

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

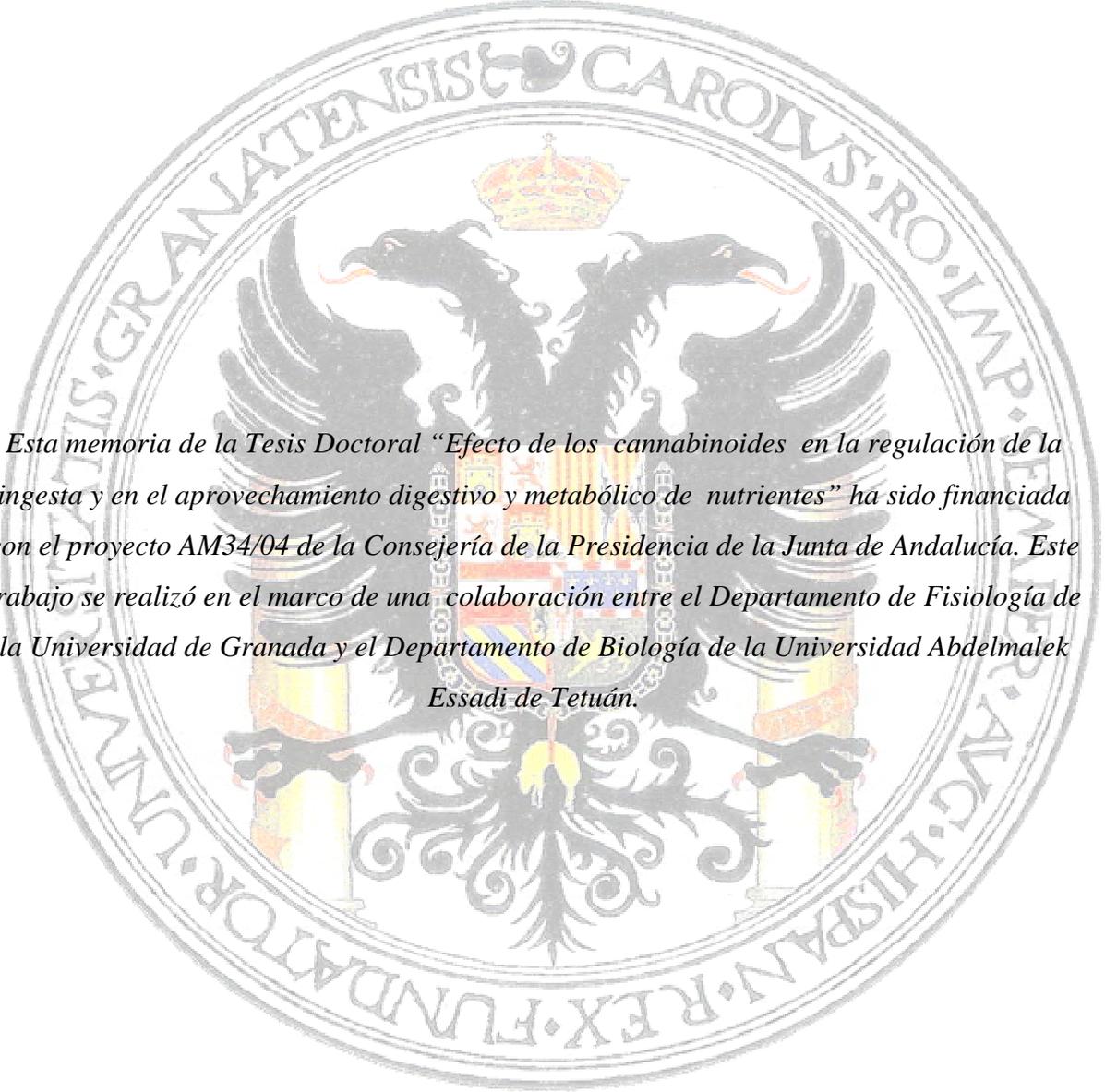


**EFFECTO DE LOS CANNABINOIDES EN LA REGULACIÓN DE LA
INGESTA Y EN EL APROVECHAMIENTO DIGESTIVO Y
METABÓLICO DE NUTRIENTES**

TESIS DOCTORAL

**MERROUN IKRAM
Julio 2008**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ikram Merroun
D.L.: GR.1910-2008
ISBN: 978-84-691-5805-0

The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, flanked by two black eagles with their wings spread. The shield is supported by two golden pillars. The entire emblem is surrounded by a circular border containing the Latin text: "UNIVERSITATIS GRANATENSIS CAROLVS RO IMP SEMPER AVG HISPANV R EX FVNDATOR".

Esta memoria de la Tesis Doctoral “Efecto de los cannabinoides en la regulación de la ingesta y en el aprovechamiento digestivo y metabólico de nutrientes” ha sido financiada con el proyecto AM34/04 de la Consejería de la Presidencia de la Junta de Andalucía. Este trabajo se realizó en el marco de una colaboración entre el Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada y el Departamento de Biología de la Universidad Abdelmalek Essadi de Tetuán.

Prof. Dra. Maria López-Jurado Romero De La Cruz, Profesora Titular Del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

Prof. Dr. Mohammed Errami, Profesor Titular Del Departamento de Biología de la Universidad Abdelmalek Essaadi de Tetúan.

The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central figure of a double-headed eagle with its wings spread, perched on a crown. The eagle's heads are turned outwards, and its beaks are open. The crown is ornate and sits atop the eagle's chest. The entire emblem is surrounded by a circular border containing Latin text: "S. GR. ANATENSIS & CAROLVS. RO. IMP. AVGVSTVS. REX. HISPAN. V. R. EX. FVNDATOR." The text is arranged in a circular path around the central figure.

