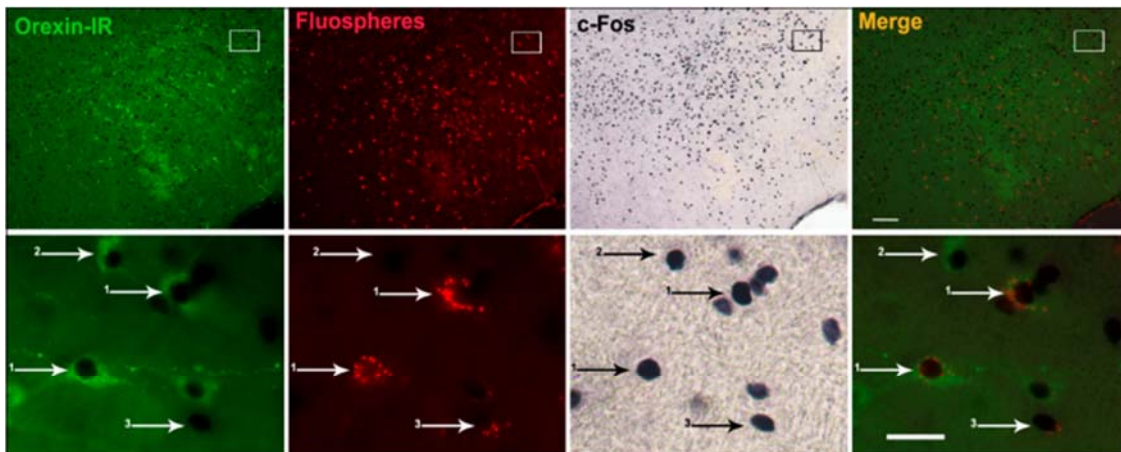


Figura 9. Las neuronas productoras de orexina del HLat que se activan en respuesta a un único evento de ingesta de DRG inervan el AVT. Los paneles superiores muestran microfotografías a baja magnificación de secciones coronales del HLat de ratones inyectados estereotóxicamente con fluoesferas en el AVT y a los que posteriormente se les dio acceso a DRG. La columna derecha muestra la superposición de la señal verde fluorescente (neuronas inmunoreactivas para orexina), señal roja fluorescente (neuronas que contienen fluoesferas) y señal negro/violeta (neuronas inmunoreactivas para c-Fos). Los paneles inferiores muestran microfotografías a alta magnificación de las áreas marcadas en las imágenes superiores. Las flechas numeradas indican: neuronas triplemente marcadas (1), neuronas inmunoreactivas para c-Fos, inmunoreactivas para orexina y negativas para fluoesferas (2), neuronas inmunoreactivas para c-Fos, inmunoreactivas para orexina y negativas para fluoesferas (3). Escala: 50 μm (paneles superiores), 20 μm (paneles inferiores).

1.7 La administración intra-gástrica de DRG no activa las neuronas de la vía mesolímbica

Con el objetivo de determinar si la activación de las neuronas de la vía mesolímbica es consecuencia de la estimulación sensorial producida por las cualidades gustativas de la DRG, a grupos independientes de ratones se les administró intra-gástricamente una pasta de DRG o DC. Se observó para el grupo de ratones a los que se les administró DRG, que el número de células inmunoreactivas para c-Fos no fue significativamente diferente del grupo al que se le administró DC en los núcleos de la vía ni tampoco en el HLat. Específicamente, el número de células inmunoreactivas para c-Fos en el grupo al que se le administró DRG y en el grupo al que se le administró DC respectivamente fueron: en el IF $40,1 \pm 10,1$ y $51,2 \pm 14,4$; en el caparazón del NAc $10,6 \pm 3,4$ y $7,2 \pm 1,4$; en la ACe $9,3 \pm 2,2$ y $11,1 \pm 2$ y en el HLat $10,8 \pm 4,1$ y $13,2 \pm 2,7$.

1.8 La administración periférica de ghrelina o la ausencia de expresión de GHSR1a no afecta la cantidad de DRG ingerida ni la activación de la vía mesolímbica inducida por un único evento de ingesta de dicha dieta

Debido a la implicancia que tiene la hormona ghrelina en la ingesta homeostática de alimento y a las evidencias que la involucran en la regulación hedónica de la alimentación se determinó si la vía de señalización de ghrelina afecta la ingesta de DRG durante un único evento para lo que se utilizaron dos estrategias:

- Administración subcutánea de ghrelina ($0,2 \mu\text{g}/\text{gr}$ de peso corporal) o vehículo, a grupos independientes de ratones; a los cuales inmediatamente luego de este tratamiento, se les dio acceso a DC o DRG por 2 hs. Este protocolo de administración de ghrelina causa un aumento agudo en su concentración plasmática, similar en magnitud al observado luego de un ayuno nocturno (Cabral et al., 2014).

- Utilización de ratones deficientes de GHSR1a, a los que se les ofreció DC o DRG durante 2 hs.

Como se puede observar en la Figura 10, se encontró un efecto significativo de la dieta [$F(1,82) = 14,66$; $p = 0,0003$] y una interacción significativa entre la dieta y la condición experimental (WT-vehículo, WT-ghrelina y deficiente del receptor de GHSR1a) sobre la ingesta calórica [$F(2,82) = 4,01$; $p = 0,0219$]. Así, los animales WT y los animales deficientes de GHSR consumieron significativamente más DRG que DC. Para los animales tratados con ghrelina no se observaron diferencias significativas entre las calorías consumidas de DRG y DC. Por otro lado, se observó una diferencia significativa considerando únicamente el consumo de DC en las tres condiciones experimentales [$F(2,28) = 5,36$; $p = 0,0107$]. Los animales tratados con ghrelina y acceso a DC tuvieron una ingesta calórica significativamente mayor que los ratones WT y deficientes de GHSR1a que también consumieron DC. Por otro lado no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la cantidad de calorías consumidas provenientes de la DRG en los ratones WT tratados con vehículo, ratones WT tratados con ghrelina y ratones deficientes de GHSR1a

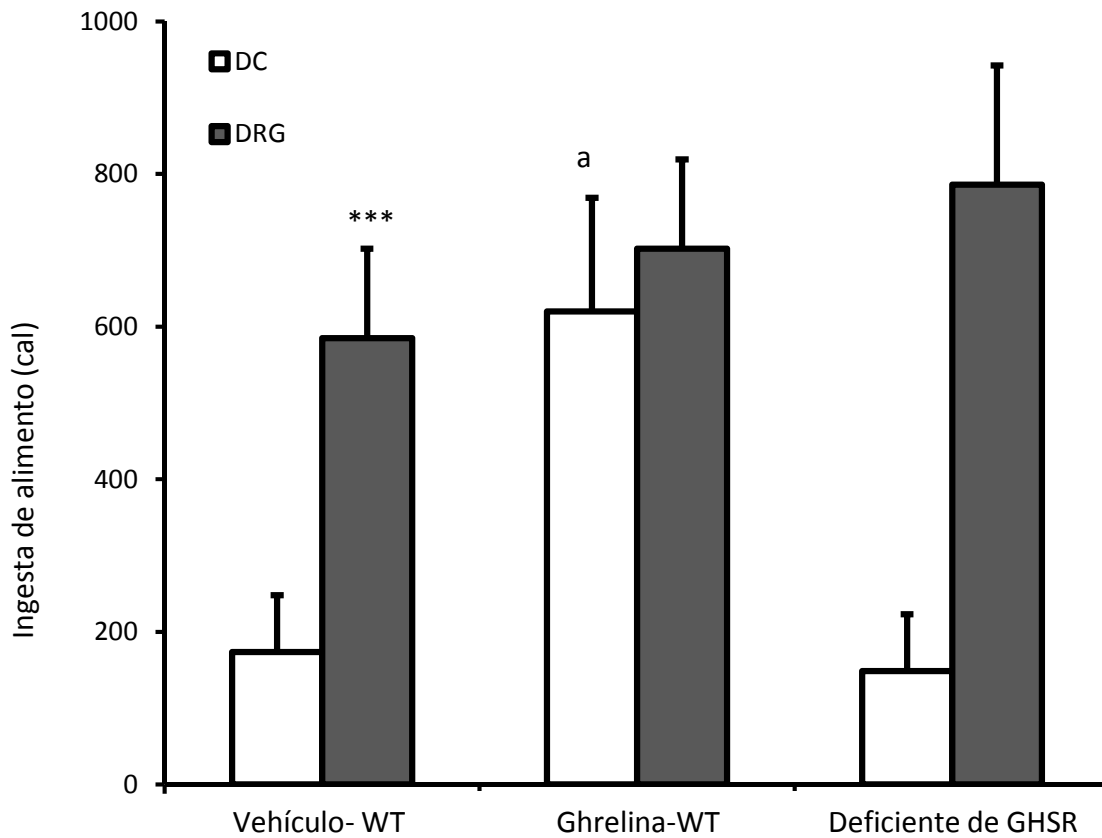


Figura 10. La administración periférica de ghrelina o la ausencia de expresión de GHSR no afecta la cantidad de DRG ingerida durante un único evento de ingesta. El gráfico muestra la ingesta de alimento durante 2 hs para los animales WT inyectados con vehículo o con ghrelina y los animales deficientes de GHSR. Los valores están expresados como la media \pm SEM. **, $p < 0,001$ vs deficiente de GHSR1a DC. ***, $p < 0,0001$ vs vehículo- WT DC. a, $p < 0,05$ vs DC-WT y DC-deficiente de GHSR1a

Con el objetivo de determinar si los núcleos de la vía mesolímbica y el HLat se activaron en las dos estrategias utilizadas, los ratones de todos los grupos analizados se perfundieron y sus cerebros se procesaron para la realización una inmunohistoquímica contra c-Fos. Los resultados obtenidos del análisis cuantitativo se encuentran diagramados en las Figuras 11A-D.

Para todos los núcleos analizados (NAc, ACe e HLat) no se observó interacción significativa entre la dieta y la condición experimental mientras que si hubo un efecto significativo de la dieta en la ingesta calórica [Centro del NAc: $F(1,34)= 59,82$; $p < 0,0001$ (Figura 11A); Caparazón del NAc: $F(1,34)= 31,92$; $p < 0,0001$ (Figura 11B); ACe: $F(1,22)= 192,5$; $p < 0,0001$ (Figura 11C) e HLat: $F(1,22)= 82,84$; $p < 0,0001$ (Figura 11D)], encontrándose en todos los núcleos y condiciones experimentales valores de c-Fos significativamente mayores en los ratones que consumieron DRG. Sin embargo comparando únicamente el número de células inmunoreactivas para c-Fos en los animales que consumieron DRG, no se observaron diferencias significativas entre los animales WT tratados con vehículo o ghrelina subcutánea y los animales deficientes de GHSR1a.

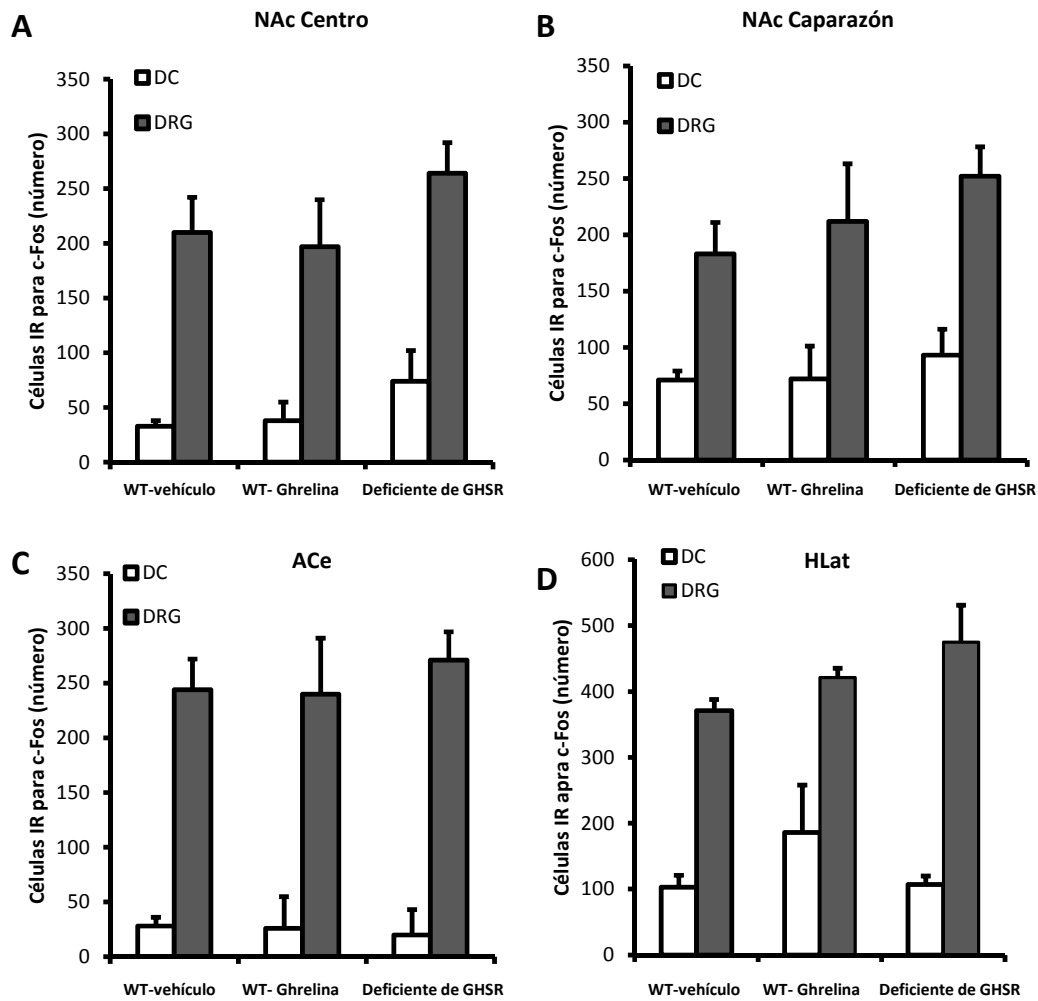


Figura 11. La administración periférica de ghrelina o la ausencia de expresión de GHSR no afecta la activación de la vía mesolímbica y el HLat inducida por un único evento de ingesta de DRG. Los paneles A-D muestran el número de células inmunoreactivas para c-Fos en el centro del NAc (A), el caparazón del Nac (B), la Ace (C) y el HLat (D) en los animales WT tratados con vehículo o ghrelina y en los animales deficientes de GHSR. Los valores están expresados como la media±SEM. *, p<0,05 vs DC misma condición. **, p<0,001 vs DC misma condición. ***, p<0,0001 vs DC misma condición.

Por último, para determinar si las neuronas dopaminérgicas del AVT se activaron en los ratones tratados con ghrelina subcutánea o en los ratones deficientes del receptor GHSR1a se realizó además una inmunohistoquímica doble contra c-Fos y contra TH y se cuantificaron las neuronas inmunoreactivas para TH y para c-Fos (Figura 12). En ninguna de las tres subregiones del AVT se observó interacción significativa entre la dieta y la condición experimental mientras que si hubo un efecto significativo de la dieta en la ingesta calórica [IF: $F(1,36) = 49,17$; $p < 0,0001$ (Figura 12A); PN: $F(1,36) = 26,99$; $p < 0,0001$ (Figura 12B) y PBP: $F(1,29) = 30,63$; $p < 0,0001$ (Figura 12C)]. Así, para el IF el número de células doblemente marcadas fue significativamente mayor en los animales que consumieron DRG con respecto a los que consumieron DC, en los tres grupos experimentales. Para el PN y PBP el número de células inmunoreactivas para TH y positivas para c-Fos también fue mayor en los animales que consumieron DRG con respecto a los que consumieron DC aunque éste, fue estadísticamente significativo en los ratones WT tratados con vehículo o ghrelina mientras que no lo fue en los ratones deficientes de GHSR1a

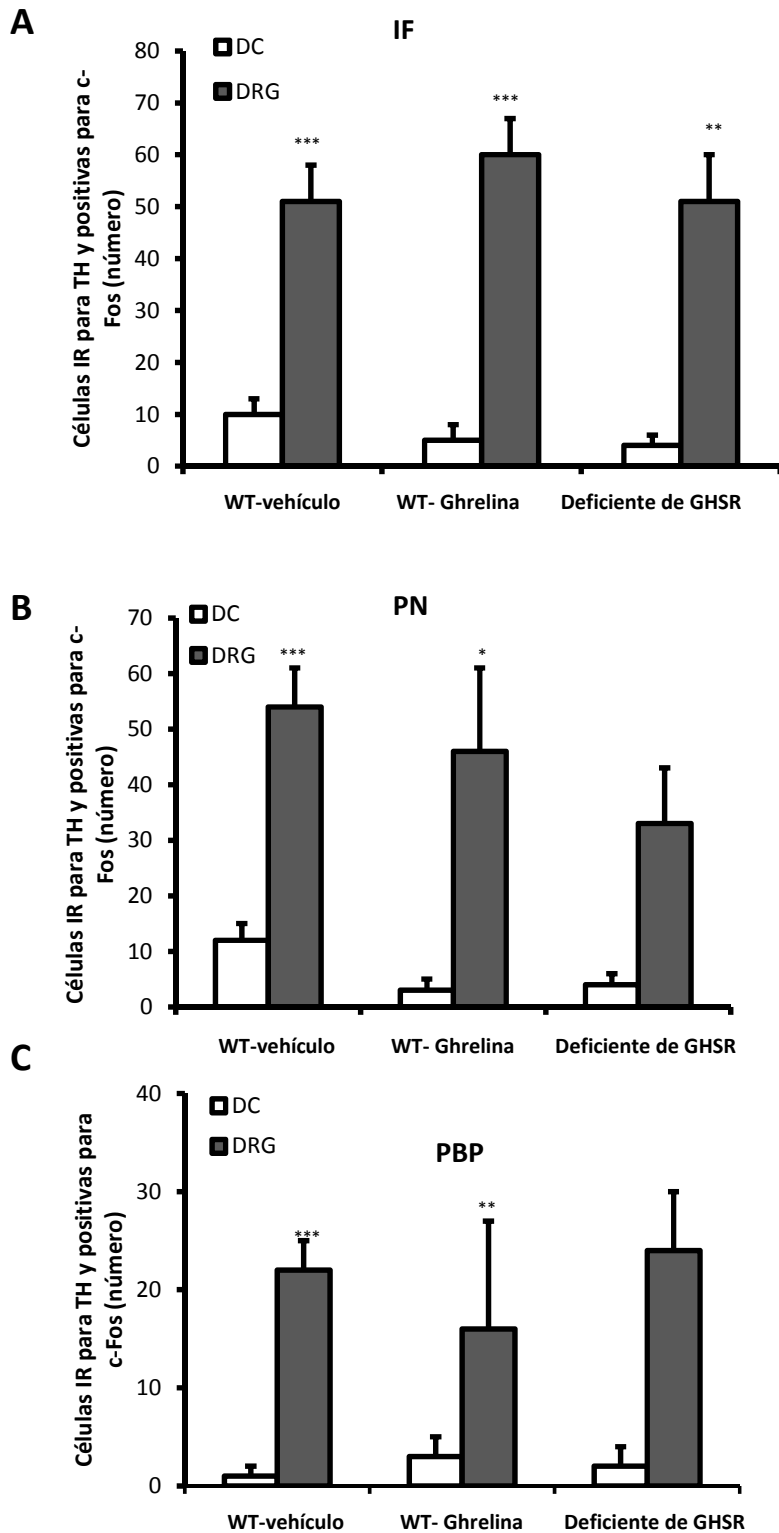


Figura 12. La administración periférica de ghrelina o la ausencia de expresión de GHSR no afecta la activación de las subregiones del AVT inducida por un único evento de ingesta de DRG. Los paneles A,B y C muestran el número de células inmuno-reactivas para TH y positivas para c-Fos en las tres subregiones del AVT (PBP, PN e IF respectivamente) en los animales WT tratados con vehículo o ghrelina y en los animales deficientes de GHSR. Los valores están expresados como la media±SEM. *, p<0,05 vs DC misma condición. **, p<0,001 vs DC misma condición. ***, p<0,0001 vs DC misma condición

2. ESTUDIO DE LOS CIRCUITOS NEURONALES INVOLUCRADOS Y DEL ROL DE GHRELINA EN EL CONTROL DE MÚLTIPLES EVENTOS DE INGESTA DE DRG

2.1 El acceso diario a DRG en ratones lleva a eventos de hiperfagia con un perfil ascendente

Una vez caracterizados algunos aspectos del circuito neuronal activado por un único evento de ingesta de DRG, se estudió que ocurre si los eventos de ingesta de DRG se repetían de forma diaria. Para esto se utilizó un protocolo de cuatro días en el cual los animales tuvieron acceso diario a DRG por 2 horas. Las condiciones experimentales estudiadas fueron:

- DC *ad-lib*: ratones con acceso a DC durante 2 hs cada día, y con acceso constante a DC.
- DRG *ad-lib*: ratones con acceso a DRG durante 2 hs cada día, y con acceso constante a DRG.
- DRG diario: ratones con acceso a DRG durante 2 hs cada día, y con acceso constante a DC.

Como se muestra en la Figura 13, el grupo DC *ad-lib* consumió cantidades similares de alimento a través de los días durante las 2 hs de acceso al pellet de DC [F (3,52)= 0,06; p= 0,9799]. Los ratones con acceso a un pellet de DRG por 2 hs consumieron una mayor cantidad de alimento el primer día de acceso a la dieta, en comparación con lo consumido por el grupo DC *ad-lib* [F (2,47)= 9,34; p= 0,0004]. En los días sucesivos, para el grupo DRG *ad-lib* no se observaron cambios en la ingesta durante las 2 hs de acceso al pellet de DRG con respecto a lo que habían consumido el primer día experimental [F (3,28)=0,67; p=0,5749]. Mientras que para los ratones con acceso a DRG únicamente durante 2 hs diarias se observó un perfil ascendente en el consumo de dicha dieta a través de los 4 días del experimento [F (3,108)= 19,74; p< 0,0001]. Con respecto a la ingesta de DC posterior al evento de ingesta de alimento de 2 hs, no se observaron diferencias significativas en el consumo para los animales del grupo DC *ad-lib* [F (2,30)= 0,10; p= 0,9068], específicamente consumieron $9,27 \pm 0,31$, $8,56 \pm 0,55$ and $9,17 \pm 0,31$ kcal de DC. Para el grupo con acceso diario a DRG, el consumo de DC en la 22 hs posteriores al evento de ingesta de DRG no se vio afectado a través de los días [F (2,69)= 1,40; p= 0,2537]. Las kcal consumidas

fueron $8,68 \pm 0,30$, $8,49 \pm 0,49$ y $8,53 \pm 0,43$. Para todos los grupos experimentales, no se observaron cambios significativos en el peso corporal durante el experimento (datos no mostrados).