CERTIFICAN: que el trabajo de investigación que se exponen en la siguiente Tesis Doctoral Titulada **“Efecto de los cannabinoides en la regulación de la ingesta y en el aprovechamiento digestivo y metabólico de nutrientes”**, ha sido realizado bajo su dirección por la licenciada en Biología Animal Merroun Ikram, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada y el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Abdelmaled Essadi (Tetúan) y la encuentran conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada por el Tribunal correspondiente. Y para que conste y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman la presente a Julio de 2008.

Fdo. María López-Jurado Romero de la Cruz

Fdo. Mohammed Errami

**MEMORIA PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR POR
LA UNIVERSIDAD DE GRANADA QUE PRESENTA
MERROUN IKRAM**

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:



**Prof. Dra.
María López-Jurado Romero de la Cruz**

**Prof. Dr.
Mohammed Errami**

**Lda.
D^a Ikram Merroun**

Granada, 2008

*A la memoria de mi padre
A mi madre, por luchar siempre por nosotros
A mi tío, por estar siempre presente
A mis hermanos, por haberme transmitido
todo el amor, el apoyo y el estímulo
A mi cuñado, por el cariño que me ha dado siempre
A mis sobrinos, por hacerme la vida más alegre.*

Dedico este trabajo

Ninguna dedicatoria podría expresar mi gran amor filial, mi gratitud y mi íntimo compromiso, gracias a vuestro estímulo, vuestro sacrificio y vuestro continuo apoyo a lo largo de esta etapa tan difícil he podido alcanzar al final un sueño precioso.

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a todas aquellas personas que, de una forma u otra, con su apoyo o colaboración, han contribuido a la realización de esta Tesis doctoral. Especialmente quiero dar las gracias:

A mi directora, La Prof. Dra. D^a María López-Jurado Romero de la Cruz, por su paciente y continua ayuda, por la confianza que ha mostrado en mí haciéndome formar parte e integrándome en su proyecto de investigación, y por la sincera orientación que siempre he recibido de ella. Sobre todo por ser bella persona por su cariño, apoyo y su amable trato, demostrados desde el primer momento.

A mi director, el Prof. Dr. Mohammed Errami, por haber depositado en mí su confianza, por poner en mis manos todos sus conocimientos, por todas sus enseñanzas y por su continuo estímulo y por el cariño e interés que siempre ha mostrado ayudándome en todo. Su apoyo y su comprensión han sido fundamentales a lo largo de este periodo de formación.

A La Dra. D^a Gloria Urbano Valero, por su ayuda, por su cariño y apoyo, por sus constantes orientaciones y consejos, por todos sus amables detalles y especial preocupación.

A La Dra. D^a Pilar Aranda Ramírez, por su siempre alegre disposición para ayudarme y por su amable trato y su gran ayuda en todas las fases de este trabajo..

Al Dr. Jesús María Porres, Por haberme ofrecido gran parte de su tiempo, de su paciencia y de su magnífica ayuda, por haber sobrevivido día a día a ese trabajo, por haber contado siempre con su maravillosa compañía. Nunca olvidare lo que has hecho por mí. Te lo agradezco mucho Jesús.

A Rosi, por ser siempre tan atenta a ayudarme y por prestarme el tiempo necesario.

A Todos los profesores y miembros del Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia, por su cariñosa acogida y por haberme hecho sentir como en casa:

Al director Miguel Moreno. Al profesor Juan L.Lopis, a M^a José Lupianai, a Antonia Valverde, a María Angustia Montellano, a Elisa....., a todos mil gracias.

A Dr. Jaber Mohammed por haberme recibido en su laboratorio, por su apoyo, su generosidad y su disponibilidad durante mi estancia en poitiers.

A Dr. Afhsaneh Guillard por su simpatía y su disponibilidad para ayudarme a aprender las técnicas de inmunohistoquímica.

A todo el grupo de investigación del instituto de fisiología y biología molecular de Poitiers por su amabilidad, su simpatía y por hacerme muy agradable los días de mi estancia ahí con ellos.

A Javi por toda la ayuda y disponibilidad que me ha prestado.

A mi amiga íntima Naima, por cada momento que hemos vivido juntas, por estar siempre paciente soportando algunos agobios y dándome apoyo y cariño, compartiendo siempre todos los momentos.

A mi amiga Loubna porque sin su ayuda hubiera sido imposible hacer la presentación en power point, siempre estuvo tan cerca cuando la necesito presentándome su amistad, su cariño y soportando mis agobios.

A mis amigos: Lamia, Sulaiman, Abdo, Ali, Said, Hamid; Hsen, Younes, Brahim y Mohamed, por estar siempre dispuestos a ayudarme, por todos los ratos alegres compartidos juntos y por hacerme el día siempre más alegre con sus compañía.

A mi amiga Imane, porque aún en la distancia, se ha mantenido siempre allí, con el amor y el cariño de siempre.

A mis compañeros del laboratorio de la Facultad de Tetuán, Hanae, Lamia, Abdo, Mohamed por su amistad, su ayuda y por los buenos ratos compartidos en este laboratorio.

A toda mi familia, a mis tías, primas..... por el cariño y el apoyo que me habéis dado.

A todos los que me habéis ayudado, muchas gracias porque sin vosotros no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Abreviaturas

- **ARC:** Núcleo arcuato
- **VMN:** Núcleo ventromedial
- **NL:** Núcleo lateral
- **DMN:** Núcleo dorsomedial
- **PVN:** Núcleo paraventricular
- **NTS:** Núcleo del tracto solitario
- **CCK:** Colecistoquinina
- **GLP-1:** Péptido similar a glucagon-1
- **GRP:** Péptido liberador de gastrina
- **PYY:** Péptido YY
- **NPY:** Neuropeptido Y
- **HCM:** Hormona concentrada de melanina
- **CRH:** Hormona liberadora de corticotropina
- **TRH:** Hormona liberadora de Tirotropina
- **AgRP:** Péptido relacionado con agouti
- **CB1:** Receptor cannabinoides
- **CB2:** Receptor cannabinoides
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **SNC:** Sistema nervioso central
- **THC:** Tetrahydrocannabinol
- **I.C.V:** Inyección intracerebroventricular
- **CART:** Péptido regulador de la transcripción de la anfetamina y cocaína
- **POMC:** Proopiomelanocortina
- **5-HT:** Serotonina
- **5 HIAA:** Ácido 5-hidroxiindolacético
- **LCRs:** Líquido cefalorraquídeo sintético
- **Fmol:** Fantamol
- **µg:** Microgramo

- **α -MSH:** Hormona estimuladora de melanocitos
- **HHA:** Hipotálamo-hipofisario-adrenal
- **CBN:** Cannabinol
- **CBD:** Cannabidiol
- **2AG:** 2-araquidonil glicerol
- **VR1:** Receptores vanilloides
- **NO:** Óxido nítrico
- **NOS:** Óxido nítrico sintetasa
- **CaBP:** Calbindina
- **PTH:** Parathormona
- **Pi:** Fósforo inorgánico
- **C.E.C:** Coeficiente de Eficacia en Crecimiento
- **C.D.A:** Coeficiente de Digestibilidad Aparente

SUMARIO

I- Objetivo	1
II- Revisión bibliográfica	4
II-1- Regulación de la ingesta de alimentos	6
II.1.1- Regulación hipotalámica de la ingesta de alimentos	9
II.1.1.1- Núcleos hipotalámicos implicados	9
a- Núcleo arcuato (ARC).....	9
b- Núcleo ventromedial hipotalámico (VMN).....	10
c- Núcleo lateral (NL).....	10
d- Núcleo dorsomedial (DMN).....	11
e- Núcleo paraventricular (PVN).....	11
f- Núcleo del tracto solitario (NTS).....	11
II.1.1.2- Señales aferentes en el hipotálamo que regulan la ingesta de alimentos ... 14	
II.1.1.2.1- Monoaminas.....	14
a- Noradrenalina.....	14
b- Dopamina.....	14
c- Serotonina.....	15
II.1.1.2.2- Neuropéptidos con efectos anabólicos y catabólicos.....	15
II.1.1.2.2.1- Neuropéptidos orexígenos.....	15
a- Neuropéptido Y.....	15
b- Hormona concentrada de melanina (HCM).....	17
c- Orexinas.....	17
d- Péptido relacionado con agouti (AgRP).....	18
II.1.1.2.2.2- Neuropéptidos anorexígenos.....	18
a- Pro-opiomelanocortinas (POMC).....	18
b- Hormona liberadora de la corticotropina (CRH).....	19
c- Hormona liberadora de la Tirotropina (TRH).....	19
d- Péptido regulador de la transcripción de la anfetamina y cocaína (CART)...	20
II.1.2- Regulación periférica de la ingesta de alimentos	20
II.1.2.1- Señales que regulan la ingesta de alimentos a corto plazo	21
II.1.2.1.1- “Feed-back” sensorial.....	21
II.1.2.1.2- Distensión del aparato digestivo.....	21

II.1.2.1.3- Nutrientes.....	22
II.1.2.1.4- Péptidos gastrointestinales.....	23
a. Colecistoquinina (CCK).....	24
b. Péptido similar a glucagon-1 (GLP-1).....	25
c. Bombesina y Péptido liberador de gastrina (GRP).....	25
d. Péptido YY	25
e. Grelina.....	26
II.1.2.2- Señales que regulan la ingesta a largo plazo.....	28
II.1.2.2.1- Leptina.....	28
II.1.2.2.2- Insulina.....	30
II.1.3- Disfunción en el control de la ingesta de alimentos.....	31
II.1.3.1- Anorexia.....	31
II.1.3.2- Obesidad.....	31
<i>II.2- Cannabinoides, sistema endocannabinoide e ingesta.....</i>	33
II.2.1- Cannabis y cannabinoides.....	33
II.2.1.1- Cannabis.....	33
II.2.1.2- Cannabinoides.....	34
II.2.1.2.1- Propiedades.....	34
II.2.1.2.2- Absorción y metabolismo.....	36
II.2.2- Sistema endocannabinoide.....	38
II.2.2.1 – Receptores cannabinoides.....	38
II.2.2.1.1- Receptor CB ₁	39
II.2.2.1.1.1- Distribución.....	40
II.2.2.1.1.2- Mecanismos de transducción de señales de los receptores CB ₁	42
II.2.2.1.2- Receptor CB ₂	44
II.2.2.1.2.1- Distribución.....	44
II.2.2.1.3- Agonistas de los receptores cannabinoides.....	45
II.2.2.1.4- Antagonistas de los receptores cannabinoides.....	46
II.2.2.2- Endocannabinoides.....	49
II.2.2.2.1- Anandamida.....	50
II.2.2.2.2- Araquidonil-glicerol (2AG).....	53