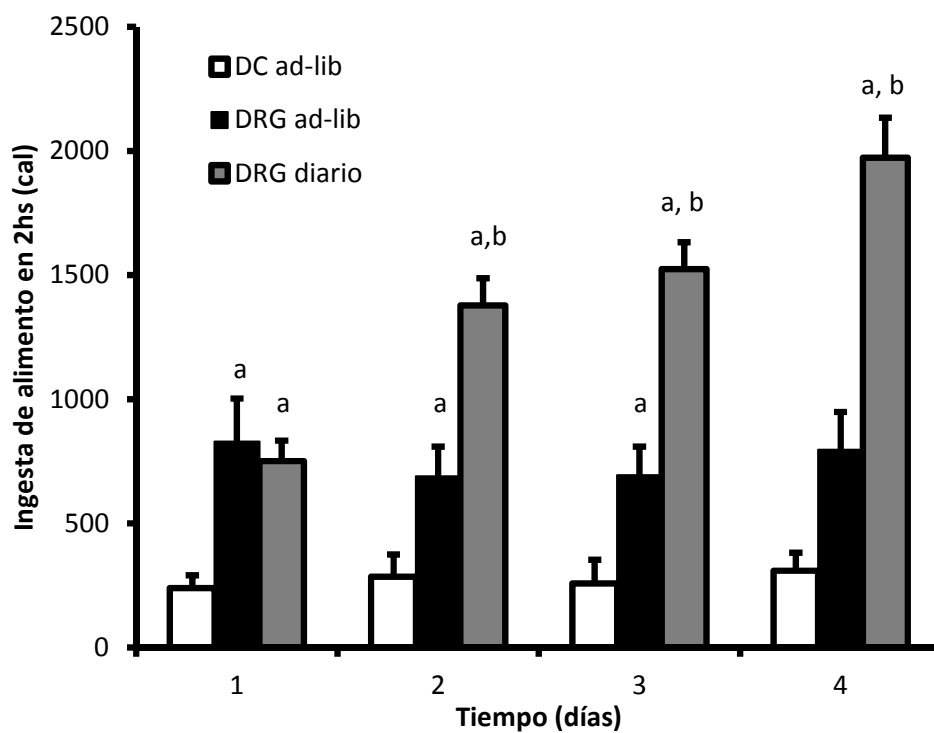


Figura 13. El acceso diario a DRG en ratones lleva a eventos de hiperfagia con un perfil ascendente . El gráfico muestra la ingesta producida en 2hs durante 4 días consecutivos para 3 grupos experimentales , DC *ad-lib*, DRG *ad-lib* y DRG diario. Los valores están expresados como la media±SEM. a, $p < 0,05$ vs. grupo DC *ad-lib* el mismo día. b, $p < 0,05$ vs. el mismo grupo el día 1.

2.2 La actividad locomotora anticipatoria no se vio afectada por eventos diarios de ingesta de DRG

Ya que se ha demostrado anteriormente que la actividad anticipatoria a la ingesta de alimento aumenta en animales expuestos a dietas apetecible siguiendo esquemas de alimentación específicos (Blum et al., 2009, Bake et al., 2014), se cuantificó la velocidad promedio 30 minutos antes de cada uno de los eventos de alimentación con DRG, de manera de mejorar la caracterización comportamental de los ratones ante el mencionado diseño experimental. Como resultado, para este diseño experimental, no se observaron cambios en la velocidad promedio durante los cuatro días de acceso consecutivo a DRG ($p > 0,05$). Los valores de velocidad fueron los siguientes: 123 ± 8 cm/min, 111 ± 14 cm/min, 140 ± 22 y 121 ± 17 cm/min los días 1, 2, 3 y 4, respectivamente. De la misma forma, la distancia total recorrida 30 minutos antes del evento de ingesta de DRG no presentó cambios significativos durante el experimento [$F(3,11) = 0,40$; $p = 0,7567$; día 1: $35,9 \pm 4,8$ metros, día 2: $34,6 \pm 4,6$ metros, día 3: $42,9 \pm 6,0$ metros y día 4: $36,8 \pm 5,3$ metros]. Es importante mencionar, que se confirmó que la actividad locomotora anticipatoria aumentó en ratones con restricción calórica y acceso diario a DRG, como ya se ha demostrado previamente (Le Merrer and Stephens, 2006). El primer día para los ratones con restricción calórica, la distancia total recorrida en anticipación al evento de ingesta fue $28,1 \pm 2,6$ metros, la cual no cambió significativamente durante los cuatro días del experimento [$F(3,11) = 0,54$; $p = 0,6634$]. Los valores obtenidos fueron $31,4 \pm 0,9$; $30,8 \pm 3,4$ y $33,2 \pm 0,2$ metros para los días 2, 3 y 4 respectivamente. Sin embargo, la distancia total recorrida en anticipación a los eventos de ingesta de DRG aumentó significativamente los días 2, 3 y 4 [$F(3,11) = 12,87$; $p = 0,0006$] ($p < 0,01$ para todos los días vs el día 1). Los valores fueron $55,8 \pm 4,2$; $53,3 \pm 7,2$ y $52,2 \pm 3,0$ metros para los días 2, 3 y 4 respectivamente

2.3 Eventos diarios de ingesta de DRG activan neuronas de la vía mesolímbica y del HLat

Luego, se realizó un mapeo de las áreas del cerebro que se activaron en respuesta a eventos diarios de ingesta de DRG de manera de poder realizar posteriormente una comparación tanto comportamental como neuroanatómica entre ambos protocolos. Para esto, secciones coronales de cerebro provenientes de animales de los grupos antes descriptos se procesaron para realizar una inmunohistoquímica contra c-Fos.

Los ratones de los grupos DC *ad-lib* y DRG *ad-lib* se sacrificaron el cuarto día experimental luego de las 2 hs en las que tuvieron acceso a sus respectivas dietas, mientras que los ratones con acceso diario a DRG se sacrificaron a tres tiempos distintos:

- DRG /post día 1: sacrificados el primer día experimental luego del consumo de DRG.
- DRG /pre día 4: sacrificados el cuarto día experimental inmediatamente antes de que se les permitiera el acceso a DRG.
- DRG /post día 4: sacrificados el cuarto día experimental luego del consumo de DRG.

Como puede observarse en la Tabla 2 en la que se enumeran núcleos relacionados a circuitos hedónicos, la mayor densidad de células inmunoreactivas para c-Fos se observó en el grupo con acceso diario a DRG durante 4 días en los núcleos: AVT, NAc, ACe, e HLat.

Tabla 2. Densidad relativa de c-Fos observada luego de uno o múltiples eventos de ingesta de DRG en núcleos cerebrales relacionados al procesamiento hedónico ¹

	DC <i>ad-lib</i>	DRG <i>ad-lib</i>	DRG post día 1	DRG pre día 4	DRG post día 4
AVT- Paranigral	-	-	++	-	++
AVT- Parabraquial Pigmentado	-	-	+	-	++
AVT- Interfascicular	-	+	++	++	+++
NAc-Caparazón	-	-	++	+	+++
NAc-Centro	-	-	++	-	+++
Amígdala Central	-	+	++	-	++
Amígdala Basolateral	-	-	+	-	++
Ventral Pallidum	-	-	-	-	-
Hipocampo	-	-	-	-	-
Hipotálamo Lateral	-	++	++	+	+++

¹ La estimación de la densidad de las células inmunoreactivas para c-Fos se hizo considerando tanto la intensidad de la señal como el número de células marcadas. +++ , densidad elevada; ++, densidad moderada; +, densidad baja.

2.4 Eventos diarios de ingesta de DRG activan diferencialmente las neuronas dopaminérgicas del AVT

Para determinar el grado de activación de las neuronas dopaminérgicas del AVT en los distintos grupos experimentales, se realizó una inmunohistoquímica doble contra c-Fos y contra TH (Figura 14A) y posteriormente se realizó un análisis cuantitativo de las tres subregiones consideradas para el AVT. (Figura 14B-D). Para las distintas subregiones del AVT se encontraron diferencias significativas en la cantidad de neuronas inmunoreactivas para TH y positivas para c-Fos [IF: $F(4,43) = 23,27$; $p < 0,0001$; PN: $F(4,43) = 13,12$; $p < 0,0001$ y PBP: $F(4,43) = 22,16$; $p < 0,0001$]. En el IF (Figura 14B), el número de neuronas inmunoreactivas para TH y positivas para c-Fos en el grupo DRG/post día 4, fue significativamente mayor que el encontrado en los grupos DC *ad-lib* y DRG *ad-lib* e inclusive fue significativamente mayor que los niveles de c-Fos encontrados en los grupos DRG/post día 1 y pre día 4. Los valores encontrados para estos dos últimos grupos no difirieron entre sí. En el PN (Figura 14C), para los grupos DRG post/día1 y post día4 los valores de células doblemente marcadas fueron similares y a su vez significativamente mayores que los encontrados en los otros grupos experimentales. Por ultimo en el PBP (Figura 14D), el número de neuronas inmunoreactivas para TH y positivas para c-Fos fue significativamente mayor en los grupos DRG/post día 1 y post día 4 con respecto a los demás grupos, siendo los valores encontrados para el grupo DRG/post día 4 significativamente mayores que los encontrados para el grupo con un único evento de ingesta de DRG.

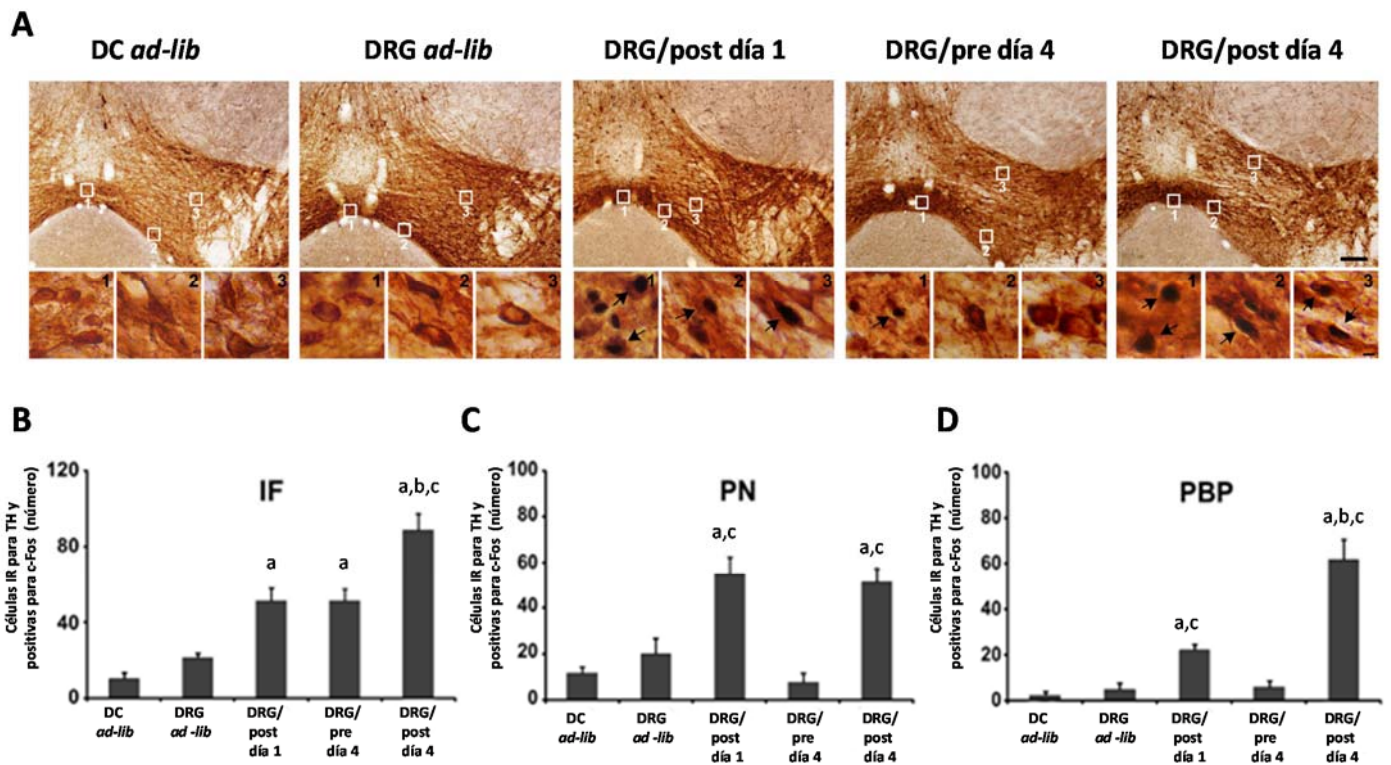


Figura 14. Eventos intermitentes de ingesta de DRG activan diferencialmente las neuronas dopaminérgicas del AVT. El panel A muestra microfotografías representativas a baja y alta magnificación de secciones cerebrales del AVT sometidas a una IHQ doble c-Fos (señal negro/violeta)/TH (señal marrón) para todos los grupos experimentales. Para cada grupo, los paneles superiores muestran imágenes a baja magnificación y los paneles inferiores muestran imágenes a alta magnificación de las áreas marcadas en las imágenes superiores. IF (paneles 1), PN (paneles 2) y PBP (paneles 3). Las flechas indican células doblemente marcadas. Escalas: 200 μ m (baja magnificación), 20 μ m (alta magnificación). Los gráficos de barras muestran el número total de células inmunoreactivas para TH y positivas para c-Fos en el IF (B), PN (C) y PBP (D) para todos los grupos experimentales. Los valores están expresados como la media \pm SEM. a, $p < 0,05$ vs grupo DC *ad-lib*. b, $p < 0,05$ vs grupo DRG/post día 1. c, $p < 0,05$ vs grupo DRG/pre día 4.

2.5 Eventos diarios de ingesta de DRG activan diferencialmente las sub-regiones del NAc

Para caracterizar mejor la activación de las subregiones del NAc inducida por eventos diarios de ingesta de DRG, se realizó un análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica contra c-Fos para este núcleo (Figura 15). Para las tres subregiones del NAc el análisis cuantitativo indicó diferencias significativas en los niveles de células inmunoreactivas para c-Fos [Caparazón medial: $F(4,37) = 11,50$; $p < 0,0001$; Caparazón lateral: $F(4,37) = 12,49$; $p < 0,0001$ y Centro: $F(4,37) = 33,04$; $p < 0,0001$]. En el Caparazón medial (Figura 15B) de los ratones con acceso diario a DRG por 4 días, el número de células inmunoreactivas para c-Fos fue significativamente mayor que el encontrado en los grupos DC *ad-lib*, DRG *ad-lib* y aunque también fue mayor que el encontrado en el grupo con un único acceso a DRG, éste no fue estadísticamente significativo. En el Caparazón lateral (Figura 15C), el número de células inmunoreactivas para c-Fos fue significativamente mayor en el grupo DRG/post día 4, con respecto a los demás. Por último, en el Centro del NAc (Figura 15D), así como en el caparazón medial, los niveles de c-Fos fueron significativamente mayores para los grupos DRG/post día1 y post día 4 con respecto a los otros grupos experimentales, aunque en este caso el aumento en el número de células inmunoreactivas para c-Fos encontrado en el grupo con 4 eventos diarios de ingesta fue significativamente mayor que el encontrado para el grupo que consumió sólo una vez DRG.

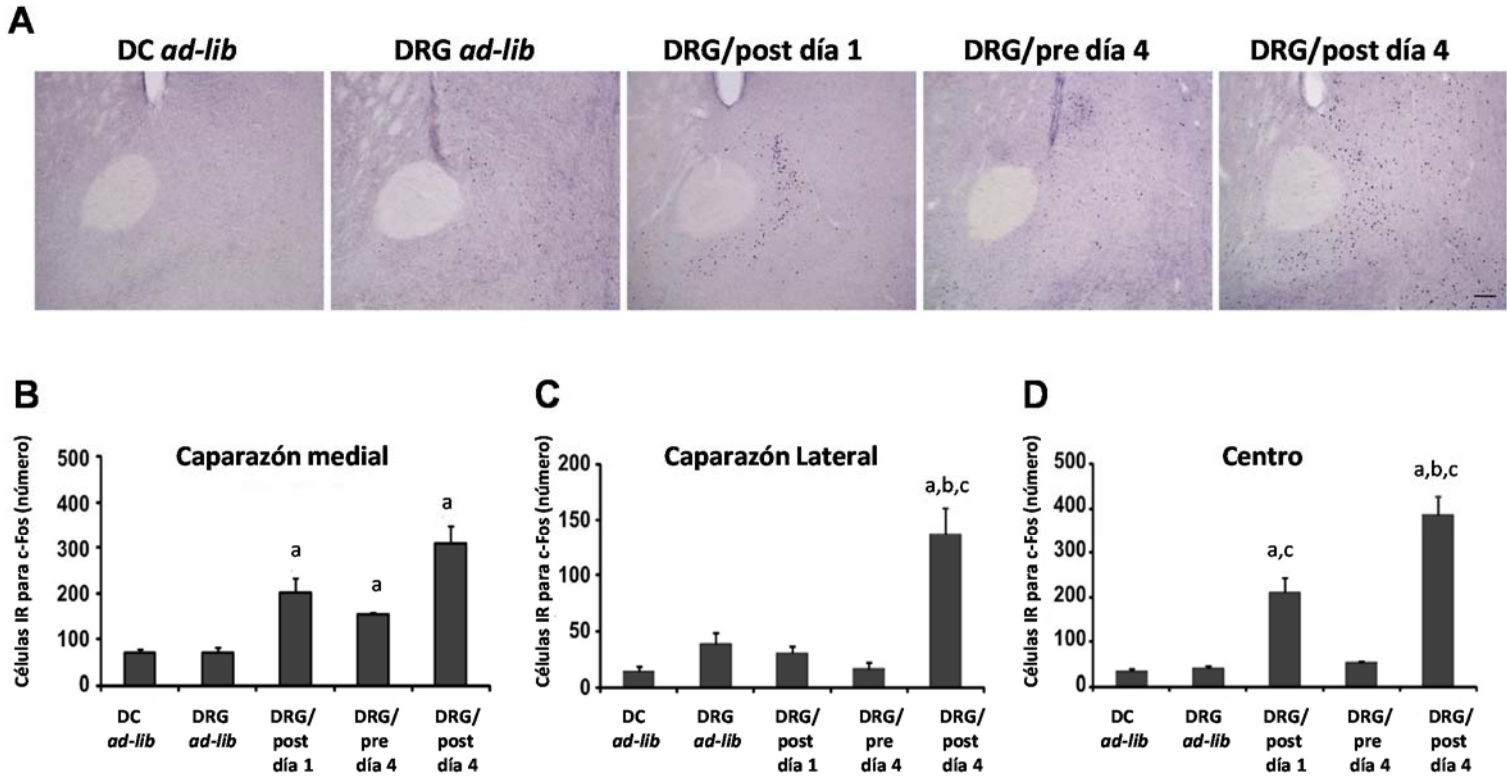


Figura 15. Eventos intermitentes de ingesta de DRG activan diferencialmente las subregiones del NAc. El panel A muestra microfotografías representativas de secciones cerebrales de la región del NAc sometidas a una IHQ contra c-Fos (señal negro/violeta) para todos los grupos experimentales. Escala: 100 μ m. Los paneles inferiores muestran el número total de células inmunoreactivas para c-Fos en el caparazón medial (B), el caparazón lateral (C) y el centro del NAc (D) para todos los grupos experimentales. Los valores están expresados como la media \pm SEM. a, $p < 0,05$ vs grupo DC *ad-lib*. b, $p < 0,05$ vs grupo DRG/post día 1. c, $p < 0,05$ vs grupo DRG/pre día 4.

2.6 Eventos diarios de ingesta de DRG activan las neuronas productoras de orexina del HLat

Para determinar si las neuronas productoras de orexina del HLat se activaron en respuesta a eventos diarios de ingesta de DRG, se realizó una inmunohistoquímica doble contra c-Fos y contra orexina (Figura 16A). Luego se realizó un análisis cuantitativo de las células inmunoreactivas para c-Fos y de las células doblemente marcadas el cual arrojó diferencias significativas para ambos recuentos [$F(4,22) = 24,02$; $p < 0,0001$ y $F(4,22) = 10,44$; $p < 0,0001$ respectivamente]. El número de células inmunoreactivas para c-Fos fue significativamente mayor en los grupos DRG/post día 1 y post día 4 en comparación con los valores encontrados en los demás grupos experimentales, siendo el grupo con 4 eventos diarios de ingesta de DRG el que presentó un número significativamente mayor con respecto al grupo DRG/post día 1 (Figura 16B). Del análisis cuantitativo de las células inmunoreactivas para orexina y positivas para c-Fos se observó que nuevamente los grupos con 1 acceso y con 4 accesos diarios presentaron los mayores niveles de células doblemente marcadas con respecto a los otros grupos (Figura 16C). Por otro lado, la distribución de estas células no tuvo ninguna distribución particular dentro del HLat.