II.2.3- Efectos de los cannabinoides y endocannabinoides	55
II.2.3.1- Efecto inmunomodulador y antiinflamatorio.....	55
II.2.3.2- Efecto cardiovascular.....	56
II.2.3.3- Efecto sobre la actividad motora.....	57
II.2.3.4- Efecto antinociceptivo.....	59
II.2.3.5- Efecto sobre el sistema nervioso central (SNC).....	61
II.2.3.5.1- Efectos psicológicos agudos.....	62
II.2.3.5.2- Efectos cognitivos.....	63
II.2.3.5.3- Efecto neuroprotector.....	64
II.2.3.6- Efecto sobre el aparato digestivo.....	66
II.2.3.6.1- Efecto sobre la ingesta.....	66
II.2.3.6.2- Efecto sobre las secreciones gastrointestinales.....	73
II.2.3.6.3- Efecto sobre la motilidad gastrointestinal.....	74
II.2.4- Fenómenos de tolerancia y dependencia	77
II.3- Utilización nutritiva de la proteína y de los minerales	81
II.3.1- Utilización nutritiva de la proteína	81
II.3.1.1- Aspectos generales.....	81
II.3.1.2- Digestión y absorción.....	82
II.3.1.3- Factores que afectan la absorción de la proteína.....	83
II.3.1.4- Metabolismo.....	84
II.3.2- Utilización nutritiva de calcio	86
II.3.2.1- Aspectos generales.....	86
II.3.2.2- Absorción y transporte.....	88
II.3.2.2.1- Transporte transcelular.....	88
II.3.2.2.2- Transporte paracelular.....	90
II.3.2.3- Factores que afectan la absorción de calcio.....	90
II.3.2.4- Metabolismo.....	91
II.3.3- Utilización nutritiva de fósforo	94
II.3.3.1- Aspectos generales.....	94
II.3.3.2- Absorción y transporte.....	95

II.3.3.3- Factores que afectan la absorción de fósforo.....	96
II.3.3.4- Metabolismo.....	96
II.3.4- Utilización nutritiva de magnesio.....	100
II.3.4.1- Aspectos generales.....	100
II.3.4.2- Absorción y transporte.....	101
II.3.4.3- Factores que afectan la absorción de magnesio.....	101
II.3.4.4- Metabolismo.....	102
II.3.5- Utilización nutritiva de cinc.....	104
II.3.5.1- Aspectos generales.....	104
II.3.5.2- Absorción y transporte.....	105
II.3.5.3- Factores que afectan la absorción de cinc.....	107
II.3.5.4- Metabolismo.....	109
III. Material y Métodos.....	111
III.1- Animales.....	112
III.2- Dieta.....	113
III.3- Fármacos ensayados.....	113
III.4- Administración de los fármacos.....	114
III.4.1- Administración intraperitoneal.....	114
III.4.2- Administración intracerebroventricular. Cirugía.....	114
III.5- Microdiálisis intracerebral.....	117
III.5.1- Preparación de soluciones.....	118
III.5.2- Realización de la microdiálisis.....	118
III.5.3- Protocolo experimental.....	119
III.6- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.....	120
III.6.1- Sistema cromatografico utilizado.....	120
a- Bomba.....	121
b- Inyector.....	121
c- Precolumna.....	121
d- Columna.....	121
e- Detector electroquímico.....	121

f- Integrador.....	121
III.6.2- Fase móvil.....	121
III.6.3- Soluciones estándar.....	122
III.7- Técnica de inmunohistoquímica.....	122
a- Principio.....	122
b- Inyección estereotaxica de los animales.....	123
c- Preparación del material histológico.....	124
d- Protocolo inmunohistoquímico.....	124
e- Montaje de los cortes.....	125
III.8- Diseño experimental para el estudio de la ingesta.....	125
III.8.1- Experimentos a corto plazo.....	125
III.8.1.1- Estudio de la ingesta en 24 horas.....	125
III.8.1.2- Experimentación sobre el control motor (open field).....	126
III.8.2- Experimentos a largo plazo en 10 días.....	127
III.8.2.1- Estudio de la utilización digestiva y metabólica.....	127
III.9- Técnicas analíticas.....	128
III.9.1- Humedad.....	128
III.9.2- Proteína.....	128
III.9.3- Minerales totales.....	128
III.9.3.1- Calcio, Magnesio y Cinc.....	129
III.9.3.2- Fósforo inorgánico.....	129
III.10- Parámetros y índices biológicos utilizados.....	129
III.11- Tratamiento estadístico.....	130
IV. Resultados.....	131
IV.1- Efecto de la Administración intracerebroventricular del agonista y del antagonista/agonista inverso de los receptores cannabinoides: WIN 55,212-2 y AM 251.....	132
IV.2- Efecto de la administración periférica a corto plazo (inyección aguda).....	133
IV.2.1- Ingesta de sólidos.....	133
IV.2.2- Ingesta de líquidos.....	135
IV.2.3- Efecto de la administración periférica del WIN 55,212-2 (5mg/kg) sobre la actividad locomotora y la exploratoria: Open Field.....	136

IV.3- Efectos de los cannabinoides sobre la liberación de la serotonina y su metabolito y la inmunoeexpresion de neuropéptidoY	137
IV.3.1- Serotonina (5-HT).....	137
IV.3.2- Metabolito de la serotonina (5HIAA).....	137
IV.3.3- Neuropéptido Y.....	140
IV.4- Efecto de la administración periférica a largo plazo (inyección crónica)	144
IV.4.1- Ingesta de sólidos y líquidos y cambios ponderales.....	144
IV.4.1.1- Ingesta de sólidos.....	144
IV.4.1.2- Ingesta de líquidos.....	145
IV.4.1.3- Cambios ponderales.....	147
IV.4.2- Efectos de los cannabinoides sobre la utilización digestiva y metabólica de la proteína y de los minerales.....	151
IV.4.2.1- Utilización digestiva y metabólica de la Proteína.....	151
IV.4.2.2- Utilización digestiva y metabólica de Calcio.....	157
IV.4.2.3- Utilización digestiva y metabólica de Fósforo.....	160
IV.4.2.4- Utilización digestiva y metabólica de Magnesio.....	163
IV.4.2.5- Utilización digestiva y metabólica de Cinc.....	167
IV.4.2.6- Contenido mineral en sangre, plasma y eritrocitos.....	170
IV.4.2.6.1- Contenido de calcio en sangre y plasma.....	170
IV.4.2.6.2- Contenido de fósforo en sangre, plasma y eritrocitos.....	171
IV.4.2.6.3- Contenido de magnesio en sangre, plasma y eritrocitos.....	171
IV.4.2.6.4- Contenido de cinc en sangre, plasma y eritrocitos.....	172
V. Discusión	180
V.1- Efectos de los cannabinoides sobre la ingesta de alimento y líquido y la liberación de 5-HT, su metabolito 5HIAA y la inmunoeexpresion de NPY	181
V.1.1- Efecto de la administración central de WIN 55,212-2 y AM 251 sobre la ingesta de alimento.....	181
V.1.2- Efecto de la administración periférica a corto plazo de WIN 55,212-2 y AM 251 sobre la ingesta de alimento y líquido.....	182

V.1.3-	Efecto de los cannabinoides sobre la liberación de la serotonina y su metabolito y la inmunoeexpresion de neuropéptido Y.....	185
V.1.4-	Efecto de la administración periférica a largo plazo de WIN 55,212-2 y AM 251.....	189
V.1.4.1-	Ingesta y cambios ponderales.....	189
V.2-	Efecto de los cannabinoides sobre la utilización digestiva y metabólica de proteína y minerales.....	193
V.2.1-	Efecto de la inyección diaria de WIN 55,212-2 (dosis 0.5, 2 y 5mg/kg).....	193
V.2.1.1-	Sobre la utilización digestiva.....	193
V.2.1.2-	Sobre la utilización metabólica.....	195
V.2.2-	Efecto de la inyección diaria de AM 251 (dosis 1, 2 y 5mg/kg).....	196
V.2.2.1-	Sobre la utilización digestiva.....	196
V.2.2.2-	Sobre la utilización metabólica.....	197
VI:	Conclusiones.....	199
VII:	Bibliografía.....	203

I. OBJETIVO

En los últimos veinte años se ha prestado especial interés al estudio del comportamiento alimentario, dado que las enfermedades ligadas a alteraciones en la regulación de la ingesta son de las principales causas de enfermedad y muerte en la mayoría de los países. El tracto gastrointestinal y el SNC están conectados mediante múltiples conexiones neuronales y endocrinas, tanto a nivel central como periférico (Solomon y col., 2004). Un hecho relevante en la regulación del metabolismo y el balance energético es la existencia de una interacción multifactorial entre estímulos aferentes (nutricionales, nerviosos, endocrinos y metabólicos), provenientes del sistema gastrointestinal, y señales eferentes, producidas por el SNC en respuesta a esos estímulos, que establecen un equilibrio entre el apetito y la saciedad (Tébar y col., 2003; Broberger, 2005) y contribuyen a ajustar el gasto energético. Deficiencias genéticas ó adquiridas en estos mecanismos pueden conducir a muy diversas alteraciones del comportamiento alimentario con el consiguiente desarrollo de patologías ligadas a la ingesta.

Las investigaciones realizadas han demostrado el papel crítico de un sistema de péptidos hipotalámicos en la regulación central de la ingesta (Ahima & Osei, 2001), pero además se requiere una precisa coordinación con las señales que actúan desde la periferia y envían información a los centros nerviosos (Kojima et al, 2004). Por otra parte, con el descubrimiento del sistema cannabinoide endógeno en la última década se ha avanzado en el conocimiento de este complejo mecanismo de regulación, ya que los receptores cannabinoides CB1 y CB2 y sus ligandos endógenos están implicados en numerosos aspectos del comportamiento alimentario (Harrold & Williams, 2003). Los cannabinoides parecen tener, por lo tanto, un papel importante en los sistemas que regulan el apetito y el peso corporal y ejercen una amplia variedad de efectos tanto en el SNC como en otros lugares periféricos: los sistemas inmunitario, cardiovascular, respiratorio, reproductor y digestivo (Pertwee, 200; Felder, 2001).

Los receptores cannabinoides CB₁ están implicados fuertemente en la regulación de la ingesta (Di Marzo y Matías, 2005; Wiley y col., 2005). La activación de estos receptores por los endocannabinoides se considera como un factor central en el control neuronal del apetito (Harrold y col., 2002 a, b). Estos receptores están presentes en el SNC y en los sistemas periféricos. En el cerebro, los receptores CB₁ se han identificado en las estructuras responsables de la recompensa y del balance energético (Cota y col., 2003; Robbe y col., 2003; Pickel y col., 2004). Mientras en los sistemas periféricos, se han identificado en el intestino (Crocí y col., 1998; Kulkarni-Narla y Brown, 2000; Coutts y col., 2002), así como en los hepatocitos (Osei-Hyiaman y col., 2005) y en el tejido adiposo (Bensaid y col., 2003; Cota y col., 2003).