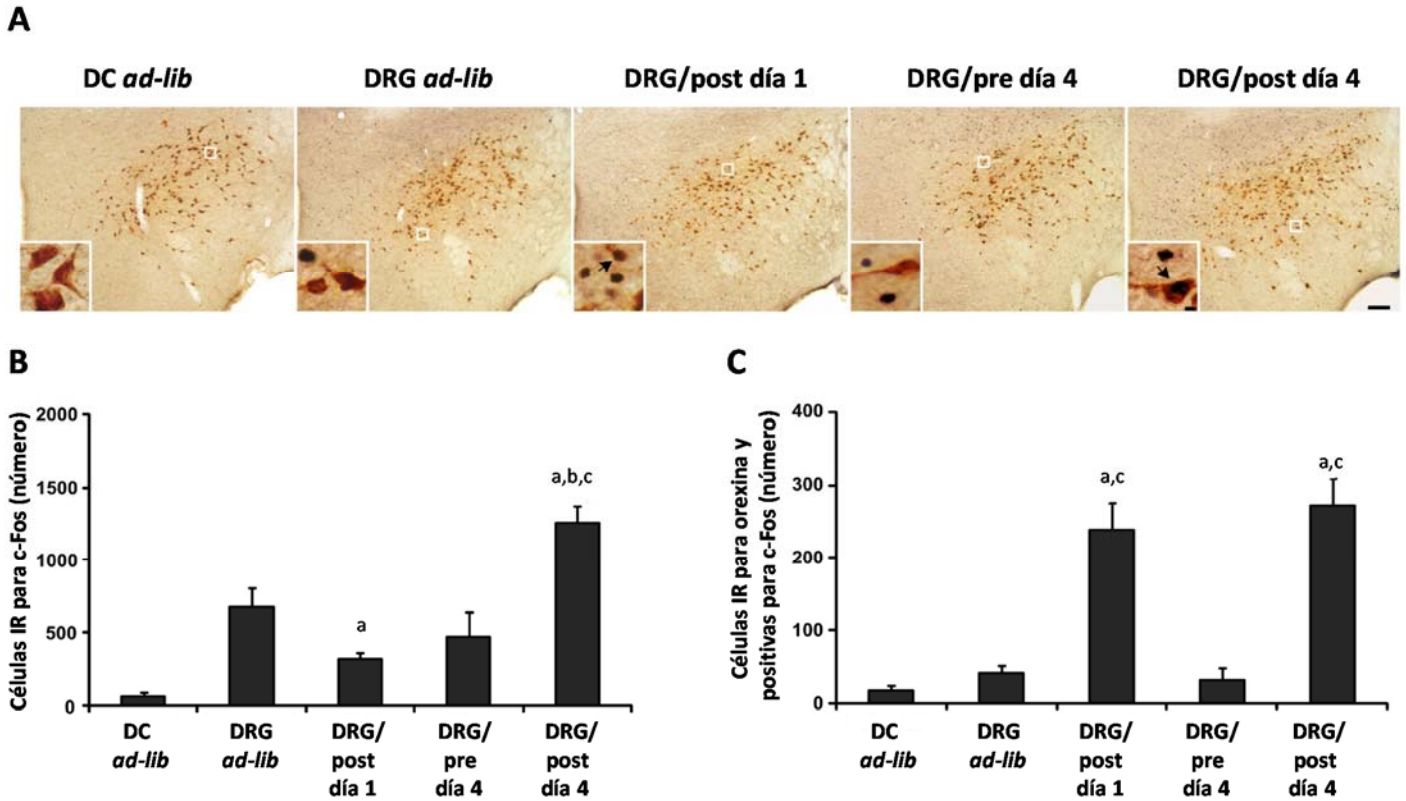


Figure 16. Eventos intermitentes de ingesta de DRG activan las neuronas productoras de orexina del HLat. El panel A muestra microfotografías representativas de secciones cerebrales del HLat sometidas a una IHQ doble c-Fos (señal negro/violeta)/orexina (señal marrón) para todos los grupos experimentales. Los insertos muestran áreas a alta magnificación marcadas en las imágenes a baja magnificación. Las flechas indican células doblemente marcadas. Escalas: 200 μm (baja magnificación), 20 μm (alta magnificación). Los paneles inferiores muestran el número total de neuronas inmunoreactivas para c-Fos (B) y neuronas inmunoreactivas para orexina y positivas para c-Fos (C) para todos los grupos experimentales. Los valores están expresados como la media \pm SEM. a, $p < 0,05$ vs grupo DC *ad-lib*. b, $p < 0,05$ vs grupo DRG/post día 1. c, $p < 0,05$ vs grupo DRG/pre día 4.

2.7 El bloqueo del receptor de orexina Ox1 no afecta el escalamiento en el consumo de DRG, ni la activación de la vía mesolímbica inducida por eventos diarios de ingesta de dicha dieta

Continuando con la misma línea de análisis realizada para la ingesta de DRG durante un único evento, se estudió si la acción de orexina, vía el receptor Ox1, se requiere para que ocurra el incremento progresivo en el consumo de DRG. Para esto, se administró a un grupo de ratones el antagonista de Ox1, SB-334867, y al otro vehículo media hora antes de permitirles ingerir un pellet de dicha dieta durante los cuatro días consecutivos que duró el experimento. Posteriormente, los ratones se perfundieron, y los cerebros extraídos se acondicionaron para la realización de una inmunohistoquímica contra c-Fos y contra c-Fos y TH en secciones cerebrales que contenían el NAc y el AVT respectivamente, para terminar con un análisis cuantitativo de dichas tinciones. Como resultado se observó que los animales tratados con antagonista o con vehículo desarrollaron un perfil de consumo de DRG ascendente a través de los días [F (3,28)= 12,64; $p < 0,0001$ y F (3,36)= 7,06; $p = 0,0007$ respectivamente]. Como ya se mostró antes, el tratamiento con SB-334867 disminuyó significativamente la ingesta de DRG el primer día del experimento [t (16)= 3,46; $p = 0,0032$]. Sin embargo no afectó en forma significativa el incremento progresivo en la cantidad de DRG consumida durante los días posteriores del experimento, de forma que tanto el grupo tratado con SB-334867 como en el tratado con vehículo, presentaron un perfil ascendente en la ingesta de DRG los días 2,3 y 4 (Figura 17A). En la Figura 17B se muestra la ingesta de DC en las 22 hs restantes luego del acceso a DRG, la cual no se vio afectada durante el experimento en ambos grupos. El análisis cuantitativo realizado de la inmunohistoquímica contra c-Fos y TH no mostró para ninguna de las tres subregiones del AVT diferencias significativas en el número de neuronas doblemente marcadas [IF: t(5)= 0,44; $p = 0,6810$ (Figura 17C); PN: t(5)= 0,66; $p = 0,5376$ (Figura 17D) y PBP: t(5)= 0,22; $p = 0,8343$ (Figura 17E)] así como tampoco lo hizo para el NAc en el número de células inmunoreactivas para c-Fos

[caparazón medial: $t(5)= 0,86$; $p= 0,4266$ (Figura 17F); caparazón lateral: $t(4)=0,31$; $p=0,7733$ (Figura 17G) y centro: $t(6)=0,74$; $p=0,4872$ (Figura 17H)]

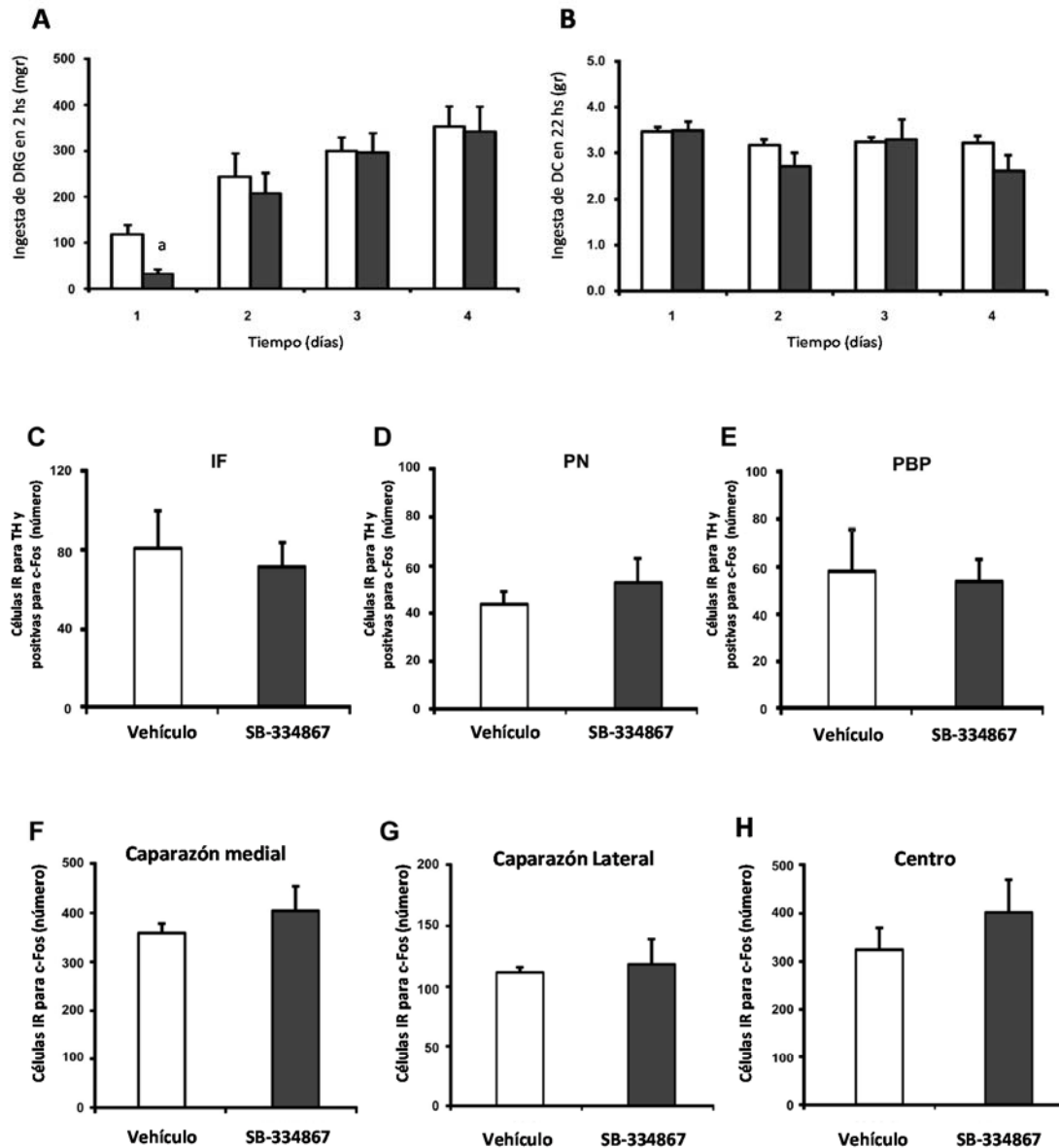


Figure 17. El bloqueo del receptor de orexina Ox1 no afecta el escalamiento en el consumo de DRG, ni la activación de la vía mesolímbica inducida por eventos intermitentes de ingesta de dicha dieta. Los paneles A y B muestran el consumo durante las 2 hs de acceso diario a DRG y el consumo de DC las 22 hs restantes del día, respectivamente, para los animales tratados con vehículo o SB-334867. Los paneles C-E muestran el número total de células inmunoreactivas para TH y positivas para c-Fos en el IF (C), PN (D) y PBP (E), mientras que los paneles F-H muestran el número total de células inmunoreactivas para c-Fos en el caparazón medial (F), caparazón lateral (G) y centro del NAc (H). Los valores se expresan como la media \pm SEM. a, $p < 0,05$ vs grupo tratado con vehículo el mismo día.

2.8 La expresión de GHSR1a es necesaria para el desarrollo del perfil ascendente en el consumo de alimento y la activación de la vía mesolímbica inducida por eventos diarios de ingesta de DRG

Teniendo en cuenta la relevancia que tiene la ghrelina en la ingesta de alimento se estudió si ésta tiene algún rol en el desarrollo del escalamiento en el consumo de DRG de este modelo experimental. Para realizar esto, se utilizaron ratones deficientes de GHSR1a y a sus hermanos salvajes a los que se les permitió ingerir cada mañana un pellet de DRG por 2 hs durante cuatro días, al igual que lo descrito anteriormente. El cuarto día y luego de ofrecerles acceso a DRG, los animales se perfundieron y sus cerebros se procesaron para la realización de una inmunohistoquímica simple contra c-Fos y dos dobles: una contra c-Fos y TH y la otra contra c-Fos y orexina. Finalmente, se realizó un análisis cuantitativo de las tinciones realizadas.

A diferencia de lo observado para los ratones WT, en los ratones deficientes de GHSR1a no se observó el perfil ascendente en el consumo de DRG a través de los días [F (3,48)= 0,02; p= 0,9948 (Figura 18A)]. Por otro lado, al igual que en los ratones WT, la ingesta de DC en las 22 hs posteriores a los eventos de acceso a DRG permaneció inalterada (Figura 18B).

En el análisis cuantitativo realizado del AVT, se observó que los ratones deficientes de GHSR1a presentaron un descenso significativo en el número de células inmunoreactivas para TH y positivas para c-Fos en las tres subregiones [IF: t (16)= 4,77; p= 0,0002 (Figura 18C); PN: t (16)= 3,38; p= 0,0038 (Figura 18D) y PBP: t (15)= 4,29; p= 0,0006 (Figura 18E)]. Sin embargo, no se observaron diferencias en el número total de neuronas inmunoreactivas para TH entre ratones WT y deficientes de GHSR1a para el IF [t (16)=0,12; p=0,9075], PN ([t (16)=0,16; p=0,8724] y PBP [t (14)=1,21; p=0,2454]. En particular, se encontraron en los animales WT 446 ± 18 , 693 ± 36 y 1241 ± 143 neuronas inmunoreactivas para TH en el IF, PN y PBP, respectivamente. Mientras

que para los animales deficientes de GHSR1a se encontraron 442 ± 18 , 701 ± 21 , 1430 ± 61 neuronas inmunoreactivas para TH en el IF, PN y PBP respectivamente.

En las tres subregiones del NAc, el número de células inmunoreactivas para c-Fos de los animales deficientes de GHSR1a luego de 4 eventos diarios de ingesta de DRG fue significativamente menor que los niveles de c-Fos encontrados en los animales WT [Caparazón medial: $t(14)= 2,73$; $p= 0,0164$ (Figura 18F); Caparazón lateral: $t(14)= 3,22$; $p= 0,0062$ (Figura 18G) y Centro: $t(14)= 3,43$; $p= 0,0041$ (Figura 18H)].

Po último en el HLat, el número de neuronas inmunoreactivas para orexina y positivas para c-Fos en los ratones deficientes de GHSR1a fue significativamente menor que el encontrado en los ratones WT luego de 4 eventos de consumo de DRG [76 ± 9 y 272 ± 39 , neuronas doblemente marcadas, respectivamente; $t(10)= 4,70$; $p= 0,0008$]. Sin embargo, el número total de neuronas inmunoreactivas para orexina no difirió significativamente entre ratones WT y deficientes de GHSR1a [1668 ± 77 vs 1827 ± 136 , respectivamente; $t(15)= 1,11$; $p= 0,2838$].

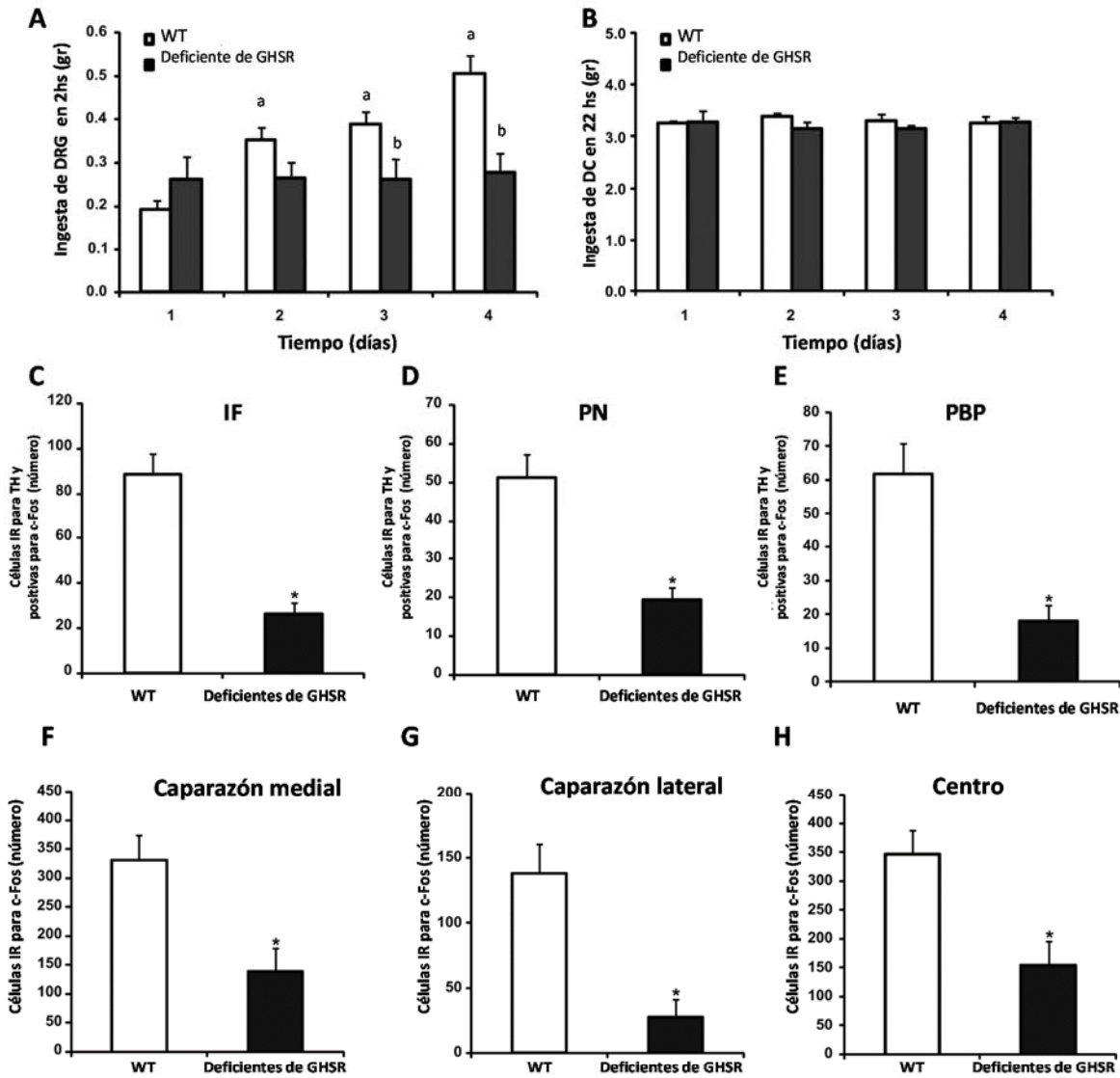


Figura 18 La expresión de GHSR es necesaria para el desarrollo del perfil ascendente en el consumo de alimento y la activación de la vía mesolímbica inducida por eventos intermitentes de ingesta de DRG. El panel A muestra el consumo de DRG por 2 hs diarias durante los 4 días de experimento. El panel B muestra el consumo de DC en las 22 hs restantes del día para cada día experimental. Los paneles C-E muestran el número de neuronas inmuno-reactivas para TH y positivas para c-Fos en las subregiones del AVT. Los paneles F-H muestran el número total de células inmuno-reactivas para c-Fos en las subregiones del NAC. Todos los gráficos muestran los resultados para los dos grupos experimentales: WT y deficientes de GHSR. Los valores están expresados como la media±SEM. a, p<0,05 vs mismo grupo el día 1. b, p<0,05 vs grupo WT el mismo día. *, p<0,05 vs grupo WT

2.9 La administración de ghrelina no modifica el perfil ascendente del consumo de alimento inducido por eventos diarios de ingesta de DRG

Para continuar con el estudio de la implicancia de la hormona ghrelina en la ingesta diaria de DRG, se utilizaron dos grupos de ratones, uno tratado diariamente con ghrelina y otro con vehículo de forma subcutánea, previamente a que se les permitiera el acceso a un pellet de DRG.

Como resultado, se observó nuevamente el desarrollo del perfil ascendente en el consumo de DRG a través de los días tanto en los animales inyectados con vehículo como en los inyectados con ghrelina, aunque sólo en los primeros el escalamiento en la ingesta fue significativo [F (3,20)= 5,53; p= 0,0063]. En los animales tratados con ghrelina aunque es visible que la ingesta va aumentando a través de los días el escalamiento no resultó ser estadísticamente significativo [F (3,15)= 3,01; p= 0,0634]. Por otro lado, la magnitud del aumento progresivo en la ingesta de DRG entre ambos grupos no mostró diferencias significativas (Figura 19)

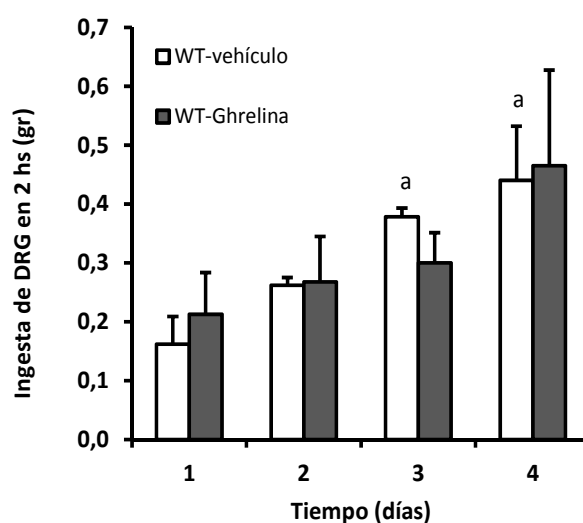


Figura 19. La administración de ghrelina periférica no modifica el perfil ascendente en el consumo de alimento inducido por múltiples eventos de ingesta de DRG. El panel A muestra el consumo de DRG luego del tratamiento con vehículo o ghrelina durante los 4 días del experimento. a, p<0,005 vs misma condición el día 1.

3. ESTUDIO DE LA PARTICIPACION DE LAS NEURONAS CRF DE LA AMÍGDALA EN EL CIRCUITO NEURONAL QUE SE ACTIVA POR UNO O MULTIPLES EVENTOS DE INGESTA DE DRG

3.1 El ratón transgénico CRF-hrGFP es un modelo adecuado para estudiar las neuronas CRF de la amígdala

Con el objetivo de poder estudiar la implicancia que tienen las neuronas CRF de la amígdala en comportamientos asociados con la recompensa y dado que estas neuronas no pueden ser detectadas por técnicas de inmunohistoquímica tradicionales, el Dr. Perelló desarrolló un ratón transgénico que expresa hrGFP bajo el promotor de CRF. Más específicamente se modificó el BAC de CRF RP24-80I22, de forma tal que la expresión de hrGFP está dirigida por los elementos regulatorios del gen de CRF (Figura 20A). Por microscopía de fluorescencia se confirmó la abundante presencia de células que expresan hrGFP en la amígdala (De Francesco et al., 2015).

Para determinar si la expresión de hrGFP era limitada a las neuronas CRF, se realizó un análisis neuroanatómico de la autofluorescencia de hrGFP junto con la señal generada por una inmunohistoquímica fluorescente roja contra CRF. La fluorescencia de hrGFP fue intensa y se encontró principalmente en los cuerpos neuronales y también en las dendritas. Como la visualización inmunohistoquímica de las neuronas productoras de CRF es dificultosa los animales se pre-trataron con colchicina intra-amígdala. Bajo esta condición, la señal de CRF se observó principalmente en el cuerpo celular y el patrón de fluorescencia de hrGFP no se vio afectado permitiendo la estimación del grado de colocación de ambas señales fluorescentes (Figura 20B-E). Alrededor del 100% de las neuronas de la amígdala inmunoreactivas para CRF expresó también hrGFP, mientras que el $87 \pm 12\%$ de células verdes fluorescentes también presentó señal roja fluorescente de CRF.

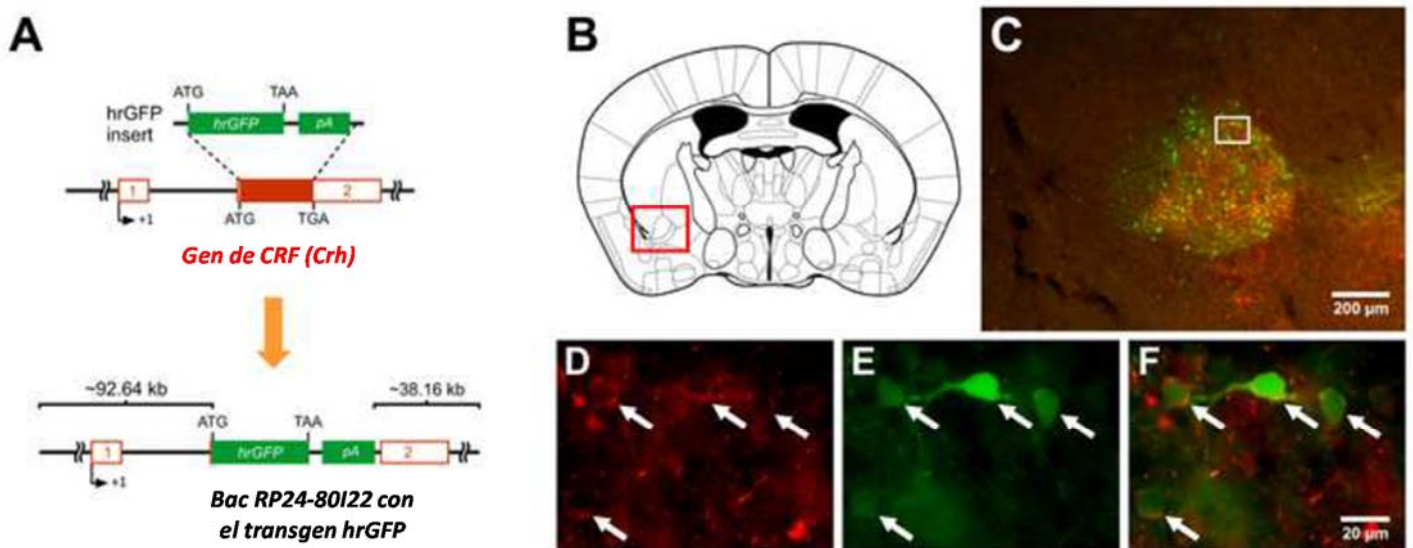


Figura 20. Ratón transgénico CRF-hrGFP. El panel A muestra un diagrama esquemático de la derivación del ratón CRF-hrGFP. El panel B muestra un diagrama esquemático de una sección coronal al nivel de donde fueron tomadas las microfotografías. El panel C muestra la superposición de imágenes con la señal de hr-GFP (señal verde) y CRF (señal roja) dentro de la amígdala a baja magnificación. Los paneles D-F muestran microfotografías del área marcada en el panel C. Señal de CRF en rojo (D), señal de hrGFP en verde (E) y superposición de las dos imágenes anteriores. Las flechas indican células doblemente marcadas. Escalas: 200 μ m (baja magnificación), 20 μ m (alta magnificación).

3.2. El marcador de activación neuronal c-Fos es adecuado para estimar la activación de las neuronas CRF de la amígdala del ratón CRF-hrGFP

Con el objetivo de evaluar si la utilización de c-Fos como marcador de activación neuronal es útil para estudiar las neuronas CRF de la amígdala se sometió a distintos grupos de ratones CRF-hrGFP a protocolos experimentales en los que se conoce que se recluta dicha población neuronal (Dayas et al., 2001, Martinez et al., 2002, Wu et al., 2014). Luego de cada protocolo experimental se realizó una inmunohistoquímica contra c-Fos para evaluar si se activaron las neuronas CRF de la amígdala

Se realizaron tres protocolos experimentales:

- Ayuno/realimentación
- Estrés por confrontación social
- Administración de LPS

Como resultado se pudo observar que el número de células inmunoreactivas para c-Fos en la amígdala se incrementó en los 3 experimentos realizados; observándose además, un aumento significativo de neuronas hrGFP positivas para c-Fos con respecto a los niveles encontrados en los ratones control, siendo el protocolo de ayuno/realimentación el que mostró mayor número de colocalizaciones con respecto a sus respectivos controles [t (2)=27,35; p=0,0013] (Tabla 3, Figura 21)

Tabla 3. Densidad relativa de c-Fos y análisis cuantitativo de neuronas hrGFP positivas para c-Fos en la amígdala para los protocolos experimentales utilizados en la validación funcional del ratón CRF-hrGFP

Condición experimental	Densidad de C-Fos	Número de neuronas IR para GFP y positivas para c-Fos
Control	-	0±0
LPS	+	243±49***
<i>Social Defeat stress</i>	++	303±64***
Ayuno/realimentación	++	663±24***

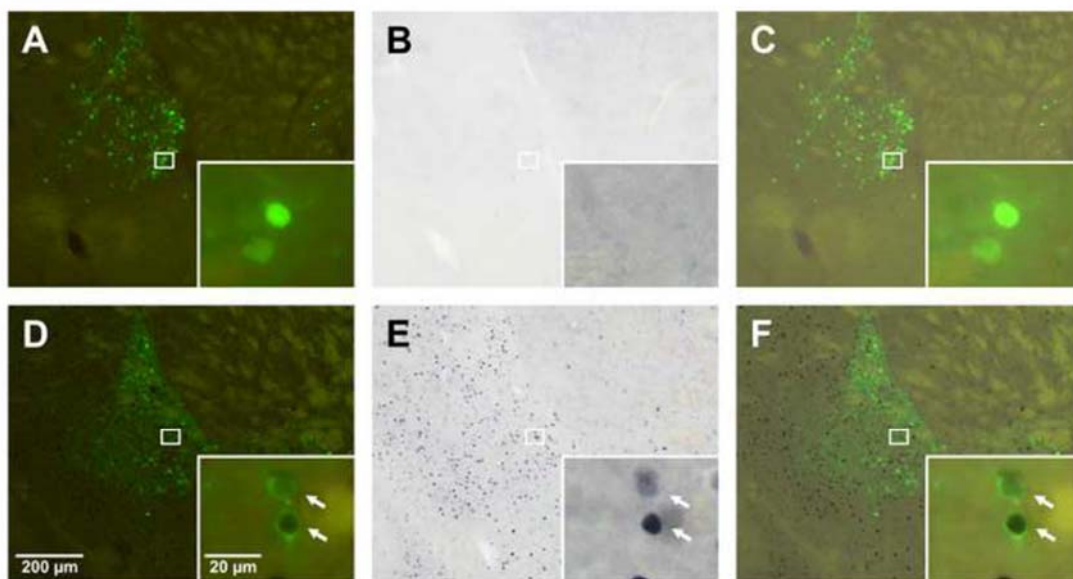


Figura 21. El marcador de activación neuronal c-Fos es adecuado para estimar la activación de las neuronas CRF de la amígdala del ratón CRF-hrGFP. Los paneles superiores e inferiores muestran microfotografías representativas de una sección cerebral conteniendo la amígdala de un animal control (paneles A-C) y de un animal sometido al protocolo de ayuno/realimentación (paneles D-F). Las flechas indican células hrGFP e inmuno-reactivas para c-Fos.

3.3 Las neuronas CRF de la amígdala no se activan por uno o múltiples eventos de ingesta de DRG

Teniendo en cuenta que la amígdala resultó activada luego de uno o cuatro eventos diarios de ingesta de DRG, se decidió evaluar si las neuronas activadas son las neuronas CRF de la amígdala. Para esto se expuso a los ratones CRF-hrGFP a uno o cuatro eventos diarios de ingesta de DRG. Luego se realizó una inmunohistoquímica contra c-Fos en secciones coronales de la amígdala. Como resultado no se encontró ninguna neurona CRF de la amígdala que tenga el núcleo positivo para c-Fos luego de uno o cuatro eventos de ingesta de DRG, aunque la activación de la amígdala aumentó con respecto a los ratones control. En particular, se encontraron 8 ± 8 , 84 ± 33 y 179 ± 20 células positivas para c-Fos en el grupo control, en el grupo con un único acceso a DRG y en el grupo con 4 eventos diarios de acceso a DRG.

Con el fin de complementar el estudio del rol de las neuronas CRF de la amígdala en la modulación de aspectos hedónicos de la ingesta de DRG, los animales CRF-hrGFP se expusieron a dos protocolos experimentales que producen la activación de las neuronas de la amígdala. Ellos fueron: (i) un protocolo de aversión condicionada a la DRG (George et al., 2012, Zorrilla et al., 2014) y (ii) el retiro de la DRG luego de dos semanas de consumo de la misma (Zhou et al., 2003, George et al., 2007). En el primer caso, la ingesta de DRG disminuyó significativamente en el grupo previamente tratado con cloruro de Litio en comparación con el grupo tratado con solución salina [213 ± 50 vs 578 ± 129 , respectivamente; $t(9) = 2,82$; $p = 0,0202$], indicando el desarrollo de aversión condicionada hacia la DRG.

Se realizó nuevamente una inmunohistoquímica contra c-Fos en los animales utilizados para cada experimento y como resultado en ningún caso se observó aumento de c-Fos en las neuronas CRF, aunque sí de la amígdala en el protocolo de aversión condicionada. En el protocolo de retiro de DRG la visualización de los niveles de c-Fos fue inconsistente.

Discusión

En la presente Tesis Doctoral, se estudiaron distintos aspectos relacionados con la ingesta espontánea de DRG. Se consideraron resultados comportamentales, neuroanatómicos y funcionales, para intentar delinear los circuitos neuronales que regulan la ingesta de dicha dieta y la participación de la ghrelina en los mismos. Inicialmente, se caracterizaron los circuitos neuronales activados por un solo evento de ingesta de DRG. Luego, se continuó con un modelo de eventos diarios de ingesta de DRG, el cual representaría de forma más acertada lo que ocurre en personas que sufren algunos tipos de trastornos alimentarios. En ambos casos, se estudió el rol modulador de la ghrelina sobre los modelos murinos utilizados.

En el primer capítulo, se estudió un único evento de ingesta de DRG. En éste, se observó un comportamiento hiperfágico espontáneo, ante la presencia novedosa de un pellet de DRG. Estudios neuroanatómicos posteriores evidenciaron que la ingesta espontánea de DRG activa centros de la vía mesolímbica, que incluyen neuronas del AVT, NAc y ACe, así como también, neuronas del HLat. Se encontró, también, una diferencia en las respuestas de las diferentes subregiones del AVT. En términos del circuito neuronal implicado, se mostró que la activación del receptor Ox1 es necesaria, tanto para la regulación de la magnitud del consumo espontáneo de DRG, como para la activación completa de la vía mesolímbica. En estudios neuroanatómicos y de trazado neuronal, se observó que las neuronas productoras de orexina del HLat, que se activan por la ingesta de DRG, inervan el AVT.

Existen evidencias que avalan que los circuitos que controlan la motivación a consumir dietas apetecibles, son poderosos sistemas capaces de estimular la ingesta de alimentos aun por sobre las señales homeostáticas (Egecioglu et al., 2011). En los experimentos realizados durante esta Tesis, se observó que los animales que tuvieron acceso a un pellet de DRG consumieron de forma espontánea 1.216 Kcal, que representan aproximadamente un quinto de su ingesta calórica diaria. En cuanto a esto, es importante remarcar que los ratones se encontraban

saciados, y que la exposición a la DRG se dio en un momento del día (a la mañana) en el que la ingesta de alimento en roedores es mínima. Además, los ratones tuvieron libre acceso a DC durante todo el experimento. Así, la ingesta espontánea de DRG parece, en este caso, deberse a la naturaleza apetecible del estímulo e implicaría aspectos hedónicos de la ingesta de alimentos. Apoyando esta idea, en los cerebros de los animales que ingirieron DRG, se observó una fuerte activación, evidenciada por el número de células inmunoreactivas para c-Fos, en diferentes núcleos de la vía mesolímbica.

Este simple modelo utilizado en la primera parte de este trabajo, ha sido revisado por expertos en el campo, en su reciente publicación (Valdivia et al., 2014). Estos concuerdan en que puede ser relevante para estudiar los comportamientos de atracón. Sin embargo, cuestionaron dos aspectos del modelo. Por un lado, el hecho de que no mide indicadores de la sensación de pérdida de control, aspecto que define justamente el concepto aceptado de atracón (American Psychiatric Association, 2013). Por otro lado, cuestionaron que es un solo evento y no se repite en el tiempo, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los pacientes con desórdenes alimentarios. Esto es acertado, aunque en lo que respecta a la primera objeción ya se ha explicado en la introducción la difícil tarea de modelar estos aspectos subjetivos, asociados a este comportamiento. En cuanto a lo segundo, la intención de esta primera parte del trabajo fue caracterizar lo que ocurre y, también, los circuitos implicados en un único evento de atracón alimentario, para luego estudiar su evolución en el tiempo. La inclusión de un grupo expuesto a una cantidad de DRG similar a la consumida por los ratones control, llamado DRG *pair-fed*, se usó para distinguir los potenciales efectos relacionados con la naturaleza de la DRG, de aquellos relacionados con la ingesta excesiva de la misma. A pesar de que la DC y la DRG no son isocalóricas, el total de calorías consumidas por el grupo DRG *pair-fed* y el grupo control fueron estadísticamente indistinguibles.

En este trabajo, se evaluó la activación neuronal en distintos núcleos cerebrales mediante el uso de una inmunohistoquímica contra c-Fos, ya que se ha probado que la rápida y transitoria inducción de genes de expresión rápida, como lo es el gen que codifica para la proteína c-Fos, permite generar mapas de activación celular en el sistema nervioso central (Dragunow and Faull, 1989, Sheng and Greenberg, 1990, Morgan and Curran, 1991, Herrera and Robertson, 1996, Herdegen and Leah, 1998). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la falta de expresión de c-Fos no necesariamente indica que un determinado grupo celular no esté implicado en la respuesta a un estímulo o incluso que se haya activado eléctricamente (Labiner et al., 1993, Ericsson et al., 1994, Brown and Sawchenko, 1997, Figueiredo et al., 2003). El porqué de la ausencia de c-Fos en algunas condiciones experimentales es desconocida, pero podría ser debida a una deficiencia en los mensajeros bioquímicos requeridos, que regulan la inducción de c-Fos; a que c-Fos no se exprese en el tipo neuronal específico; o a que estos tipos neuronales tengan umbrales de activación más altos para que se produzca la inducción de c-Fos (Pacak and Palkovits, 2001, Konkle and Bielajew, 2004). Por otro lado, en el caso de estímulos repetidos, la respuesta de c-Fos puede estar disminuida, posiblemente debido a que su aumento estaría reemplazado por los denominados FRAs, del inglés *Fos-related antigens*, cuya expresión es temporalmente más prolongada, por lo que la distribución de las proteínas FRA podrían ser una medida más adecuada de la activación en el estudio de estimulación crónica (Konkle and Bielajew, 2004). A pesar de que estas consideraciones deben ser tenidas en cuenta, c-Fos es uno de los marcadores funcionales de activación neuronal más utilizado por varias razones (Kovacs, 2008): (i) en condiciones basales sus expresión es baja; (ii) es inducido en respuesta a varias señales extracelulares incluyendo iones, neurotransmisores, factores de crecimiento, drogas, alimentos, situaciones generadoras de estrés , entre otras ;(iii) su respuesta es transitoria y (iv) su detección es sencilla y puede ser fácilmente combinada con varios marcadores, incluyendo

mRNA de neuropéptidos y proteínas, trazadores retrógrados y otros marcadores de actividad (Elias et al., 1999, Zhang et al., 2000, Rajendren, 2002, Valdivia et al., 2014).

Un concepto a considerar en relación con el comportamiento que mostraron los ratones expuestos a la DRG, es el de neofobia. La neofobia es la capacidad específica de evitar cualquier novedad, incluso la comida, y evaluar las consecuencias que puede traer acercarse o ingerirla, antes de hacerlo (Barnett, 1958, 1963, Le Magnen, 1992, Barnett, 2009). Este comportamiento está presente en muchas especies (Bryan, 1987, Inglis, 1996, Launchbaugh, 1997, Addessi et al., 2004), incluyendo los roedores (Barnett, 1963, Carroll, 1975, Kronenberger and Medioni, 1985, Inglis, 1996, Barnett, 2009, Modlinska et al., 2015). Las ratas, por ejemplo, cambian la conducta alimentaria si cambia el lugar donde aparece la comida, el contenedor de ésta, así como también, si se hacen cambios en el tipo y esquema de alimentación (Inglis, 1996, Barnett, 2009). Su respuesta a estas nuevas condiciones resulta de la interacción de comportamientos contrapuestos, motivados por la curiosidad y el miedo a su posible toxicidad, lo que genera inicialmente la evitación hacia el nuevo alimento, seguida por una gradual familiarización; y si ese nuevo alimento no se asocia con síntomas adversos, entonces su ingesta aumenta (Modlinska et al., 2015). De acuerdo con los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, la neofobia parece jugar un rol menor, ya que los animales ingirieron DRG a pesar de ser novedosa para ellos, y esto se dio principalmente durante la primera media hora a partir del ofrecimiento del pellet (datos no mostrados). La casi ausencia de neofobia podría deberse a las mínimas diferencias macroscópicas que presentan los pellets de DRG y DC en lo que respecta a su apariencia, así como también a que los ingredientes utilizados para preparar ambas dietas son los mismos, aunque, se encuentran en distinta proporción en cada una de ellas. A pesar de esto, es posible que algún grado de neofobia haya existido; sin embargo, la cantidad de DRG ingerida, y la ausencia de activación de núcleos que responden ante un estímulo gustatorio novedoso

(Lin et al., 2012), sugiere que si la neofobia estuvo presente, fue mínima y transitoria. Por lo tanto, el paradigma experimental utilizado sería para investigar los circuitos neuronales y los mecanismos moleculares que regulan los comportamientos alimentarios relacionados con procesos hedónicos.

Como ya se mencionó, uno de los resultados encontrados en este estudio fue que las neuronas dopaminérgicas del AVT se activan en los animales que ingirieron DRG de forma espontánea. En trabajos previos, se ha demostrado que justamente estas neuronas son el sitio de acción de varias drogas de abuso, como por ejemplo, la nicotina (Ikemoto et al., 2006), los cannabinoides (Zangen et al., 2006), la cocaína (Rodd et al., 2005), el etanol (Rodd-Henricks et al., 2000) y los opioides (Gysling and Wang, 1983, Zangen et al., 2002). Sin embargo, es importante mencionar, que el rol de las neuronas dopaminérgicas del AVT y, principalmente, su conexión con el NAc en la ingesta hedónica de alimento, es aún controversial y tema de debate (Wise, 2006, Palmiter, 2007, Salamone and Correa, 2013). Se ha mostrado que ciertos alimentos de naturaleza apetecible activan estas neuronas y elevan los niveles de dopamina en el NAc (Hernandez and Hoebel, 1988, Wilson et al., 1995, Bassareo and Di Chiara, 1999, Hajnal et al., 2004, Liang et al., 2006), al igual que lo hacen ciertas drogas de abuso. Sin embargo, esta sola observación, llevaría a asumir que la dopamina media directamente el placer inducido por el consumo de alimento, y que el aumento de dopamina en el NAc controla directamente las bases emocionales de la ingesta de alimentos apetecibles. Esto, en última instancia, podría llevar al atracón alimentario y eventualmente provocar obesidad, simplificando de esta forma, la función de las neuronas dopaminérgicas en la ingesta hedónica de alimento. Una de las teorías más actuales propone que la vía de señalización dopaminérgica, desde el AVT hacia el NAc, hipocampo, amígdala y/o corteza pre-frontal, promueven actividades relacionadas con procesos hedónicos, facilitando comportamientos dirigidos hacia objetivos específicos como lo es la

alimentación (Palmiter, 2007). De hecho las neuronas dopaminérgicas del AVT responden a estímulos visuales, olfativos y gustativos, así como también, a señales que permiten predecir la llegada del alimento (Palmiter, 2007, Kenny, 2011, Baik, 2013). Se ha sugerido que el rol de las neuronas dopaminérgicas del AVT en la ingesta de alimento es complejo, y estaría relacionado con varios procesos reguladores, como el aprendizaje, la motivación, el *liking* y el *wanting* (Berridge and Robinson, 1998, Wise, 2004).). En la actualidad, se considera que estas neuronas participan de la regulación de comportamientos relacionados al placer, pero su rol exacto sigue siendo incierto.

En el presente Trabajo de Tesis doctoral, se hizo un exhaustivo análisis neuroanatómico de la presencia de c-Fos en las diversas subregiones del AVT y se encontró una respuesta diferencial de las distintas neuronas dopaminérgicas. En particular, se observó que la activación en el PN y el PBP fue similar tanto en el grupo *pair-fed* como en el grupo con acceso libre a DRG. Es decir, en estas subregiones del AVT la activación observada no depende de la cantidad de DRG ingerida. En contraste, la activación en el IF aumentó en forma proporcional a la masa de DRG ingerida. Estas observaciones sugieren que la activación de las neuronas dopaminérgicas del PN y el PBP estaría mediada principalmente por la naturaleza de la dieta, mientras que la activación de las neuronas dopaminérgicas del IF depende más de la cantidad o del contenido calórico consumido. Es decir, nuestros resultados indican que existe una diferenciación funcional de estas neuronas según el subnúcleo en donde se encuentren. Una respuesta diferencial de las neuronas dopaminérgicas del AVT había sido sugerida por otros estudios en respuesta a estímulos como el etanol y otras drogas de abuso (Boehm et al., 2002, Rodd et al., 2005, Ericson et al., 2008, Shabat-Simon et al., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que las subregiones del AVT presentan diferencias en cuanto a sus proyecciones y sus blancos neuronales (Ikemoto, 2007): el núcleo IF envía sus proyecciones a la parte medial del caparazón,

así como también lo hacen el PN y la parte central del PBP, mientras que la zona lateral del PBP envía sus proyecciones al caparazón lateral y centro. Por lo tanto, es posible plantear la hipótesis que las subdivisiones del AVT participan en diferentes aspectos de la ingesta hedónica de alimentos.

La ingesta de DRG durante un único evento produjo una activación significativa de las neuronas productoras de orexina de HLat, la cual es requerida para la activación de las neuronas dopaminérgicas del AVT y para que la ingesta de DRG espontánea aumente respecto de la ingesta de DC. Las neuronas de orexina no solamente están implicadas en la regulación homeostática de la alimentación, sino que también participan en la regulación de los circuitos no homeostáticos que regulan la ingesta de alimentos, considerándose una conexión entre ambos (Clegg et al., 2002, Perello et al., 2010, Mahler and Aston-Jones, 2012). En este estudio, encontramos que el consumo espontáneo de DRG disminuye por la administración del antagonista SB-334867, lo que indica que la acción de orexina, vía activación del receptor Ox-1, es requerida para el consumo de DRG en esta condición experimental. Además, existe evidencia que sugiere que orexina modula la neurotransmisión dopaminérgica. En primer lugar, las terminales de orexina provenientes del HLat se encuentran adosadas a dendritas y cuerpos celulares de neuronas dopaminérgicas del AVT (Fadel and Deutch, 2002). En segundo lugar, el antagonista del receptor de dopamina haloperidol bloquea la hiperactividad inducida por inyección intracerebroventricular de orexina (Nakamura et al., 2000). Métodos electrofisiológicos, también han mostrado que las orexinas activan directamente las neuronas dopaminérgicas del AVT (Korotkova et al., 2003). En relación con esto, en esta Tesis Doctoral, se observó una disminución en el número de células positivas para c-Fos en el AVT en los animales tratados con SB-334867, lo que sugiere que las neuronas productoras de orexina están implicadas en la activación de la vía mesolímbica. De hecho, se mostró que la mayoría de las

neuronas productoras de orexina que se activan en respuesta a la DRG envían sus proyecciones al AVT. Por lo tanto, se puede concluir que la ingesta espontánea de DRG, en animales que nunca la habían ingerido antes, activaría las neuronas dopaminérgicas del sistema mesolímbico, al menos parcialmente, de manera indirecta mediante la activación de las neuronas productoras de orexina del HLat.