La existencia de estos receptores periféricos permite pensar en que los cannabinoides pueden tener un efecto no sólo sobre la ingesta sino también sobre la utilización nutritiva, a nivel digestivo e incluso metabólico. No obstante, la bibliografía consultada no aporta datos

en este aspecto, que se puede considerar de importancia esencial para valorar el potencial papel de los cannabinoides en la terapia de las enfermedades relacionadas con alteraciones de la ingesta de alimentos y el apetito. El conocimiento de las acciones biológicas asociadas al sistema cannabinoide abre la posibilidad de desarrollar compuestos farmacológicos activos sobre estos receptores. Desde el punto de vista de modulación farmacológica, existen dos posibilidades: potenciación o bloqueo de los efectos asociados a los ligandos endógenos. La primera aproximación pasa fundamentalmente por el desarrollo de agonistas específicos. La segunda aproximación, más reciente en el tiempo, supone el desarrollo de fármacos antagonistas.

Teniendo en cuenta lo expuesto, el presente proyecto de tesis doctoral tiene como objetivos valorar el papel desempeñado por el sistema endocannabinoide en la regulación de la ingesta, precisar los mecanismos neurológicos a través de que los cannabinoides afectan la ingesta, la interacción que puede existir entre el sistema cannabinoide, el sistema serotoninérgico y el NPY, sin olvidar estudiar el efecto de los cannabinoides sobre la utilización digestiva y metabólica de la proteína y de los minerales: calcio, fósforo, magnesio y zinc.

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto AM34/04 de la Consejería de la Presidencia de la Junta de Andalucía. Se realizó en el marco de una colaboración entre el Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada y el Departamento de Biología de la Universidad Abdelmalek Essadi de Tetuán.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

INTRODUCCION

Todo organismo vivo precisa un aporte de nutrientes para el adecuado crecimiento, desarrollo y mantenimiento de sus tejidos, dicho aporte es obtenido gracias a la ingesta alimentaria. La ingesta depende básicamente del comportamiento alimentario, y el apetito es factor principal que influye en ella.

En la conformación del sistema, las señales hormonales, neurales y metabólicas constituyen la parte biológica, mientras que los hábitos de alimentación y los aspectos socioculturales que rigen y regulan la ingesta alimentaria representan la parte psicológica. Estos mecanismos son vitales, ya que de ellos depende de la supervivencia, y están diseñados en particular para proteger al organismo contra la desnutrición y luchar contra la sobrenutrición.

La ingesta es un factor muy complejo donde influyen mecanismos muy diversos:

- La sensación de la saciedad en la que intervienen elementos cognitivos y sensoriales: El olfato y la vista son señales que abren el apetito como acto preparatorio a la ingesta lo que comprende la llamada fase cefálica.

- Los mecanismos fisiológicos intermediarios: a través del nervio vago el cerebro recibe información de los quimio y mecano-receptores del tracto gastrointestinal, que conforman en su conjunto los mecanismos de control posingesta.

- Las vías cerebrales: en la fase posabsortiva los distintos nutrientes son procesados y sus niveles en sangre se convierten en señales de saciedad al alcanzar al cerebro por vía circulatoria.

Este comportamiento tan complejo nos obliga a proponer preguntas:

¿Cuáles son las estructuras que controlan esta función fundamental?

¿Qué sinergia de señales controla este comportamiento?

II.1- Regulación de la ingesta de alimentos

El comportamiento alimentario es un aspecto fundamental en el mantenimiento del peso corporal, de tal forma que permite que la cantidad de energía ingerida se ajuste de forma precisa a la cantidad de energía consumida. Aunque el complejo mecanismo que lo regula se ve influenciado por factores medioambientales que hacen la cantidad de energía ingerida no se correlacione en muchas ocasiones con el gasto energético diario, la mayoría de las personas ajustan el aporte energético al gasto con gran precisión (Edholm, 1977). Este fenómeno refleja la existencia de un proceso de regulación activo, denominado homeostasis de energía, que promueve la estabilidad en la cantidad de energía corporal almacenada en forma de grasa.