La estimación de la densidad de fibras inmunoreactivas para orexina y del número de neuronas dopaminérgicas contactadas por éstas, no mostró diferencias en las tres subregiones del AVT. Sin embargo, el nivel de activación de las neuronas dopaminérgicas localizadas en el IF aumenta en forma proporcional a la masa de DRG ingerida. Así, se necesitarán estudios posteriores para explicar los mecanismos que median la activación diferencial de estas neuronas dopaminérgicas. Es interesante destacar que nuestros estudios de trazado neuronal mostraron que existen neuronas en el HLat que envían sus proyecciones al AVT y se activan al ingerir DRG en esta condición experimental, pero que no producen orexina. Esta población de neuronas podría incluir a las neuronas MCH o, también, a las neuronas productoras de neurotensina, ya que existen trabajos que indican que estas poblaciones neuronales participan en el control de aspectos hedónicos de la ingesta, reforzando el consumo de alimentos ricos en calorías (Barson et al., 2013, Kempadoo et al., 2013).

La ingesta de DRG en este protocolo experimental, lleva a la activación de poblaciones neuronales localizadas en el NAc, de una manera independiente de la acción de orexina y al menos en parte de la activación de las neuronas dopaminérgicas del AVT. El NAc es considerado como una importante interfase entre el sistema de recompensa y el sistema motor, dado que permitiría el pasaje de la motivación a la acción (Mogenson et al., 1980, Kelley, 2004); y se ha demostrado que está particularmente involucrado en la regulación de aspectos hedónicos de la ingesta de alimento (Mucha and Iversen, 1986, Bakshi and Kelley, 1993, Zhang et al., 1998, Will

et al., 2003, Baldo et al., 2004, Zheng et al., 2007). En este trabajo de Tesis Doctoral, se encontró que la ingesta espontánea de DRG activa la expresión de c-Fos en el NAc y que ésta activación no es bloqueada por el pre-tratamiento con el antagonista del receptor Ox1. Por lo tanto, estos resultados indican que las neuronas del NAc se activan ante la ingesta de DRG, al menos parcialmente, de una forma independiente de la activación de las neuronas productoras de orexina del HLat y de las neuronas del AVT, lo que sugiere que las neuronas del NAc serían reclutadas durante la ingesta de DRG también por algún otro circuito neuronal, que podría actuar inclusive antes que la vía de señalización, HLat- AVT. En este sentido, existen varios trabajos que sugieren que los opioides juegan un rol fundamental en la ingesta de alimentos y que su punto de acción principal sería el NAc (Bakshi and Kelley, 1993, Kelley et al., 1996, Zhang et al., 1998, Zhang and Kelley, 2000). Por ejemplo, se ha mostrado que la ingesta excesiva de DRG que se produce luego del tratamiento intra-NAc con DAMGO, un agonista MOR, es bloqueada reversiblemente por la inactivación temporaria previa, con muscimol, del HLat, el NDM, el AVT y la región intermedia del NTS, observándose una disminución en la ingesta de DRG, que es normalmente observada por el tratamiento con DAMGO (Will et al., 2003). Así, es posible que en la activación del NAc que observamos en este trabajo se deba a la activación del sistema opioide. Estudios específicos que pongan a prueba esta posibilidad, serán necesarios para profundizar más en los mecanismos de activación neuronal que ocurren en el NAc.

En este trabajo de Tesis doctoral, se mostró que la estimulación orosensorial que genera la DRG es requerida para la activación de la vía mesolímbica, ya que la administración intragástrica de DRG no aumenta los niveles de c-Fos en la mayoría de las áreas estudiadas. Estudios recientes sugieren que la DRG se censa inicialmente mediante receptores de ácidos grasos que se encuentran en la lengua (Manabe et al., 2010), para luego reclutar grupos neuronales del núcleo parabraquial, el AVT, el NAc y el HLat (Lundy and Norgren, 2004, Smith,

2004, Kelley et al., 2005). Por lo tanto, es posible plantear la hipótesis de que la estimulación orosensorial generada por la gran cantidad de ácidos grasos que contiene la DRG, resulta en la activación de circuitos neuronales que terminan reclutando a la vía mesolímbica. Es interesante mencionar que existen trabajos que muestran que infusiones intragástricas de glucosa pueden estimular el sistema dopaminérgico independientemente de la estimulación oral (Ren et al., 2010, de Araujo et al., 2012). De hecho se ha propuesto que la vía mesolímbica dopaminérgica estaría más relacionada con los aspectos, *wanting* y *learning*, que con el *liking* (Berridge and Robinson, 1998, Berridge, 2007). Una limitación intrínseca del método de *gavage* utilizado en este trabajo, es que puede generar distensión gástrica y cambios en la dinámica de la entrada de nutrientes en el intestino. Por otro lado, el estrés asociado a la técnica de manipulación para la realización del procedimiento podría enmascarar respuestas fisiológicas hacia los nutrientes. A pesar de esto, esta estrategia experimental es valiosa, ya que permitiría disociar el impacto de señales sensoriales de otros mecanismos de activación.

Por último, en este primer capítulo, se mostró que la administración periférica de ghrelina o la ausencia de expresión de GHSR no afecta la cantidad de DRG ingerida ni la activación de la vía mesolímbica inducida por un único evento de ingesta de dicha dieta. Es importante aclarar que el protocolo experimental utilizado, en el que se administró ghrelina periférica, se hizo en una dosis que simularía concentraciones fisiológicas alcanzadas en ratones expuestos a un ayuno de 12 a 24 hs o al estrés (Brzozowski et al., 2004, Perello et al., 2010). Publicaciones recientes del laboratorio de Neurofisiología del IMBICE, muestran que dosis bajas de ghrelina, como la utilizada, aumentan la ingesta de alimento al actuar exclusivamente en el NArc (Cabral et al., 2014, Cabral et al., 2015). Esta podría ser la razón de que la activación de la vía mesolímbica no se haya visto reforzada en estos experimentos, a un valor superior del que produce la DRG *per se* y, en consecuencia, no haya aumentado la ingesta de dicha dieta. La

capacidad de ghrelina de actuar en el cerebro e incrementar la ingesta de alimento, depende de su accesibilidad a las áreas cerebrales mencionadas. La ghrelina circulante no puede cruzar libremente la barrera hemato-encefálica, y aún se desconoce cómo la hormona entra al cerebro. Es frecuentemente aceptado que la ghrelina circulante es capaz de acceder casi exclusivamente al NARc en donde la barrera hemato-encefálica es presumiblemente más débil; sin embargo, esta posibilidad aún se encuentra en debate (Cabral et al., 2015). Otra posibilidad es que la ghrelina circulante acceda al cerebro a través de los órganos circunventriculares, los cuales son áreas especializadas con capilares fenestrados. La eminencia media, localizada en aposición al NARc, es un órgano circunventricular por donde ghrelina puede difundir libremente y alcanzar su receptor (Schaeffer et al., 2013). La relevancia de la existencia del receptor de ghrelina en zonas cerebrales sin acceso a la ghrelina circulante, se desconoce. Se ha demostrado que la administración central de ghrelina aumenta la ingesta de alimentos, e induce la activación de c-Fos en muchas de las áreas donde se ha descrito la expresión del GHSR1a. Entre dichas áreas, se encuentran núcleos hipotalámicos como el NPV, el NARc, el NDM, el VMH y núcleos extra-hipotalámicos como el AP, el NTS y el AVT. (Cabral et al., 2014, Cabral et al., 2015)

Luego de haber caracterizado lo que sucede en un único episodio de ingesta de DRG, se decidió estudiar qué ocurre cuando la ingesta de dicha dieta se da en un evento repetido diariamente. Así, usando una combinación de estudios comportamentales y neuro-anatómicos en ratones manipulados farmacológica- o genéticamente, se observó : (i) una importante hiperfagia desde el primer acceso a la dieta con un perfil ascendente en el consumo, durante los cuatro días que duró el experimento; (ii) la activación de poblaciones neuronales del AVT y del NAc, la cual en general fue más pronunciada en el cuarto evento de ingesta de DRG; (iii) la activación de neuronas de orexina del HLat; (iv) que el bloqueo de la vía de señalización de

orexina no afectó el escalamiento en el consumo de DRG y (v) que el ratón deficiente de GHSR1a, por un lado no aumentó el consumo de DRG a través de los días, y por otro lado, la activación de la vía mesolímbica y del HLat fue menor que la observada en los ratones salvajes.

El modelo experimental de atracón utilizado en esta segunda parte del presente trabajo de Tesis Doctoral, en el cual animales alimentados *ad-lib* con DC tienen accesos cortos durante cuatro días a DRG, representa, de forma más adecuada, lo que ocurre en ciertos trastornos alimentarios; ya que en éstos últimos, los atracones están presentes, pero de forma intermitente, durante un periodo prolongado. Esta y otras características se indican el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, quinta edición (American Psychiatric Association, 2013), la cual es una actualización, realizada en el año 2013, de la clasificación y criterios diagnósticos acordados por la Asociación Americana de Psiquiatría. Teniendo esto en cuenta, los resultados de los grupos que tuvieron acceso durante cuatro días, una vez por día, en la misma franja horaria, a DRG exhiben lo que podría considerarse como una serie de atracones. De esta forma, el protocolo de eventos diarios de ingesta de DRG utilizado, permitiría modelar la ingesta excesiva de alimento observada en desórdenes patológicos como la bulimia, los trastornos asociados al atracón y la obesidad. Estudios previos con modelos similares, han mostrado un escalamiento en el consumo de alimentos apetecibles durante los eventos iniciales, hasta que finalmente este consumo se estabiliza (Sindelar et al., 2005, Davis et al., 2007, Berner et al., 2008, Wojnicki et al., 2008, Bake et al., 2014). Sin embargo, los sustratos moleculares implicados en este perfil de consumo no han sido sistemáticamente estudiados. El escalamiento en el consumo es una característica relevante en estos modelos de atracón, porque podría asociarse a la pérdida de control durante la ingesta, como se observa típicamente en los episodios de atracón en humanos (Goeders et al., 2009, Perello et al., 2014). Por supuesto que este tipo de episodios en humanos se manifiesta en forma de comportamientos mucho más

complejos y por largos periodos (Wolfe et al., 2009). Aun así, el estudio de estos comportamientos en modelos de roedores, puede ser de utilidad para conocer algunos de los circuitos neuronales reclutados bajo condiciones particulares, como se ha hecho ya, en el campo de estudio de las drogas de abuso (Goeders et al., 2009, Steketee and Kalivas, 2011). Algunos de los mecanismos propuestos que mediarían el escalamiento en el consumo de drogas de abuso, en los primeros eventos de consumo, incluyen la tolerancia, la sensibilización comportamental y/o la formación de hábito, sugiriendo que la vía mesolímbica estaría involucrada en estos cambios (Berridge, 2007, Steketee and Kalivas, 2011). Es importante aclarar que al igual que en el estudio de un único evento de ingesta de DRG, también se utilizaron ratones saciados, que el acceso a DRG se dio en un momento del día en el que la ingesta en roedores es mínima, y que los ratones tuvieron acceso a DC todo el tiempo. Por lo tanto, y como se mencionó anteriormente, la ingesta de DRG parece ser principalmente por la naturaleza apetecible del estímulo, lo que involucraría aspectos hedónicos de la ingesta.

Se ha mostrado que el rol de las neuronas dopaminérgicas, en respuesta a sucesivas exposiciones a estímulos placenteros, es sofisticado. La señalización de dopamina en el NAc aumenta luego de la primera exposición al estímulo y luego de repetidas exposiciones en similares situaciones experimentales, el circuito se adapta y la dopamina pasa a convertirse en una señal predictiva del estímulo (Schultz, 2010, Salamone and Correa, 2012). Además de esta complejidad funcional, como ya se ha mencionado, las neuronas dopaminérgicas se encuentran localizadas en distintas subregiones, siendo parte de diferentes circuitos neuronales cuyo rol fisiológico independiente es desconocido (Ikemoto, 2007, Ferreira et al., 2008, Lammel et al., 2011). En este trabajo, se observó que la ingesta regular de DRG activa las neuronas dopaminérgicas de las distintas subregiones del AVT en forma diferencial. Se observó un refuerzo de la activación de las neuronas dopaminérgicas del IF y el PBP para los ratones que

ingirieron DRG en cuatro eventos sucesivos. Para el IF, esto concuerda con los resultados mostrados anteriormente, en los cuales se observó que la activación de este núcleo dependía de la cantidad de DRG consumida. Por otro lado, la activación en el PN no se modificó significativamente al aumentar el número de eventos de consumo de DRG. Por lo tanto, las neuronas dopaminérgicas del IF y PBP parecen tener una respuesta diferencial a través del proceso de escalamiento, mientras que la activación de las neuronas del PN parece ser independiente del número de eventos de ingesta de DRG. Notablemente, las neuronas dopaminérgicas del IF fueron la única subpoblación dopaminérgica del AVT que resultó activada en anticipación al cuarto evento de ingesta de DRG. Estos resultados apoyan la idea de que las neuronas localizadas en distintas subregiones del AVT están diferencialmente implicadas en diversos aspectos de los comportamientos de atracón.

La neuroanatomía de NAc es sumamente compleja: se lo puede dividir en dos subregiones: el centro y el caparazón, el que a su vez puede dividirse en caparazón medial y caparazón lateral (Kelley, 2004). Ambas subregiones se diferencian en su funcionalidad: el caparazón medial estaría más implicado en los procesos asociados a la recompensa; el centro participaría de la realización de funciones motoras relacionadas con procesos cognitivos que median la recompensa. El caparazón lateral que aún no ha sido muy bien estudiado, estaría más asociado a la funcionalidad del centro del NAc y el tubérculo lateral (Kelley, 2004, Ikemoto et al., 2005, Shin et al., 2008, Ikemoto, 2010). Por ejemplo, se ha demostrado que las distintas subregiones responden de manera diferente a la transmisión fásica dopaminérgica, generada por el consumo de alimentos apetecibles (Bassareo and Di Chiara, 1999), así como también, a la acción de opioides (Zhang and Kelley, 2000) y que cumplen roles diferenciales en relación con el consumo de drogas de abuso (Fuchs et al., 2004, Ito et al., 2004, Hollander and Carelli, 2007, Shin et al., 2008, Chaudhri et al., 2010). En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se observó una

importante activación de las subregiones del NAc en el grupo que tuvo acceso durante 4 veces a DRG, y la activación fue mayor, a mayor número de eventos de ingesta. Esto es razonable, considerando que el NAc recibe principalmente inervaciones provenientes del AVT y, por lo tanto, al activarse más el AVT, se podría suponer que aumentaría la liberación de dopamina en el NAc, activándose más; como ya se ha mostrado en estudios anteriores (Park and Carr, 1998, Mendoza et al., 2005, Day et al., 2007). Algo notable fue lo observado en el caparazón medial del NAc, el cual se activó en anticipación al consumo de DRG como ocurrió con las neuronas dopaminérgicas del IF. Está documentado que el caparazón medial del NAc, recibe inervación del IF, y que esta zona estaría más relacionada con los procesos hedónicos (Ikemoto, 2007), por lo que ambos resultados estarían vinculados y demostrarían una acción conjunta de ambos subnúcleos en la anticipación a la ingesta de una dieta apetecible, cuando está disponible de forma intermitente. En contraposición con este hallazgo, hay trabajos que asocian a la transmisión dopaminérgica en el NAc principalmente a la fase consumatoria de la ingesta, y no a la fase anticipatoria (Wilson et al., 1995, Sahr et al., 2008). La activación del caparazón medial también ha sido asociado al aumento de la actividad locomotora (Zahm, 2000). Sin embargo, en este trabajo, no se observaron cambios en la actividad locomotora anticipatoria a la ingesta de DRG, con las condiciones experimentales utilizadas (aunque sí se confirmó que la actividad locomotora anticipatoria a la ingesta de DRG aumenta en los animales con restricción calórica). Es importante destacar que, en otros estudios, tampoco han encontrado un aumento en la actividad locomotora anticipatoria ante la exposición repetida a dietas apetecibles (Le Merrer and Stephens, 2006, Bake et al., 2014). Por lo tanto, la ausencia de cambios en este parámetro; que sí ha sido demostrado, aumenta en anticipación a la administración de drogas de abuso (Kosobud et al., 1998, Gillman et al., 2008), podría deberse a las condiciones experimentales

utilizadas, como el tipo de dieta y el día del experimento en el cual este parámetro fue cuantificado.

Las neuronas de orexina también se activaron en el protocolo de eventos diarios de ingesta de DRG, y esta activación fue similar a la observada como resultado de un único episodio de ingesta a dicha dieta. Por otro lado, se mostró que el bloqueo del receptor de orexina Ox 1, no afectó el aumento sucesivo en la cantidad de DRG ingerida a través de los días, así como tampoco se observaron cambios en los patrones de activación del AVT y el NAc, a pesar de afectar la ingesta de DRG el primer día del experimento. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la ingesta inicial de DRG en ratones alimentados con DC *ad-lib* requiere de la señalización del receptor Ox1, mientras que los mecanismos neuronales que llevan al escalamiento en el consumo de DRG parecerían ser independientes de las vías de señalización de orexina. En el mismo sentido, se ha mostrado que el bloqueo del receptor Ox1 atenúa el desarrollo, pero no la expresión de la sensibilización a la cocaína (Thompson and Borgland, 2011). Los ratones salvajes tratados con un antagonista de orexina y los ratones *knock-out* para orexina muestran una sensibilización y respuesta locomotora normal a la morfina (Sharf et al., 2010). Además, el bloqueo de Ox1 no afecta la potenciación a consumir cocaína en ratones con estimulación cerebral (Riday et al., 2012). Así, las orexinas parecen no jugar un rol importante en las adaptaciones de los circuitos neuronales involucrados en la regulación crónica de la ingesta de drogas o alimentos.

La sensibilización es una forma de plasticidad neuronal, en la cual la repetida exposición a un estímulo lleva a una respuesta amplificada con un incremento de larga duración en la respuesta comportamental y en la liberación de dopamina en el NAc (Steketee and Kalivas, 2011). Trabajos previos han mostrado que la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas del AVT es reforzada por estimulación repetida a drogas, como la cocaína, anfetamina y alcohol; y

que este aumento en la señalización dopaminérgica está asociado a la sensibilización comportamental, definida como el aumento en la respuesta motora que ocurre con la repetición intermitente de un estímulo (Steketee and Kalivas, 2011). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que eventos diarios de ingesta de DRG están asociados no sólo a un perfil ascendente en el consumo de dicha dieta, sino también a una activación reforzada de específicas subregiones del AVT. Con respecto a esto, se ha mostrado que los atracones intermitentes de alimentos apetecibles, incluyendo soluciones de azúcares o mezclas de azúcares y grasas, afectan el recambio de dopamina y la señalización de los receptores D1 y D2 (Avena et al., 2009). Por lo tanto, el escalamiento en la ingesta de DRG a través de episodios independientes de atracón, podría ser considerado no sólo como una forma de sensibilización, sino también como una manera de conceptualizar este tipo de comportamiento alimentario. Sin embargo, serán necesarios más estudios para dilucidar los mecanismos moleculares que median el escalamiento en la ingesta de DRG.

Otra observación que es interesante destacar, es que el grupo que consumió DRG todo el tiempo (DRG *ad lib*) no mostró activación de la vía mesolímbica luego de los 4 días de ingesta. Así, la intermitencia en la ingesta de dicha dieta sería requerida para la persistencia y aumento en la activación de la vía mesolímbica. En este sentido, se ha demostrado en ratas con accesos a sacarosa, que la liberación de dopamina en el NAc se da solamente cuando la ingesta ocurre de forma intermitente, pero no cuando tienen acceso *ad-lib* a sacarosa (Rada et al., 2005). En forma similar, la exposición crónica a nicotina desensibiliza la vía dopaminérgica en comparación con tratamientos agudos con esta droga (Benwell et al., 1995). Por lo expuesto, es posible plantear la hipótesis de que la actividad de la vía dopaminérgica es desensibilizada cuando estímulos placenteros, como la DRG, se ofrece constantemente.

Actualmente, existe evidencia de que la señalización de ghrelina afecta los aspectos hedónicos de la ingesta de alimento en humanos y roedores (Perello and Zigman, 2012). El Dr. Perelló, por ejemplo, ha mostrado que la vía de señalización de ghrelina refuerza la performance en un test CPP (del inglés *conditioned place preference*) e incrementa la motivación por los pellets de DRG (Perello et al., 2010). En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se mostró que la vía de señalización de ghrelina se requiere para que se produzca el escalamiento en el consumo de DRG y la total activación de la vía mesolímbica. Más específicamente, se encontró que los ratones deficientes del receptor de ghrelina, aunque consumieron DRG, no presentaron un perfil ascendente en la cantidad de DRG consumida durante el experimento. Además, los niveles de activación de la vía mesolímbica, al cuarto día experimental, resultaron ser menores en comparación con la activación observada en los ratones salvajes. Estas observaciones señalan un rol importante para la vía de señalización de ghrelina en el proceso de sensibilización hacia la DRG. Es remarcable mencionar que otros estudios han mostrado que los ratones deficientes del receptor de ghrelina también presentan respuestas comportamentales disminuidas hacia la cocaína y nicotina (Abizaid et al., 2011, Jerlhag and Engel, 2011). También se ha demostrado que los ratones deficientes de GHSR1a presentan actividad locomotora anticipatoria reducida, ante un esquema dado de alimentación (Blum et al., 2009, LeSauter et al., 2009). Por lo que se ha propuesto que la vía de señalización de ghrelina podría inducir una forma de sensibilización central, de manera que la hormona haría que los animales se vuelvan más reactivos hacia estímulos placenteros (Wellman et al., 2013). Por otro lado, el hecho de que el sistema ghrelina/GHSR1a sea necesario para que se produzca el escalamiento en el consumo de DRG, podría relacionarse a desórdenes en el nivel de ansiedad de los animales, lo que justamente podría llevar al aumento en el consumo de alimentos. En este sentido algunos estudios han mostrado que la administración de ghrelina en roedores aumenta la inmovilidad en el test de

campo abierto y reduce el número de entradas en los espacios abiertos y el tiempo de permanencia en éstos en el test del laberinto en cruz, indicando de esta forma propiedades ansiogénicas de la hormona (Carlini et al., 2002, Currie et al., 2012, Kajbaf et al., 2012). Sin embargo, con respecto a esto último, hay todavía controversia en la relación que existe entre los cambios en las vías de señalización de ghrelina y las respuestas comportamentales asociadas al nivel de ansiedad. De hecho, existen trabajos que demuestran que, por el contrario, la ghrelina tiene propiedades ansiolíticas (Lutter et al., 2008, Chuang and Zigman, 2010), por lo que serán necesarias más investigaciones con el fin de poder explicar estas discrepancias. En lo que atañe a nuestro conocimiento, los resultados aquí presentados, son el primer reporte del requerimiento de la vía de señalización de ghrelina para que se produzca el escalamiento en el consumo de DRG en roedores. Aunque los núcleos cerebrales que mediarían estos efectos de ghrelina son aún desconocidos, es posible conjeturar que involucrarían la acción de ghrelina sobre la vía mesolímbica. De hecho las neuronas dopaminérgicas del AVT expresan GHSR1a y responden a ghrelina incrementando la frecuencia de potenciales de acción y la liberación de dopamina en el NAc (Abizaid et al., 2006a, Jerlhag et al., 2007). También, se ha observado que la liberación de dopamina en el NAc se encuentra disminuida en ratones deficientes de GHSR1a (Egecioglu et al., 2010), y que la expresión selectiva de GHSR1a en células catecolaminérgicas, incluyendo las neurona dopaminérgicas del AVT, es suficiente para mediar algunos efectos de ghrelina sobre aspectos hedónicos de la ingesta de alimento (Chuang et al., 2011). La posibilidad de que la señalización de ghrelina esté implicada en una forma de sensibilización central que afecte la ingesta de alimentos apetecibles podría ser clínicamente relevante en el desarrollo de tratamientos contra los episodios crónicos de atracón.

La ingesta de DRG en forma de un evento único o en forma diaria aumenta los niveles de c-Fos en la amígdala, por lo que en el tercer capítulo de esta Tesis Doctoral, se evaluó si las neuronas CRF de la amígdala son las que participan del circuito neuronal que se activa por la ingesta de DRG en forma única o diaria. Para ello, inicialmente se realizó validación de un ratón transgénico CRF-hrGFP y se demostró que es una herramienta útil en nuestras condiciones de trabajo, al mostrar que las neuronas CRF de la amígdala presentan un aumento significativo en los niveles de c-Fos cuando los ratones se exponen a estrés por confrontación social, ayuno/realimentación o administración de LPS.

Primero, se utilizó una combinación de estudios de histoquímica e imágenes de fluorescencia para validar la expresión de hrGFP en las neuronas CRF de la amígdala, hecho que efectivamente ocurrió ya que la mayoría de neuronas CRF expresó hrGFP. Sorpresivamente, se detectaron pocas neuronas verdes fluorescentes en el NPV, en donde se ha demostrado que las neuronas CRF se concentran formando parte del eje neuroendocrino hipotálamo hipófiso adrenal, el cual se activa en respuesta al estrés (Bale and Vale, 2004). Las razones de la limitada expresión de hrGFP en este núcleo se desconocen, aunque podrían incluir falla en la inserción del BAC completo, efectos no deseados de la eliminación del transgen de la secuencia codificante de CRF y/o a la falta de elementos críticos en el BAC, necesarios para la expresión genética en el NPV (Matthaei, 2007, Gama Sosa et al., 2010). A pesar de estas consideraciones, las cuales conciernen a todos los modelos de ratones transgénicos, el ratón CRF-hrGFP aquí descrito es una herramienta útil para el estudio del rol de las neuronas CRF de la amígdala.

La amígdala es una región cerebral compleja con una amplia red de conexiones inter e intra-nucleares (Sah et al., 2003). Las neuronas CRF representan una importante población dentro de la amígdala (Potter et al., 1994, Boorse and Denver, 2006). Aunque existe cierta discrepancia acerca de la localización de las neuronas CRF en este núcleo, la mayoría de los

estudios indican que se encuentran localizadas en la ACe (Swanson et al., 1983, Bugnon et al., 1984, Veening et al., 1984, Sakanaka et al., 1986, 1987). Nuestros resultados, los cuales han sido publicados recientemente (De Francesco et al., 2015), demuestran que en ratones las neuronas CRF se encuentran mayormente ubicadas en la zona anterior dorsal de la amígdala, en la región del IPAC y en el área de transición amígdalo-estriatal, aunque según un trabajo previo se observan variaciones en la distribución de dichas neuronas entre cepas de ratones (Asan et al., 2005). Considerando lo anterior, los datos sobre la distribución de las neuronas CRF obtenidos de diferentes modelos animales deberían ser integrados con precaución.

Existen algunas evidencias que sugieren que las neuronas CRF tienen un rol en la regulación de los comportamientos asociados a la ingesta hedónica de alimento. Por ejemplo, se ha mostrado que las lesiones en la amígdala disminuyen la preferencia por la DRG (King et al., 1998), que la exposición a dietas apetecibles aumenta la inmunoreactividad contra c-Fos en la amígdala (Park and Carr, 1998, Valdivia et al., 2014), y que la ingesta de alimento induce la liberación de CRF en la amígdala (Merali et al., 1998). Para evaluar si las neuronas CRF de la amígdala son reclutadas por la ingesta de DRG, varios grupos de ratones se expusieron a distintos protocolos experimentales usando ésta dieta como estímulo apetecible. El análisis de la expresión de c-Fos mostró que las neuronas CRF no se activan luego de: (i) un único evento de ingesta de DRG; (ii) eventos diarios de ingesta de DRG; (iii) la ingesta *ad-libitum* de DRG; (iv) retiro de DRG, luego de 2 semanas de consumo *ad-lib* de dicha dieta y (v) la aversión condicionada a DRG. Notablemente, en todos estos experimentos, la expresión de c-Fos en la amígdala aumentó significativamente respecto de los controles, lo que sugiere que la amígdala, de hecho, está involucrada en estos procesos. Sin embargo, las neuronas de la amígdala reclutadas pertenecen a una población diferente que no incluye a las neuronas productoras de CRF. Es importante destacar que la ausencia de c-Fos, como ya se ha mencionado, en las

neuronas CRF de la amígdala en las distintas manipulaciones realizadas utilizando DRG, no es prueba de la ausencia de su compromiso en un dado circuito neuronal. De todos modos, el hecho de que en respuesta a otros estímulos sí se observe un aumento en la expresión de c-Fos en las neuronas CRF, avala la posibilidad de que la amígdala juegue un rol menor en los comportamientos relacionados con la ingesta de DRG.

Es sabido que el sistema CRF de la amígdala está implicado en la respuesta al estrés. (LeDoux, 2007, Kovacs, 2013). Aquí se confirmó que el estrés por confrontación social activa las neuronas CRF de la amígdala, como ya se ha reportado (Dayas et al., 2001, Martinez et al., 2002). Se sabe que el protocolo de estrés por confrontación social, en el cual los animales experimentales son expuestos a una agresión no letal por parte de otro ratón, es suficiente para inducir cambios comportamentales que persisten por semanas. También, se ha mostrado que el sistema CRF de la amígdala modula el comportamiento agonístico que sigue a este tipo de estrés (Tornatzky and Miczek, 1993, Meerlo et al., 1999, Jasnow et al., 2004, Robison et al., 2004). En este estudio, se confirma que las neuronas CRF de la amígdala son reclutadas en respuesta al estrés por confrontación social. Por otro lado, se ha sugerido que la amígdala media los efectos del LPS en diversas funciones cerebrales, incluyendo la reducción de los comportamientos exploratorios hacia objetos novedosos (Haba et al., 2012). Este estudio señala a las neuronas CRF de la amígdala como un blanco activado por la administración de LPS. En conjunto, estas observaciones avalan la idea de que la amígdala juega un rol diferencial en las respuestas a diversas condiciones experimentales, corroborando la noción de que los circuitos neuronales de la amígdala implicados en el estrés son específicos para cada estresor.

La regulación de la ingesta de alimento implica la integración de circuitos orexigénicos y anorexigénicos que activan o detienen la ingesta respectivamente, dependiendo de las necesidades energéticas del organismo. El ayuno activa vías neuronales que llevan a la hiperfagia

cuando los animales vuelven a tener acceso a la comida; mientras que la re-alimentación, luego de un período de ayuno, activa circuitos neuronales implicados en la terminación de la ingesta (Grill and Kaplan, 2002). El tallo cerebral y circuitos hipotalámicos tienen un rol crítico en la regulación de la cantidad de alimento ingerido; sin embargo, evidencias recientes muestran que otras regiones cerebrales, incluyendo la amígdala, son importantes en la regulación aguda del apetito (Wu et al., 2014). Este trabajo de Tesis Doctoral no sólo confirmó que la re-alimentación, luego de un ayuno de 48 horas, activa c-Fos en la amígdala (Timofeeva et al., 2002, Wu et al., 2014); sino que también, muestra que la población de neuronas CRF es uno de los tipos celulares activados bajo esta condición.

El hecho de que se haya encontrado el mayor nivel de activación de las neuronas CRF en el protocolo de ayuno/re-alimentación, sugiere que estas neuronas estarían más implicadas en la regulación homeostática de la ingesta de alimento, más que en el control de la ingesta hedónica o el estrés. Es importante destacar, sin embargo, que el rol de CRF como péptido anorexigénico está aún en debate (Tanaka et al., 2009, Bazhan and Zelena, 2013, Bazhan et al., 2013, Lenglos et al., 2013). En el presente estudio, se detectó la activación de las neuronas CRF de la amígdala luego de la administración de LPS y en el protocolo estrés por confrontación social, dos condiciones experimentales que disminuyen la ingesta de alimento (Chuang et al., 2011). Por lo tanto, estas neuronas podrían estar implicadas en la regulación de la ingesta de alimento sólo bajo circunstancias específicas. De acuerdo con esto, el modelo del ratón CRF-hrGFP reportado en esta Tesis, sería útil para realizar estudios posteriores que podrán ayudar a clarificar el rol fisiológico del sistema CRF de la amígdala.

Por lo tanto, de acuerdo con los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral; se sugiere que tanto la vía mesolímbica, principalmente el circuito AVT-NAC, el HLat y

el sistema ghrelina-GHSR1a juegan un rol fundamental en la regulación de los aspectos hedónicos de la ingesta de alimentos y, más específicamente, en los mecanismos que podrían llevar al establecimiento de conductas patológicas, como lo es el atracón alimentario. Futuras investigaciones serán necesarias para conocer y entender en su totalidad el funcionamiento de estos circuitos y, así, poder lograr la introducción de nuevas estrategias farmacológicas que sirvan de tratamientos para los trastornos en las conductas alimentarias.

Conclusiones

En conclusión, los resultados mostrados en este trabajo de Tesis Doctoral indican que:

- Un único evento de ingesta de DRG lleva a una hiperfagia de la misma, y a la activación de núcleos de la vía mesolímbica
- Un único evento de ingesta de DRG activa diferencialmente a las neuronas dopaminérgicas de las subregiones del AVT
- Un único evento de ingesta de DRG activa a las neuronas productoras de orexina del HLat que inervan el AVT
- La vía de señalización de orexina es necesaria para que se produzca hiperfagia y la activación de las neuronas dopaminérgicas en el AVT inducidas por un único evento de ingesta de DRG
- La administración intra-gástrica de DRG no activa a las neuronas de la vía mesolímbica
- El sistema ghrelina/GHSR1a no es necesario para que se produzca hiperfagia y la activación de la vía mesolímbica inducidas por un único evento de ingesta de DRG

- El acceso diario a DRG lleva a eventos de hiperfagia con un perfil ascendente
- Eventos diarios de ingesta de DRG activan diferencialmente neuronas dopaminérgicas del AVT y las subregiones del NAC
- Eventos diarios de ingesta de DRG activan diferencialmente las neuronas productoras de orexina del HLat
- La vía de señalización de orexina no es necesaria para que se produzca el escalamiento en el consumo de DRG, ni la activación de la vía mesolímbica inducida por eventos diarios de ingesta de dicha dieta
- La expresión de GHSR1a es necesaria para el desarrollo del escalamiento en el consumo de DRG y la activación de la vía mesolímbica inducidos por eventos diarios de ingesta de DRG

-El ratón transgénico CRF-hrGFP es un modelo adecuado para estudiar las neuronas CRF de la amígdala

-Las neuronas CRF de la amígdala están implicadas en comportamientos relacionados al estrés y a la ingesta de alimento, aunque sólo en ciertas condiciones específicas.

Bibliografía

- Abercrombie M (1946) Estimation of nuclear population from microtome sections. *The Anatomical record* 94:239-247.
- Abizaid A, Gao Q, Horvath TL (2006a) Thoughts for food: brain mechanisms and peripheral energy balance. *Neuron* 51:691-702.
- Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, Roth RH, Sleeman MW, Picciotto MR, Tschop MH, Gao XB, Horvath TL (2006b) Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *The Journal of clinical investigation* 116:3229-3239.
- Abizaid A, Mineur YS, Roth RH, Elsworth JD, Sleeman MW, Picciotto MR, Horvath TL (2011) Reduced locomotor responses to cocaine in ghrelin-deficient mice. *Neuroscience* 192:500-506.
- Adessi E, Galloway AT, Birch L, Visalberghi E (2004) Taste perception and food choices in capuchin monkeys and human children. *Primatologie : revue publiee sous l'egide de la Societe francophone de primatologie* 6:101-128.
- Adrian TE, Allen JM, Bloom SR, Ghatei MA, Rossor MN, Roberts GW, Crow TJ, Tatemoto K, Polak JM (1983) Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature* 306:584-586.
- Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E, Watson S (1998) Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug and alcohol dependence* 51:127-140.
- American Psychiatric Association (2013) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*.
- Ando T, Komaki G, Nishimura H, Naruo T, Okabe K, Kawai K, Takii M, Oka T, Kodama N, Nakamoto C, Ishikawa T, Suzuki-Hotta M, Minatozaki K, Yamaguchi C, Nishizono-Maher A, Kono M, Kajiwara S, Suematsu H, Tomita Y, Ebana S, Okamoto Y, Nagata K, Nakai Y, Koide M, Kobayashi N, Kurokawa N, Nagata T, Kiriike N, Takenaka Y, Nagamine K, Ookuma K, Murata S, Japanese Genetic Research Group for Eating D (2010) A ghrelin gene variant may predict crossover rate from restricting-type anorexia nervosa to other phenotypes of eating disorders: a retrospective survival analysis. *Psychiatric genetics* 20:153-159.
- Asan E, Yilmazer-Hanke DM, Eliava M, Hantsch M, Lesch KP, Schmitt A (2005) The corticotropin-releasing factor (CRF)-system and monoaminergic afferents in the central amygdala: investigations in different mouse strains and comparison with the rat. *Neuroscience* 131:953-967.
- Avena NM, Bocarsly ME, Rada P, Kim A, Hoebel BG (2008) After daily bingeing on a sucrose solution, food deprivation induces anxiety and accumbens dopamine/acetylcholine imbalance. *Physiology & behavior* 94:309-315.
- Avena NM, Rada P, Hoebel BG (2009) Sugar and fat bingeing have notable differences in addictive-like behavior. *The Journal of nutrition* 139:623-628.
- Avena NM, Rada P, Moise N, Hoebel BG (2006) Sucrose sham feeding on a binge schedule releases accumbens dopamine repeatedly and eliminates the acetylcholine satiety response. *Neuroscience* 139:813-820.
- Baik JH (2013) Dopamine signaling in food addiction: role of dopamine D2 receptors. *BMB Rep* 46:519-526.
- Bake T, Murphy M, Morgan DG, Mercer JG (2014) Large, binge-type meals of high fat diet change feeding behaviour and entrain food anticipatory activity in mice. *Appetite* 77:60-71.
- Bakshi VP, Kelley AE (1993) Feeding induced by opioid stimulation of the ventral striatum: role of opiate receptor subtypes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 265:1253-1260.
- Baldo BA, Gual-Bonilla L, Sijapati K, Daniel RA, Landry CF, Kelley AE (2004) Activation of a subpopulation of orexin/hypocretin-containing hypothalamic neurons by GABAA

- receptor-mediated inhibition of the nucleus accumbens shell, but not by exposure to a novel environment. *The European journal of neuroscience* 19:376-386.
- Baldo BA, Pratt WE, Kelley AE (2010) Control of Fat Intake by Striatal Opioids. In: *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects* (Montmayeur, J. P. and le Coutre, J., eds) Boca Raton (FL).
- Bale TL, Vale WW (2004) CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:525-557.
- Barnett SA (1958) Exploratory behaviour. *British journal of psychology* 49:289-310.
- Barnett SA (1963) Smell and Taste. *Developmental medicine and child neurology* 25:516-517.
- Barnett SA (2009) *The Rat: A Study in Behavior*. New Brunswick and London.: AldineTransaction.
- Barson JR, Morganstern I, Leibowitz SF (2013) Complementary roles of orexin and melanin-concentrating hormone in feeding behavior. *International journal of endocrinology* 2013:983964.
- Baskin DG, Hahn TM, Schwartz MW (1999) Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Horm Metab Res* 31:345-350.
- Bassareo V, Di Chiara G (1999) Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *The European journal of neuroscience* 11:4389-4397.
- Baxter MG, Murray EA (2002) The amygdala and reward. *Nature reviews Neuroscience* 3:563-573.
- Bazhan N, Zelena D (2013) Food-intake regulation during stress by the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Brain research bulletin* 95:46-53.
- Bazhan NM, Yakovleva TV, Kazantseva AY, Makarova EN (2013) Exaggerated anorexigenic response to restraint stress in A(y) mice is associated with elevated CRFR2 mRNA expression in the hypothalamus. *Physiology & behavior* 120:19-25.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews* 63:182-217.
- Beckman LM, Beckman TR, Earthman CP (2010) Changes in gastrointestinal hormones and leptin after Roux-en-Y gastric bypass procedure: a review. *Journal of the American Dietetic Association* 110:571-584.
- Bello NT, Hajnal A (2010) Dopamine and binge eating behaviors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 97:25-33.
- Benwell ME, Balfour DJ, Birrell CE (1995) Desensitization of the nicotine-induced mesolimbic dopamine responses during constant infusion with nicotine. *British journal of pharmacology* 114:454-460.
- Berger S. T-KM (2013) Introduction: Binge Eating, Bulimia Nervosa, and Hedonic Overeating. In: *Animal Models of Eating Disorders*, vol. 74 (Avena, N. M., ed), pp 3 - 6 Springer.
- Berner LA, Avena NM, Hoebel BG (2008) Bingeing, self-restriction, and increased body weight in rats with limited access to a sweet-fat diet. *Obesity* 16:1998-2002.
- Berridge KC (2007) The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology* 191:391-431.
- Berridge KC (2009) 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiology & behavior* 97:537-550.
- Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain research Brain research reviews* 28:309-369.
- Berridge KC, Robinson TE (2003) Parsing reward. *Trends Neurosci* 26:507-513.
- Berridge KC, Robinson TE, Aldridge JW (2009) Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Curr Opin Pharmacol* 9:65-73.

- Berthoud HR (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 26:393-428.
- Berthoud HR (2004a) Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiology & behavior* 81:781-793.
- Berthoud HR (2004b) Neural control of appetite: cross-talk between homeostatic and non-homeostatic systems. *Appetite* 43:315-317.
- Berthoud HR (2011) Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? *Curr Opin Neurobiol* 21:888-896.
- Berthoud HR (2012) The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. *The Proceedings of the Nutrition Society* 71:478-487.
- Binder EB, Nemeroff CB (2010) The CRF system, stress, depression and anxiety-insights from human genetic studies. *Mol Psychiatry* 15:574-588.
- Blasio A, Steardo L, Sabino V, Cottone P (2014) Opioid system in the medial prefrontal cortex mediates binge-like eating. *Addiction biology* 19:652-662.
- Blum ID, Patterson Z, Khazall R, Lamont EW, Sleeman MW, Horvath TL, Abizaid A (2009) Reduced anticipatory locomotor responses to scheduled meals in ghrelin receptor deficient mice. *Neuroscience* 164:351-359.
- Bodnar RJ (2015) Endogenous opioids and feeding behavior: A decade of further progress (2004-2014). A Festschrift to Dr. Abba Kastin. *Peptides*.
- Bodnar RJ, Klein GE (2005) Endogenous opiates and behavior: 2004. *Peptides* 26:2629-2711.
- Boehm SL, 2nd, Piercy MM, Bergstrom HC, Phillips TJ (2002) Ventral tegmental area region governs GABA(B) receptor modulation of ethanol-stimulated activity in mice. *Neuroscience* 115:185-200.
- Boggiano MM, Chandler PC, Viana JB, Oswald KD, Maldonado CR, Wauford PK (2005) Combined dieting and stress evoke exaggerated responses to opioids in binge-eating rats. *Behavioral neuroscience* 119:1207-1214.
- Boorse GC, Denver RJ (2006) Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. *General and comparative endocrinology* 146:9-18.
- Born JM, Lemmens SG, Rutters F, Nieuwenhuizen AG, Formisano E, Goebel R, Westerterp-Plantenga MS (2010) Acute stress and food-related reward activation in the brain during food choice during eating in the absence of hunger. *International journal of obesity* 34:172-181.
- Briggs DI, Andrews ZB (2011) Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis. *Neuroendocrinology* 93:48-57.
- Broglio F, Gianotti L, Destefanis S, Fassino S, Abbate Daga G, Mondelli V, Lanfranco F, Gottero C, Gauna C, Hofland L, Van der Lely AJ, Ghigo E (2004) The endocrine response to acute ghrelin administration is blunted in patients with anorexia nervosa, a ghrelin hypersecretory state. *Clinical endocrinology* 60:592-599.
- Brown ER, Sawchenko PE (1997) Hypophysiotropic CRF neurons display a sustained immediate-early gene response to chronic stress but not to adrenalectomy. *Journal of neuroendocrinology* 9:307-316.
- Bryan J (1987) Food neophobia and olfaction in domestic chicks. *Bird Behavior* 7.
- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Drozdowicz D, Bielanski W, Pajdo R, Ptak A, Nikiforuk A, Pawlik WW, Hahn EG (2004) Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage. *Regulatory peptides* 120:39-51.
- Buda-Levin A, Wojnicki FH, Corwin RL (2005) Baclofen reduces fat intake under binge-type conditions. *Physiology & behavior* 86:176-184.