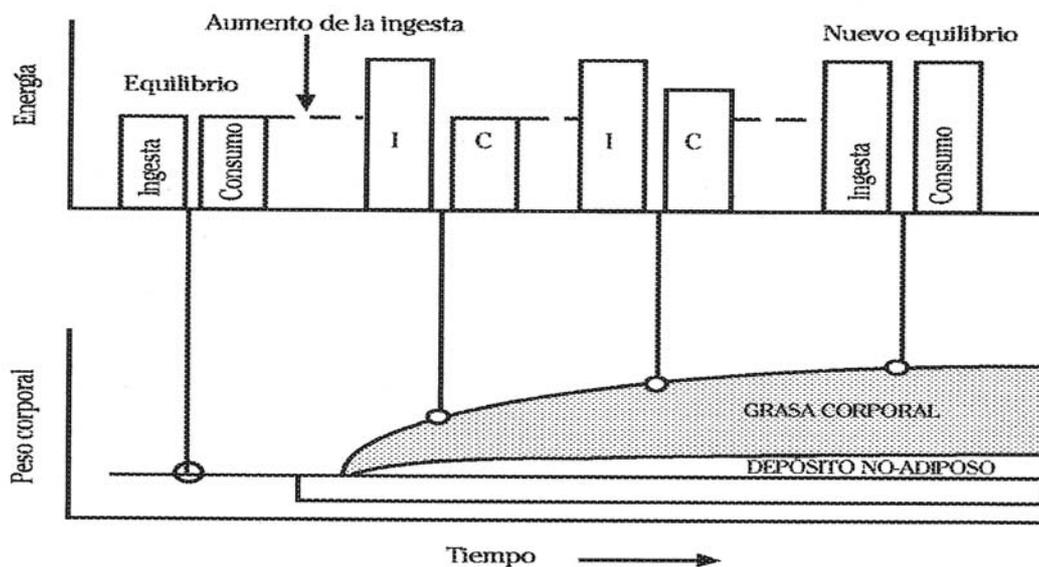


Figura I1: Homeostasis energética: restablecimiento del balance de energía tras un período de sobreingesta (Tomado de Simón y Del Barrio, 2002)

I= Ingesta C= Consumo

El metabolismo energético se define como el conjunto de procesos y reacciones fisico-químicas implicadas en la obtención y transformación de energía a partir de la ingesta de alimentos, para el mantenimiento de las funciones vitales en las células. El organismo destina esta energía fundamentalmente a tres componentes: metabolismo basal, actividad física y efecto termogénico.

Un hecho relevante en la regulación del metabolismo y el balance energético es la existencia de una interacción multifactorial entre estímulos aferentes (nutricionales, nerviosos, endocrinos y metabólicos), provenientes del sistema gastrointestinal, y eferentes, producidos por el SNC en respuesta a las señales periféricas, que establecen un equilibrio entre el apetito

y la saciedad (Tébar y col., 2003; Broberger, 2005) y contribuyen a ajustar el gasto energético.

El tracto gastrointestinal y el SNC se comunican mediante múltiples conexiones neuronales y endocrinas, tanto a nivel central como periférico (Solomon y col., 2004). Entre las zonas superiores relacionadas con la regulación de la ingesta, las más importantes parecen ser los núcleos arcuato, paraventricular y dorsomedial y las áreas hipotalámicas ventromedial y lateral (Solomon y col., 2004), también participa el tallo cerebral, concretamente el núcleo del tracto solitario, que recibe terminaciones nerviosas provenientes del nervio vago (Yamamoto y col., 2003). La estimulación de las neuronas correspondientes produce reflejos viscerales que a través del NTS (Andrews, 2002), regulan tanto funciones gastrointestinales como la sensación de hambre y homeostasis energética. Además, este núcleo recibe también información de circuitos paralelos que provienen del sistema cardiovascular, pulmonar, respiratorio y sensorial (Loewy y col., 1990). Desde el NTS, la información se disemina a regiones del cerebro incluyendo el hipotálamo (Michl y col., 2001) produciendo un sistema complejo de señales promovidas por el apetito, la saciedad, la acomodación y secreción gástrica y motilidad (Konturek y col., 2004). El hipotálamo también recoge señales diversas a través del sistema circulatorio que atraviesan la barrera hematoencefálica. El proceso de estos estímulos modula la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos que participan en la regulación de la ingesta y el peso corporal. Por lo tanto, la sensación de hambre no sólo está controlada a nivel central, sino que también aparecen distintos factores periféricos como pueden ser las señales provenientes del estómago, intestino, hígado, páncreas, etc (Havel y col., 1998), incluso está influenciado por factores emocionales, sociales o de comportamiento (Kishi y col., 2005).

Además hay señales periféricas referentes a almacenes de la energía a largo plazo que son producidas por el tejido adiposo (leptina) y el páncreas (insulina). Estas hormonas se consideran señales de adiposidad que circulan en la sangre de acuerdo a la cantidad de grasa y/o energía almacenada (Wilding, 2002), actúan a nivel hipotalámico reprimiendo el circuito neural anabólico, que estimula la ingesta e inhibe el consumo de energía, mientras que simultáneamente activan el circuito catabólico, que inhibe la ingesta e incrementa el consumo de energía. El descenso de las señales de adiposidad incrementa a nivel hipotalámico la vía anabólica e inhibe la catabólica lo que aumenta la ingesta y disminuye el consumo de energía almacenada.

El control del balance energético a través del apetito y de la termogénesis, así como la estabilidad de la composición corporal se ha explicado a través de diversas teorías como la del peso fijo o ponderostato, la glucostática o glucogenostática, la metabólica o de reparto de nutrientes, a través de la participación del sistema nervioso y neuropéptidos, así como por modelos conductuales (Martínez, 2000). En este sentido, se ha postulado una hipótesis para el

control del peso y composición corporal basada en la existencia de un sistema de regulación compuesto por tres factores interrelacionados: la ingesta, la termogénesis y los depósitos grasos (Broberger, 2005).