- Bugnon C, Fellmann D, Gouget A, Bresson JL, Clavequin MC, Hadjiyiassemis M, Cardot J (1984) Corticoliberin neurons: cytophysiology, phylogeny and ontogeny. *Journal of steroid biochemistry* 20:183-195.
- Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336:783-787.
- Cabral A, De Francesco PN, Perello M (2015) Brain circuits mediating the orexigenic action of peripheral ghrelin: narrow gates for a vast kingdom. *Frontiers in endocrinology* 6:44.
- Cabral A, Valdivia S, Fernandez G, Reynaldo M, Perello M (2014) Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central ghrelin: critical role of brain accessibility. *Journal of neuroendocrinology* 26:542-554.
- Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G (1999) Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 48:2132-2137.
- Calipari ES, Espana RA (2012) Hypocretin/orexin regulation of dopamine signaling: implications for reward and reinforcement mechanisms. *Front Behav Neurosci* 6:54.
- Cardona Cano S, Merkestein M, Skibicka KP, Dickson SL, Adan RA (2012) Role of ghrelin in the pathophysiology of eating disorders: implications for pharmacotherapy. *CNS drugs* 26:281-296.
- Carlini VP, Monzon ME, Varas MM, Cragolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN, de Barioglio SR (2002) Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochemical and biophysical research communications* 299:739-743.
- Carroll ME (1975) Demonstrations of neophobia and enhanced neophobia in the albino rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 59:457-467.
- Cellini E, Nacmias B, Brecelj-Anderluh M, Badia-Casanovas A, Bellodi L, Boni C, Di Bella D, Estivill X, Fernandez-Aranda F, Foulon C, Friedel S, Gabrovsek M, Gorwood P, Gratacos M, Guelfi J, Hebebrand J, Hinney A, Holliday J, Hu X, Karwautz A, Kipman A, Komel R, Rotella CM, Ribases M, Ricca V, Romo L, Tomori M, Treasure J, Wagner G, Collier DA, Sorbi S, consortium ECFVFiHE (2006) Case-control and combined family trios analysis of three polymorphisms in the ghrelin gene in European patients with anorexia and bulimia nervosa. *Psychiatric genetics* 16:51-52.
- Clegg DJ, Air EL, Woods SC, Seeley RJ (2002) Eating elicited by orexin-a, but not melanin-concentrating hormone, is opioid mediated. *Endocrinology* 143:2995-3000.
- Colantuoni C, Schwenker J, McCarthy J, Rada P, Ladenheim B, Cadet JL, Schwartz GJ, Moran TH, Hoebel BG (2001) Excessive sugar intake alters binding to dopamine and mu-opioid receptors in the brain. *Neuroreport* 12:3549-3552.
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ (2001) The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5:S63-67.
- Cooper MJ, Clark DM, Fairburn CG (1993) An experimental study of the relationship between thoughts and eating behaviour in bulimia nervosa. *Behaviour research and therapy* 31:749-757.
- Coppari R, Ichinose M, Lee CE, Pullen AE, Kenny CD, McGovern RA, Tang V, Liu SM, Ludwig T, Chua SC, Jr., Lowell BB, Elmquist JK (2005) The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab* 1:63-72.
- Corwin RL, Avena NM, Boggiano MM (2011) Feeding and reward: perspectives from three rat models of binge eating. *Physiology & behavior* 104:87-97.

- Corwin RL, Boan J, Peters KF, Ulbrecht JS (2012) Baclofen reduces binge eating in a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Behavioural pharmacology* 23:616-625.
- Corwin RL, Buda-Levin A (2004) Behavioral models of binge-type eating. *Physiology & behavior* 82:123-130.
- Cottone P, Sabino V, Roberto M, Bajo M, Pockros L, Frihauf JB, Fekete EM, Steardo L, Rice KC, Grigoriadis DE, Conti B, Koob GF, Zorrilla EP (2009) CRF system recruitment mediates dark side of compulsive eating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:20016-20020.
- Cottrell E, Mercer JG (2012) Leptin receptors. In: *Appetite Control*, vol. 209 (Joost, H.-G., ed): Springer.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-484.
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37:649-661.
- Crawley JN (1999) Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain research* 835:18-26.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714-1719.
- Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ (2002) Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *The New England journal of medicine* 346:1623-1630.
- Currie PJ, Khelemsky R, Rigsbee EM, Dono LM, Coiro CD, Chapman CD, Hinchcliff K (2012) Ghrelin is an orexigenic peptide and elicits anxiety-like behaviors following administration into discrete regions of the hypothalamus. *Behavioural brain research* 226:96-105.
- Chaudhri N, Sahuque LL, Schairer WW, Janak PH (2010) Separable roles of the nucleus accumbens core and shell in context- and cue-induced alcohol-seeking. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35:783-791.
- Chen C, Wu D, Clarke IJ (1996) Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs. *The Journal of endocrinology* 148:381-386.
- Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarth DT, Adams JR, Frazier EG, Shen Z, Marsh DJ, Feighner SD, Guan XM, Ye Z, Nargund RP, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, MacNeil DJ, Qian S (2004) Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 145:2607-2612.
- Chuang JC, Perello M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Savitt JM, Lutter M, Zigman JM (2011) Ghrelin mediates stress-induced food-reward behavior in mice. *The Journal of clinical investigation* 121:2684-2692.
- Chuang JC, Zigman JM (2010) Ghrelin's Roles in Stress, Mood, and Anxiety Regulation. *International journal of peptides* 2010.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH (1989) The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* 8:4025-4034.

- Davis C, Levitan RD, Kaplan AS, Carter J, Reid C, Curtis C, Patte K, Hwang R, Kennedy JL (2008) Reward sensitivity and the D2 dopamine receptor gene: A case-control study of binge eating disorder. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 32:620-628.
- Davis CA, Levitan RD, Reid C, Carter JC, Kaplan AS, Patte KA, King N, Curtis C, Kennedy JL (2009) Dopamine for "wanting" and opioids for "liking": a comparison of obese adults with and without binge eating. *Obesity* 17:1220-1225.
- Davis JF, Melhorn SJ, Shurdak JD, Heiman JU, Tschop MH, Clegg DJ, Benoit SC (2007) Comparison of hydrogenated vegetable shortening and nutritionally complete high-fat diet on limited access-binge behavior in rats. *Physiology & behavior* 92:924-930.
- Day JJ, Roitman MF, Wightman RM, Carelli RM (2007) Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nature neuroscience* 10:1020-1028.
- Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA (2001) Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *The European journal of neuroscience* 14:1143-1152.
- de Araujo IE, Ferreira JG, Tellez LA, Ren X, Yeckel CW (2012) The gut-brain dopamine axis: a regulatory system for caloric intake. *Physiology & behavior* 106:394-399.
- De Francesco PN, Valdivia S, Cabral A, Reynaldo M, Raingo J, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Zigman JM, Perello M (2015) Neuroanatomical and functional characterization of CRF neurons of the amygdala using a novel transgenic mouse model. *Neuroscience* 289:153-165.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:322-327.
- Deary A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Jr., Bates MD, Caron MG (1990) Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347:72-76.
- Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B, Gaskin FS, Nonaka N, Jaeger LB, Banks WA, Morley JE, Pinto S, Sherwin RS, Xu L, Yamada KA, Sleeman MW, Tschop MH, Horvath TL (2006) Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature neuroscience* 9:381-388.
- Dickinson A, Balleine B (2002) The role of learning in the operation of motivational systems. In: *Learning, Motivation & Emotion Steven's Handbook of Experimental Psychology*, 3rd ed pp 497-533.
- Dickson SL, Hrabovszky E, Hansson C, Jerlhag E, Alvarez-Crespo M, Skibicka KP, Molnar CS, Liposits Z, Engel JA, Egecioglu E (2010) Blockade of central nicotine acetylcholine receptor signaling attenuate ghrelin-induced food intake in rodents. *Neuroscience* 171:1180-1186.
- DiLeone RJ, Taylor JR, Picciotto MR (2012) The drive to eat: comparisons and distinctions between mechanisms of food reward and drug addiction. *Nature neuroscience* 15:1330-1335.
- Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P (1995) PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:2471-2481.

- Dragunow M, Faull RL (1989) Rolipram induces c-fos protein-like immunoreactivity in ependymal and glial-like cells in adult rat brain. *Brain research* 501:382-388.
- Egecioglu E, Jerlhag E, Salome N, Skibicka KP, Haage D, Bohlooly YM, Andersson D, Bjursell M, Perrissoud D, Engel JA, Dickson SL (2010) Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. *Addiction biology* 15:304-311.
- Egecioglu E, Skibicka KP, Hansson C, Alvarez-Crespo M, Friberg PA, Jerlhag E, Engel JA, Dickson SL (2011) Hedonic and incentive signals for body weight control. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 12:141-151.
- Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK (1999) Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23:775-786.
- Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK (1998) Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21:1375-1385.
- Elmore DK, de Castro JM (1991) Meal patterns of normal, untreated bulimia nervosa and recovered bulimic women. *Physiology & behavior* 49:99-105.
- Elmquist JK, Ahima RS, Elias CF, Flier JS, Saper CB (1998) Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:741-746.
- Ericson M, Lof E, Stomberg R, Chau P, Soderpalm B (2008) Nicotinic acetylcholine receptors in the anterior, but not posterior, ventral tegmental area mediate ethanol-induced elevation of accumbal dopamine levels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 326:76-82.
- Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE (1994) A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14:897-913.
- Erlanson-Albertsson C (2005) How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 97:61-73.
- Fadel J, Deutch AY (2002) Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 111:379-387.
- Fernandes MF, Sharma S, Hryhorczuk C, Auguste S, Fulton S (2013) Nutritional controls of food reward. *Can J Diabetes* 37:260-268.
- Ferreira JG, Del-Fava F, Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (2008) Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience* 153:196-213.
- Figueiredo HF, Bodie BL, Tauchi M, Dolgas CM, Herman JP (2003) Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology* 144:5249-5258.
- Frohman LA, Kineman RD, Kamegai J, Park S, Teixeira LT, Coschigano KT, Kopchic JJ (2000) Secretagogues and the somatotrope: signaling and proliferation. *Recent progress in hormone research* 55:269-290; discussion 290-261.
- Fuchs RA, Evans KA, Parker MC, See RE (2004) Differential involvement of the core and shell subregions of the nucleus accumbens in conditioned cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology* 176:459-465.
- Fulton S (2010) Appetite and reward. *Frontiers in neuroendocrinology* 31:85-103.
- Gallagher JP, Orozco-Cabal LF, Liu J, Shinnick-Gallagher P (2008) Synaptic physiology of central CRH system. *European journal of pharmacology* 583:215-225.

- Gama Sosa MA, De Gasperi R, Elder GA (2010) Animal transgenesis: an overview. *Brain structure & function* 214:91-109.
- Geisler S, Zahm DS (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *The Journal of comparative neurology* 490:270-294.
- Geliebter A, Gluck ME, Hashim SA (2005) Plasma ghrelin concentrations are lower in binge-eating disorder. *The Journal of nutrition* 135:1326-1330.
- George O, Ghozland S, Azar MR, Cottone P, Zorrilla EP, Parsons LH, O'Dell LE, Richardson HN, Koob GF (2007) CRF-CRF1 system activation mediates withdrawal-induced increases in nicotine self-administration in nicotine-dependent rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:17198-17203.
- George O, Le Moal M, Koob GF (2012) Allostasis and addiction: role of the dopamine and corticotropin-releasing factor systems. *Physiology & behavior* 106:58-64.
- Gillman AG, Kosobud AE, Timberlake W (2008) Pre- and post-nicotine circadian activity rhythms can be differentiated by a paired environmental cue. *Physiology & behavior* 93:337-350.
- Goeders JE, Murnane KS, Banks ML, Fantegrossi WE (2009) Escalation of food-maintained responding and sensitivity to the locomotor stimulant effects of cocaine in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 93:67-74.
- Gosnell BA, Levine AS (2009) Reward systems and food intake: role of opioids. *International journal of obesity* 33 Suppl 2:S54-58.
- Grandy DK, Zhang YA, Bouvier C, Zhou QY, Johnson RA, Allen L, Buck K, Bunzow JR, Salon J, Civelli O (1991) Multiple human D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:9175-9179.
- Gray TS (1999) Functional and anatomical relationships among the amygdala, basal forebrain, ventral striatum, and cortex. An integrative discussion. *Annals of the New York Academy of Sciences* 877:439-444.
- Grill HJ, Kaplan JM (2002) The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Frontiers in neuroendocrinology* 23:2-40.
- Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain research Molecular brain research* 48:23-29.
- Gueorguiev M, Lecoœur C, Meyre D, Benzinou M, Mein CA, Hinney A, Vatin V, Weill J, Heude B, Hebebrand J, Grossman AB, Korbonits M, Froguel P (2009) Association studies on ghrelin and ghrelin receptor gene polymorphisms with obesity. *Obesity* 17:745-754.
- Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE (2008) Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:6320-6325.
- Gysling K, Wang RY (1983) Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain research* 277:119-127.
- Haba R, Shintani N, Onaka Y, Wang H, Takenaga R, Hayata A, Baba A, Hashimoto H (2012) Lipopolysaccharide affects exploratory behaviors toward novel objects by impairing cognition and/or motivation in mice: Possible role of activation of the central amygdala. *Behavioural brain research* 228:423-431.
- Hadad NA, Knackstedt LA (2014) Addicted to palatable foods: comparing the neurobiology of Bulimia Nervosa to that of drug addiction. *Psychopharmacology* 231:1897-1912.

- Hadigan CM, Kissileff HR, Walsh BT (1989) Patterns of food selection during meals in women with bulimia. *The American journal of clinical nutrition* 50:759-766.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Muntton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:10911-10916.
- Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW (1998) Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature neuroscience* 1:271-272.
- Hajnal A, Smith GP, Norgren R (2004) Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 286:R31-37.
- Hamamura M, Leng G, Emson PC, Kiyama H (1991) Electrical activation and *c-fos* mRNA expression in rat neurosecretory neurones after systemic administration of cholecystokinin. *The Journal of physiology* 444:51-63.
- Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G (2005) A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 437:556-559.
- Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (2002) Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *The Journal of comparative neurology* 454:15-33.
- Heinonen MV, Purhonen AK, Makela KA, Herzig KH (2008) Functions of orexins in peripheral tissues. *Acta Physiol (Oxf)* 192:471-485.
- Herdegen T, Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain research Brain research reviews* 28:370-490.
- Hernandez L, Hoebel BG (1988) Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by microdialysis. *Life sciences* 42:1705-1712.
- Herrera DG, Robertson HA (1996) Activation of *c-fos* in the brain. *Progress in neurobiology* 50:83-107.
- Hersrud SL, Stoltenberg SF (2009) Epistatic interaction between *COMT* and *DAT1* genes on eating behavior: a pilot study. *Eating behaviors* 10:131-133.
- Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA (2001) Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 103:777-797.
- Hewson AK, Dickson SL (2000) Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *Journal of neuroendocrinology* 12:1047-1049.
- Hietala J, West C, Syvalahti E, Nagren K, Lehtikoinen P, Sonninen P, Ruotsalainen U (1994) Striatal D2 dopamine receptor binding characteristics in vivo in patients with alcohol dependence. *Psychopharmacology* 116:285-290.
- Hillman JB, Tong J, Tschop M (2011) Ghrelin biology and its role in weight-related disorders. *Discovery medicine* 11:521-528.
- Hollander JA, Carelli RM (2007) Cocaine-associated stimuli increase cocaine seeking and activate accumbens core neurons after abstinence. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:3535-3539.

- Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Takano K, Kangawa K (2009) Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: a pilot study. *Endocrine journal* 56:1119-1128.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974-977.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annual review of neuroscience* 29:565-598.
- Iemolo A, Blasio A, St Cyr SA, Jiang F, Rice KC, Sabino V, Cottone P (2013) CRF-CRF1 receptor system in the central and basolateral nuclei of the amygdala differentially mediates excessive eating of palatable food. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38:2456-2466.
- Ikemoto S (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 56:27-78.
- Ikemoto S (2010) Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35:129-150.
- Ikemoto S, Panksepp J (1999) The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain research Brain research reviews* 31:6-41.
- Ikemoto S, Qin M, Liu ZH (2005) The functional divide for primary reinforcement of D-amphetamine lies between the medial and lateral ventral striatum: is the division of the accumbens core, shell, and olfactory tubercle valid? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:5061-5065.
- Ikemoto S, Qin M, Liu ZH (2006) Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:723-730.
- Inglis IR (1996) Foraging behaviour of wild rats (*Rattus norvegicus*) towards new foods and bait containers. *Applied animal behavior science* 47:175 – 190.
- Ito R, Robbins TW, Everitt BJ (2004) Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nature neuroscience* 7:389-397.
- Jasnow AM, Davis M, Huhman KL (2004) Involvement of central amygdala and bed nucleus of the stria terminalis corticotropin-releasing factor in behavioral responses to social defeat. *Behavioral neuroscience* 118:1052-1061.
- Jerlhag E, Egencioglu E, Dickson SL, Douhan A, Svensson L, Engel JA (2007) Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. *Addiction biology* 12:6-16.
- Jerlhag E, Egencioglu E, Dickson SL, Svensson L, Engel JA (2008) Alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are involved in mediating the ghrelin-induced locomotor stimulation and dopamine overflow in nucleus accumbens. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 18:508-518.
- Jerlhag E, Engel JA (2011) Ghrelin receptor antagonism attenuates nicotine-induced locomotor stimulation, accumbal dopamine release and conditioned place preference in mice. *Drug and alcohol dependence* 117:126-131.

- Johnson SW, North RA (1992) Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *The Journal of physiology* 450:455-468.
- Kajbaf F, Ahmadi R, Fatemi Tabatabaie R, Safarpour E (2012) Effect of intrahippocampal ghrelin agonist administration on passive avoidance learning and anxiety in rats. *Pakistan journal of biological sciences : PJBS* 15:1063-1068.
- Kales EF (1990) Macronutrient analysis of binge eating in bulimia. *Physiology & behavior* 48:837-840.
- Kalia M, Sullivan JM (1982) Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *The Journal of comparative neurology* 211:248-265.
- Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS (1991) Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:10931-10935.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I (2000) Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 141:4797-4800.
- Karlsson HK, Tuominen L, Tuulari JJ, Hirvonen J, Parkkola R, Helin S, Salminen P, Nuutila P, Nummenmaa L (2015) Obesity is associated with decreased mu-opioid but unaltered dopamine D2 receptor availability in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:3959-3965.
- Kelley AE (2004) Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 27:765-776.
- Kelley AE, Bakshi VP, Haber SN, Steininger TL, Will MJ, Zhang M (2002) Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiology & behavior* 76:365-377.
- Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ (2005) Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiology & behavior* 86:773-795.
- Kelley AE, Bless EP, Swanson CJ (1996) Investigation of the effects of opiate antagonists infused into the nucleus accumbens on feeding and sucrose drinking in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 278:1499-1507.
- Kelley AE, Will MJ, Steininger TL, Zhang M, Haber SN (2003) Restricted daily consumption of a highly palatable food (chocolate Ensure(R)) alters striatal enkephalin gene expression. *The European journal of neuroscience* 18:2592-2598.
- Kempadoo KA, Tourino C, Cho SL, Magnani F, Leininger GM, Stuber GD, Zhang F, Myers MG, Deisseroth K, de Lecea L, Bonci A (2013) Hypothalamic neurotensin projections promote reward by enhancing glutamate transmission in the VTA. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:7618-7626.
- Kenny PJ (2011) Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nature reviews Neuroscience* 12:638-651.
- King BM, Rossiter KN, Stines SG, Zaharan GM, Cook JT, Humphries MD, York DA (1998) Amygdaloid-lesion hyperphagia: impaired response to caloric challenges and altered macronutrient selection. *The American journal of physiology* 275:R485-493.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660.
- Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K (2001) Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 12:118-122.

- Kojima S, Nakahara T, Nagai N, Muranaga T, Tanaka M, Yasuhara D, Masuda A, Date Y, Ueno H, Nakazato M, Naruo T (2005) Altered ghrelin and peptide YY responses to meals in bulimia nervosa. *Clinical endocrinology* 62:74-78.
- Konigsmark BW (1970) Methods for the Counting of Neurons. In: *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy* (Walle J. H. Nauta, S. O. E. E., ed), pp 315-340.
- Konkle AT, Bielajew C (2004) Tracing the neuroanatomical profiles of reward pathways with markers of neuronal activation. *Reviews in the neurosciences* 15:383-414.
- Korotkova TM, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE (2003) Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:7-11.
- Kosobud AE, Pecoraro NC, Rebec GV, Timberlake W (1998) Circadian activity precedes daily methamphetamine injections in the rat. *Neuroscience letters* 250:99-102.
- Kovacs KJ (2008) Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *Journal of neuroendocrinology* 20:665-672.
- Kovacs KJ (2013) CRH: the link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. *Journal of chemical neuroanatomy* 54:25-33.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393:72-76.
- Kronenberger JP, Medioni J (1985) Food neophobia in wild and laboratory mice (*Mus musculus domesticus*). *Behavioural processes* 11:53-59.
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A (1998) Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 19:155-157.
- Krude H, Gruters A (2000) Implications of proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans: the POMC deficiency syndrome. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 11:15-22.
- Labiner DM, Butler LS, Cao Z, Hosford DA, Shin C, McNamara JO (1993) Induction of c-fos mRNA by kindled seizures: complex relationship with neuronal burst firing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13:744-751.
- Lammel S, Ion DI, Roeper J, Malenka RC (2011) Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. *Neuron* 70:855-862.
- Launchbaugh KL (1997) Overcoming food neophobia in domestic ruminants through addition of a familiar flavor and repeated exposure to novel foods. *Applied animal behavior science* 54:327-334.
- Laviano A, Molfino A, Rianda S, Rossi Fanelli F (2012) The growth hormone secretagogue receptor (Ghs-R). *Current pharmaceutical design* 18:4749-4754.
- Le Magnen J (1992) *Neurobiology of Feeding and Nutrition*.: Academic Press Inc.
- .
- Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL (2009) Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiological reviews* 89:1379-1412.
- Le Merrer J, Stephens DN (2006) Food-induced behavioral sensitization, its cross-sensitization to cocaine and morphine, pharmacological blockade, and effect on food intake. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:7163-7171.
- le Roux CW, Neary NM, Halsey TJ, Small CJ, Martinez-Isla AM, Ghatei MA, Theodorou NA, Bloom SR (2005) Ghrelin does not stimulate food intake in patients with surgical procedures

- involving vagotomy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90:4521-4524.
- LeDoux J (2007) The amygdala. *Current biology* : CB 17:R868-874.
- Lenglos C, Mitra A, Guevremont G, Timofeeva E (2013) Sex differences in the effects of chronic stress and food restriction on body weight gain and brain expression of CRF and relaxin-3 in rats. *Genes, brain, and behavior* 12:370-387.
- LeSauter J, Hoque N, Weintraub M, Pfaff DW, Silver R (2009) Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:13582-13587.
- Liang NC, Hajnal A, Norgren R (2006) Sham feeding corn oil increases accumbens dopamine in the rat. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 291:R1236-1239.
- Lin JY, Roman C, Arthurs J, Reilly S (2012) Taste neophobia and c-Fos expression in the rat brain. *Brain research* 1448:82-88.
- Liu B, Garcia EA, Korbonits M (2011) Genetic studies on the ghrelin, growth hormone secretagogue receptor (GHSR) and ghrelin O-acyl transferase (GOAT) genes. *Peptides* 32:2191-2207.
- Liu S, Borgland SL (2015) Regulation of the mesolimbic dopamine circuit by feeding peptides. *Neuroscience* 289:19-42.
- Lopez M, Seoane L, Garcia MC, Lago F, Casanueva FF, Senaris R, Dieguez C (2000) Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochemical and biophysical research communications* 269:41-45.
- Lundy RF, Jr., Norgren R (2004) Activity in the hypothalamus, amygdala, and cortex generates bilateral and convergent modulation of pontine gustatory neurons. *Journal of neurophysiology* 91:1143-1157.
- Lutter M, Nestler EJ (2009) Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. *The Journal of nutrition* 139:629-632.
- Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Anderson JG, Jung S, Birnbaum S, Yanagisawa M, Elmquist JK, Nestler EJ, Zigman JM (2008) The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nature neuroscience* 11:752-753.
- Mahler SV, Aston-Jones GS (2012) Fos activation of selective afferents to ventral tegmental area during cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:13309-13326.
- Manabe Y, Matsumura S, Fushiki T (2010) Preference for High-Fat Food in Animals. In: *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects* (Montmayeur, J. P. and le Coutre, J., eds) Boca Raton (FL).
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *The Journal of comparative neurology* 435:6-25.
- Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, Van der Ploeg LH, Qian S (2002) Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:3240-3245.
- Martinez M, Calvo-Torrent A, Herbert J (2002) Mapping brain response to social stress in rodents with c-fos expression: a review. *Stress* 5:3-13.

- Mason BL, Wang Q, Zigman JM (2014) The central nervous system sites mediating the orexigenic actions of ghrelin. *Annual review of physiology* 76:519-533.
- Matthaei KI (2007) Genetically manipulated mice: a powerful tool with unsuspected caveats. *The Journal of physiology* 582:481-488.
- McGinty JF, van der Kooy D, Bloom FE (1984) The distribution and morphology of opioid peptide immunoreactive neurons in the cerebral cortex of rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 4:1104-1117.
- Meerlo P, Sgoifo A, De Boer SF, Koolhaas JM (1999) Long-lasting consequences of a social conflict in rats: behavior during the interaction predicts subsequent changes in daily rhythms of heart rate, temperature, and activity. *Behavioral neuroscience* 113:1283-1290.
- Mena JD, Sadeghian K, Baldo BA (2011) Induction of hyperphagia and carbohydrate intake by mu-opioid receptor stimulation in circumscribed regions of frontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:3249-3260.
- Mendoza J, Angeles-Castellanos M, Escobar C (2005) Differential role of the accumbens Shell and Core subterritories in food-entrained rhythms of rats. *Behavioural brain research* 158:133-142.
- Merali Z, McIntosh J, Kent P, Michaud D, Anisman H (1998) Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:4758-4766.
- Miljic D, Pekic S, Djurovic M, Doknic M, Milic N, Casanueva FF, Ghatei M, Popovic V (2006) Ghrelin has partial or no effect on appetite, growth hormone, prolactin, and cortisol release in patients with anorexia nervosa. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:1491-1495.
- Mitchell JE, Pyle RL, Eckert ED (1981) Frequency and duration of binge-eating episodes in patients with bulimia. *The American journal of psychiatry* 138:835-836.
- Miyasaka K, Hosoya H, Sekime A, Ohta M, Amono H, Matsushita S, Suzuki K, Higuchi S, Funakoshi A (2006) Association of ghrelin receptor gene polymorphism with bulimia nervosa in a Japanese population. *Journal of neural transmission* 113:1279-1285.
- Modlinska K, Stryjek R, Pisula W (2015) Food neophobia in wild and laboratory rats (multi-strain comparison). *Behavioural processes* 113:41-50.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in neurobiology* 14:69-97.
- Monteleone P, Fabrazzo M, Tortorella A, Martiadis V, Serritella C, Maj M (2005) Circulating ghrelin is decreased in non-obese and obese women with binge eating disorder as well as in obese non-binge eating women, but not in patients with bulimia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 30:243-250.
- Monteleone P, Tortorella A, Castaldo E, Di Filippo C, Maj M (2007) The Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene is significantly associated with binge eating disorder. *Psychiatric genetics* 17:13-16.
- Morgan JI, Curran T (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual review of neuroscience* 14:421-451.
- Moriguchi T, Sakurai T, Nambu T, Yanagisawa M, Goto K (1999) Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neuroscience letters* 264:101-104.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289-295.

- Mucha RF, Iversen SD (1986) Increased food intake after opioid microinjections into nucleus accumbens and ventral tegmental area of rat. *Brain research* 397:214-224.
- Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2000) Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain research* 873:181-187.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409:194-198.
- Naleid AM, Grace MK, Cummings DE, Levine AS (2005) Ghrelin induces feeding in the mesolimbic reward pathway between the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Peptides* 26:2274-2279.
- Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, Narita M, Khotib J, Miyatake M, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakamachi T, Shioda S, Suzuki T (2006) Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:398-405.
- Nestler EJ (2001) Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict* 10:201-217.
- Nestler EJ (2005a) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nature neuroscience* 8:1445-1449.
- Nestler EJ (2005b) The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect* 3:4-10.
- Nestler EJ, Barrot M, Self DW (2001) DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:11042-11046.
- Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annual review of neuroscience* 23:185-215.
- Niswender KD, Schwartz MW (2003) Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Frontiers in neuroendocrinology* 24:1-10.
- Noble EP (2003) D2 dopamine receptor gene in psychiatric and neurologic disorders and its phenotypes. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 116B:103-125.
- Nogueiras R, Romero-Pico A, Vazquez MJ, Novelle MG, Lopez M, Dieguez C (2012) The opioid system and food intake: homeostatic and hedonic mechanisms. *Obes Facts* 5:196-207.
- Ogden CL, Carroll MD, Flegal KM (2014) Prevalence of obesity in the United States. *Jama* 312:189-190.
- Ogiso K, Asakawa A, Amitani H, Inui A (2011) Ghrelin and anorexia nervosa: a psychosomatic perspective. *Nutrition* 27:988-993.
- Olson VG, Nestler EJ (2007) Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* 61:87-95.
- Olszewski PK, Li D, Grace MK, Billington CJ, Kotz CM, Levine AS (2003) Neural basis of orexigenic effects of ghrelin acting within lateral hypothalamus. *Peptides* 24:597-602.
- Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278:135-138.
- Overton PG, Clark D (1997) Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain research Brain research reviews* 25:312-334.
- Pacak K, Palkovits M (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine reviews* 22:502-548.

- Palmiter RD (2007) Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends Neurosci* 30:375-381.
- Park TH, Carr KD (1998) Neuroanatomical patterns of fos-like immunoreactivity induced by a palatable meal and meal-paired environment in saline- and naltrexone-treated rats. *Brain research* 805:169-180.
- Paxinos G, Franklin K (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego.
- Perello M, Raingo J. (2014) Central Ghrelin Receptors and Food Intake. In: *Central Functions of the Ghrelin Receptor*, vol. 25 (Portelli J., S. I., ed), pp 65 - 88: Springer.
- Perello M, Sakata I, Birnbaum S, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Woloszyn J, Yanagisawa M, Lutter M, Zigman JM (2010) Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biological psychiatry* 67:880-886.
- Perello M, Stuart RC, Nillni EA (2006) The role of intracerebroventricular administration of leptin in the stimulation of prothyrotropin releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 147:3296-3306.
- Perello M, Valdivia S, Garcia Romero G, Raingo J (2014) Considerations about rodent models of binge eating episodes. *Frontiers in psychology* 5:372.
- Perello M, Zigman JM (2012) The role of ghrelin in reward-based eating. *Biological psychiatry* 72:347-353.
- Perrin MH, Vale WW (1999) Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Annals of the New York Academy of Sciences* 885:312-328.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:9996-10015.
- Porte D, Jr., Baskin DG, Schwartz MW (2002) Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev* 60:S20-29; discussion S68-84, 85-27.
- Potter E, Sutton S, Donaldson C, Chen R, Perrin M, Lewis K, Sawchenko PE, Vale W (1994) Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:8777-8781.
- Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380:243-247.
- Rada P, Avena NM, Hoebel BG (2005) Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience* 134:737-744.
- Rajendren G (2002) Increased galanin synapses onto activated gonadotropin-releasing hormone neuronal cell bodies in normal female mice and in functional preoptic area grafts in hypogonadal mice. *Journal of neuroendocrinology* 14:435-441.
- Raymond NC, Bartholome LT, Lee SS, Peterson RE, Raatz SK (2007) A comparison of energy intake and food selection during laboratory binge eating episodes in obese women with and without a binge eating disorder diagnosis. *The International journal of eating disorders* 40:67-71.
- Ren X, Ferreira JG, Zhou L, Shammah-Lagnado SJ, Yeckel CW, de Araujo IE (2010) Nutrient selection in the absence of taste receptor signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:8012-8023.
- Ricardo JA, Koh ET (1978) Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain research* 153:1-26.

- Richard D, Lin Q, Timofeeva E (2002) The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. *European journal of pharmacology* 440:189-197.
- Riday TT, Fish EW, Robinson JE, Jarrett TM, McGuigan MM, Malanga CJ (2012) Orexin-1 receptor antagonism does not reduce the rewarding potency of cocaine in Swiss-Webster mice. *Brain research* 1431:53-61.
- Robison CL, Meyerhoff JL, Saviolakis GA, Chen WK, Rice KC, Lumley LA (2004) A CRH1 antagonist into the amygdala of mice prevents defeat-induced defensive behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1032:324-327.
- Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Crile RS, Murphy JM, McBride WJ (2000) Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology* 149:217-224.
- Rodd ZA, Bell RL, McQueen VK, Davids MR, Hsu CC, Murphy JM, Li TK, Lumeng L, McBride WJ (2005) Chronic ethanol drinking by alcohol-preferring rats increases the sensitivity of the posterior ventral tegmental area to the reinforcing effects of ethanol. *Alcoholism, clinical and experimental research* 29:358-366.
- Rondou P, Haegeman G, Van Craenenbroeck K (2010) The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell Mol Life Sci* 67:1971-1986.
- Rothwell NJ (1990) Central effects of CRF on metabolism and energy balance. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 14:263-271.
- Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological reviews* 83:803-834.
- Sahr AE, Sindelar DK, Alexander-Chacko JT, Eastwood BJ, Mitch CH, Statnick MA (2008) Activation of mesolimbic dopamine neurons during novel and daily limited access to palatable food is blocked by the opioid antagonist LY255582. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 295:R463-471.
- Sakanaka M, Shibasaki T, Lederis K (1986) Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *Brain research* 382:213-238.
- Sakanaka M, Shibasaki T, Lederis K (1987) Corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in the rat brain as revealed by a modified cobalt-glucose oxidase-diaminobenzidine method. *The Journal of comparative neurology* 260:256-298.
- Sakurai T (1999) Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regulatory peptides* 85:25-30.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:1 page following 696.
- Sakurai T, Moriguchi T, Furuya K, Kajiwara N, Nakamura T, Yanagisawa M, Goto K (1999) Structure and function of human prepro-orexin gene. *J Biol Chem* 274:17771-17776.
- Salamone JD, Correa M (2012) The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron* 76:470-485.
- Salamone JD, Correa M (2013) Dopamine and food addiction: lexicon badly needed. *Biological psychiatry* 73:e15-24.
- Sanacora G, Kershaw M, Finkelstein JA, White JD (1990) Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology* 127:730-737.

- Saper CB (1982) Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. *The Journal of comparative neurology* 210:163-173.
- Saper CB, Chou TC, Elmquist JK (2002) The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36:199-211.
- Sawchenko PE (1983) Central connections of the sensory and motor nuclei of the vagus nerve. *J Auton Nerv Syst* 9:13-26.
- Sawchenko PE, Swanson LW (1983a) The organization and biochemical specificity of afferent projections to the paraventricular and supraoptic nuclei. *Prog Brain Res* 60:19-29.
- Sawchenko PE, Swanson LW (1983b) The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *The Journal of comparative neurology* 218:121-144.
- Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, Lamarque L, Verdie P, Bourrier E, Dehouck B, Baneres JL, Martinez J, Mery PF, Marie J, Trinquet E, Fehrentz JA, Prevot V, Mollard P (2013) Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:1512-1517.
- Schultz W (2006) Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annu Rev Psychol* 57:87-115.
- Schultz W (2010) Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behavioral and brain functions : BBF* 6:24.
- Schwartz GJ, Zeltser LM (2013) Functional organization of neuronal and humoral signals regulating feeding behavior. *Annu Rev Nutr* 33:1-21.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1997) Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46:2119-2123.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
- Shabat-Simon M, Levy D, Amir A, Rehavi M, Zangen A (2008) Dissociation between rewarding and psychomotor effects of opiates: differential roles for glutamate receptors within anterior and posterior portions of the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:8406-8416.
- Sharf R, Guarnieri DJ, Taylor JR, DiLeone RJ (2010) Orexin mediates morphine place preference, but not morphine-induced hyperactivity or sensitization. *Brain research* 1317:24-32.
- Sharma R, Banerji MA (2012) Corticotropin releasing factor (CRF) and obesity. *Maturitas* 72:1-3.
- Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477-485.
- Shin R, Qin M, Liu ZH, Ikemoto S (2008) Intracranial self-administration of MDMA into the ventral striatum of the rat: differential roles of the nucleus accumbens shell, core, and olfactory tubercle. *Psychopharmacology* 198:261-270.
- Shinohara M, Mizushima H, Hirano M, Shioe K, Nakazawa M, Hiejima Y, Ono Y, Kanba S (2004) Eating disorders with binge-eating behaviour are associated with the s allele of the 3'-UTR VNTR polymorphism of the dopamine transporter gene. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 29:134-137.
- Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Luthy R, Stark KL (1997) Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 11:593-602.

- Simantov R, Kuhar MJ, Uhl GR, Snyder SH (1977) Opioid peptide enkephalin: immunohistochemical mapping in rat central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:2167-2171.
- Sindelar DK, Palmiter RD, Woods SC, Schwartz MW (2005) Attenuated feeding responses to circadian and palatability cues in mice lacking neuropeptide Y. *Peptides* 26:2597-2602.
- Skibicka KP, Dickson SL (2011) Ghrelin and food reward: the story of potential underlying substrates. *Peptides* 32:2265-2273.
- Smith GP (1989) Animal models of human eating disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 575:63-72; discussion 72-64.
- Smith GP (2004) Accumbens dopamine mediates the rewarding effect of orosensory stimulation by sucrose. *Appetite* 43:11-13.
- Sokoloff P, Diaz J, Le Foll B, Guillin O, Leriche L, Bezard E, Gross C (2006) The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:25-43.
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347:146-151.
- Spangler R, Wittkowski KM, Goddard NL, Avena NM, Hoebel BG, Leibowitz SF (2004) Opiate-like effects of sugar on gene expression in reward areas of the rat brain. *Brain research Molecular brain research* 124:134-142.
- Steffensen SC, Stobbs SH, Colago EE, Lee RS, Koob GF, Gallegos RA, Henriksen SJ (2006) Contingent and non-contingent effects of heroin on mu-opioid receptor-containing ventral tegmental area GABA neurons. *Exp Neurol* 202:139-151.
- Steffensen SC, Svingos AL, Pickel VM, Henriksen SJ (1998) Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:8003-8015.
- Steketee JD, Kalivas PW (2011) Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacological reviews* 63:348-365.
- Stengel A, Tache Y (2010) Corticotropin-releasing factor signaling and visceral response to stress. *Exp Biol Med (Maywood)* 235:1168-1178.
- Stengel A, Tache Y (2014) CRF and urocortin peptides as modulators of energy balance and feeding behavior during stress. *Frontiers in neuroscience* 8:52.
- Stice E, Figlewicz DP, Gosnell BA, Levine AS, Pratt WE (2013) The contribution of brain reward circuits to the obesity epidemic. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 37:2047-2058.
- Stinus L, Herman JP, Le Moal M (1982) GABAergic mechanisms within the ventral tegmental area: involvement of dopaminergic (A 10) and non-dopaminergic neurones. *Psychopharmacology* 77:186-192.
- Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH, Niznik HB (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350:614-619.
- Swanson LW (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain research bulletin* 9:321-353.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW (1983) Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36:165-186.

- Swart I, Jahng JW, Overton JM, Houpt TA (2002) Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 283:R1020-1026.
- Tanaka C, Asakawa A, Ushikai M, Sakoguchi T, Amitani H, Terashi M, Cheng K, Chaolu H, Nakamura N, Inui A (2009) Comparison of the anorexigenic activity of CRF family peptides. *Biochemical and biophysical research communications* 390:887-891.
- Tanaka M, Naruo T, Muranaga T, Yasuhara D, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S (2002) Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 146:R1-3.
- Ter Horst GJ, de Boer P, Luiten PG, van Willigen JD (1989) Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience* 31:785-797.
- Thompson JL, Borgland SL (2011) A role for hypocretin/orexin in motivation. *Behavioural brain research* 217:446-453.
- Timofeeva E, Picard F, Duclos M, Deshaies Y, Richard D (2002) Neuronal activation and corticotropin-releasing hormone expression in the brain of obese (fa/fa) and lean (fa/?) Zucker rats in response to refeeding. *The European journal of neuroscience* 15:1013-1029.
- Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT (2002) Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 143:1353-1361.
- Tornatzky W, Miczek KA (1993) Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. *Physiology & behavior* 53:983-993.
- Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2003) Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144:1506-1512.
- Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM (1998) Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 438:71-75.
- Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50:707-709.
- Valdivia S, Patrone A, Reynaldo M, Perello M (2014) Acute high fat diet consumption activates the mesolimbic circuit and requires orexin signaling in a mouse model. *PLoS One* 9:e87478.
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350:610-614.
- Veening JG, Swanson LW, Sawchenko PE (1984) The organization of projections from the central nucleus of the amygdala to brainstem sites involved in central autonomic regulation: a combined retrograde transport-immunohistochemical study. *Brain research* 303:337-357.
- Verhoef J, Wiegant VM, De Wied D (1982) Regional distribution of alpha- and gamma-type endorphins in rat brain. *Brain research* 231:454-460.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Hitzemann R, Logan J, Schlyer DJ, Dewey SL, Wolf AP (1993) Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse* 14:169-177.
- Vucetic Z, Reyes TM (2010) Central dopaminergic circuitry controlling food intake and reward: implications for the regulation of obesity. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2:577-593.

- Wang D, He X, Zhao Z, Feng Q, Lin R, Sun Y, Ding T, Xu F, Luo M, Zhan C (2015) Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. *Front Neuroanat* 9:40.
- Wang G, Lee HM, Englander E, Greeley GH, Jr. (2002) Ghrelin--not just another stomach hormone. *Regulatory peptides* 105:75-81.
- Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, Netusil N, Fowler JS (2001) Brain dopamine and obesity. *Lancet* 357:354-357.
- Welch CC, Kim EM, Grace MK, Billington CJ, Levine AS (1996) Palatability-induced hyperphagia increases hypothalamic Dynorphin peptide and mRNA levels. *Brain research* 721:126-131.
- Wellman PJ, Clifford PS, Rodriguez JA (2013) Ghrelin and ghrelin receptor modulation of psychostimulant action. *Frontiers in neuroscience* 7:171.
- Wilson C, Nomikos GG, Collu M, Fibiger HC (1995) Dopaminergic correlates of motivated behavior: importance of drive. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:5169-5178.
- Will MJ, Franzblau EB, Kelley AE (2003) Nucleus accumbens mu-opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:2882-2888.
- Will MJ, Franzblau EB, Kelley AE (2004) The amygdala is critical for opioid-mediated binge eating of fat. *Neuroreport* 15:1857-1860.
- Williams DL (2014) Neural integration of satiation and food reward: Role of GLP-1 and Orexin pathways. *Physiology and Behavior* 136:194-199.
- Williams KW, Elmquist JK (2012) From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nature neuroscience* 15:1350-1355.
- Wise RA (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews Neuroscience* 5:483-494.
- Wise RA (2006) Role of brain dopamine in food reward and reinforcement. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 361:1149-1158.
- Wojnicki FH, Johnson DS, Corwin RL (2008) Access conditions affect binge-type shortening consumption in rats. *Physiology & behavior* 95:649-657.
- Wolf G (1998) Orexins: a newly discovered family of hypothalamic regulators of food intake. *Nutr Rev* 56:172-173.
- Wolf P, Olpe HR, Avrith D, Haas HL (1978) GABAergic inhibition of neurons in the ventral tegmental area. *Experientia* 34:73-74.
- Wolfe BE, Baker CW, Smith AT, Kelly-Weeder S (2009) Validity and utility of the current definition of binge eating. *The International journal of eating disorders* 42:674-686.
- Woolley JD, Lee BS, Fields HL (2006) Nucleus accumbens opioids regulate flavor-based preferences in food consumption. *Neuroscience* 143:309-317.
- Wu Q, Lemus MB, Stark R, Bayliss JA, Reichenbach A, Lockie SH, Andrews ZB (2014) The temporal pattern of cfos activation in hypothalamic, cortical, and brainstem nuclei in response to fasting and refeeding in male mice. *Endocrinology* 155:840-853.
- Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S (2005) Appetite control. *The Journal of endocrinology* 184:291-318.
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL (2008) Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132:387-396.
- Yang N, Liu X, Ding EL, Xu M, Wu S, Liu L, Sun X, Hu FB (2009) Impaired ghrelin response after high-fat meals is associated with decreased satiety in obese and lean Chinese young adults. *The Journal of nutrition* 139:1286-1291.

- Zahm DS (2000) An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 24:85-105.
- Zahm DS, Jensen SL, Williams ES, Martin JR, 3rd (1999) Direct comparison of projections from the central amygdaloid region and nucleus accumbens shell. *The European journal of neuroscience* 11:1119-1126.
- Zangen A, Ikemoto S, Zadina JE, Wise RA (2002) Rewarding and psychomotor stimulant effects of endomorphin-1: anteroposterior differences within the ventral tegmental area and lack of effect in nucleus accumbens. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:7225-7233.
- Zangen A, Solinas M, Ikemoto S, Goldberg SR, Wise RA (2006) Two brain sites for cannabinoid reward. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:4901-4907.
- Zhang M, Gosnell BA, Kelley AE (1998) Intake of high-fat food is selectively enhanced by mu opioid receptor stimulation within the nucleus accumbens. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 285:908-914.
- Zhang M, Kelley AE (2000) Enhanced intake of high-fat food following striatal mu-opioid stimulation: microinjection mapping and fos expression. *Neuroscience* 99:267-277.
- Zhang YQ, Ji YP, Mei J (2000) Behavioral training-induced c-Fos expression in the rat nucleus basalis of Meynert during aging. *Brain research* 879:156-162.
- Zheng H, Berthoud HR (2008) Neural systems controlling the drive to eat: mind versus metabolism. *Physiology (Bethesda)* 23:75-83.
- Zheng H, Patterson LM, Berthoud HR (2007) Orexin signaling in the ventral tegmental area is required for high-fat appetite induced by opioid stimulation of the nucleus accumbens. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:11075-11082.
- Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, Kushner JA, Van Tol HH, Cone R, Pribnow D, Salon J, Bunzow JR, Civelli O (1990) Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature* 347:76-80.
- Zhou Y, Spangler R, Ho A, Kreek MJ (2003) Increased CRH mRNA levels in the rat amygdala during short-term withdrawal from chronic 'binge' cocaine. *Brain research Molecular brain research* 114:73-79.
- Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *The Journal of comparative neurology* 494:528-548.
- Zorrilla EP, Logrip ML, Koob GF (2014) Corticotropin releasing factor: a key role in the neurobiology of addiction. *Frontiers in neuroendocrinology* 35:234-244.

Trabajos Publicados