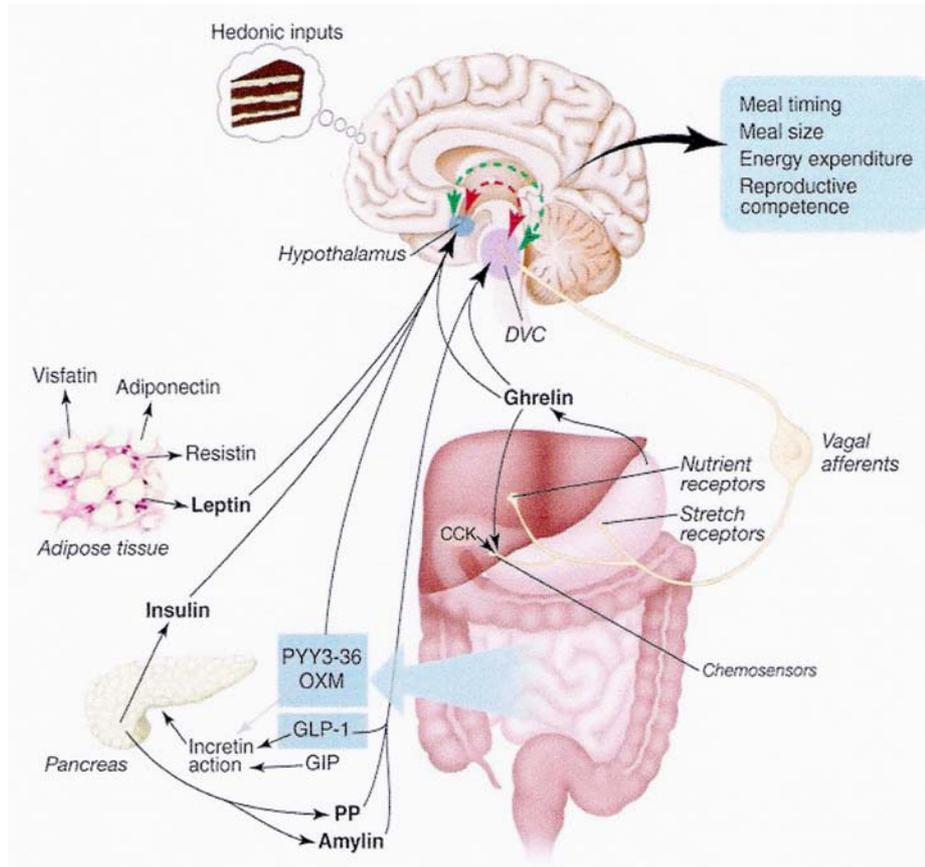


Figura I₂: Interacción entre el SNC y el sistema gastrointestinal en la regulación del metabolismo energético (Tomado de Badman y Flier, 2005).

La llegada de alimentos al aparato digestivo genera una serie de señales neurales, metabólicas y hormonales, conocidas como señales de saciedad que, acopladas con las señales de adiposidad, activan centralmente la percepción de saciedad que interrumpe y regula el tamaño de la comida y modula la cantidad de energía ingerida y acumulada. En resumen, las señales nutricionales, nerviosas, endocrinas y metabólicas producidas por los distintos órganos y sistemas que regulan la homeostasis energética se liberan en respuesta a la situación nutricional y metabólica en que se encuentra el organismo. La integración de este conglomerado de estímulos contribuye al mantenimiento estable del peso y la composición corporal a través de la regulación del balance energético (ingesta y gasto), en el que interactúa el tracto gastrointestinal y SNC mediante señales nerviosas específicas.

II.1.1- Regulación hipotalámica de la ingesta de alimentos

II.1.1.1- Núcleos hipotalámicos implicados

Los mecanismos básicos que regulan el balance energético residen en el SNC a distintos niveles del encéfalo (Leibowitz y col., 1998). El hipotálamo forma parte de un sistema en el cual se integra la regulación de la composición corporal con la ingesta y el gasto de energía. Una serie de estímulos en diferentes sistemas relacionados con el estado metabólico son recibidos en el hipotálamo, los cuales modulan la liberación de péptidos hipotalámicos que regulan la ingesta alimentaria y el eje hipotálamo hipofisiario (Leibowitz y Wortley., 2004).

Se ha demostrado que una serie de circuitos o vías neuronales interconectadas operan localmente en el hipotálamo para regular la ingesta con la información procedente de los depósitos de energía corporal (Woods y col., 1998). Este circuito está formado anatómicamente por el núcleo arcuato (ARC), los núcleos ventromedial (VMN) y lateral (LN) del hipotálamo, el núcleo dorsomedial (DMN), el núcleo paraventricular (PVN). La idea de que estas estructuras intervienen en los mecanismos que regulan el apetito, se basó en los resultados de numerosos estudios que han utilizado lesiones puntuales en el hipotálamo (Brobeck y col., 1946; Luiten y col., 1987).

a) Núcleo arcuato (ARC)

Esta región de la base del hipotálamo es posiblemente la zona más representativa de integración del balance energético (Cone y col., 2001), debido a que contiene una alta densidad de neuronas que producen péptidos orexígenos como el neuropeptido Y (NPY), proteína relacionada con agouti (AgRP) (Everit y col., 1989), opioides, galanina (Crawley., 1995), GABA y glutamato, y anorexígenos como pro-opiomelanocortinas (POMC) y peptido regulador de la transcripción de la anfetamina y cocaína (CART) que transmiten al resto de las áreas hipotalámicas especialmente al VMN y LN, DMN, PVN y área preóptica, donde se expresan otros neuropéptidos (Leibowitz y Wortley., 2004), involucrados en la regulación del balance energético y, a su vez, todas ellas interconectadas bajo distintas vías neuronales, controlando así el apetito y la ingesta (Solomon y col., 2004). Además, el ARC descansa cerca de la barrera hematoencefálica, por lo que las poblaciones neuronales que residen en dicha área son altamente accesibles a los mensajeros que circulan por ella, como pueden ser la leptina, insulina y grelina (Solomon y col., 2004), las cuales atraviesan el epéndimo por difusión desde el fluido cerebroespinal al tercer ventrículo (Elmqvist, 1998).

El ARC contiene ambas neuronas de NPY/AgRP, que cuando se activan, estimulan la ingesta. Estas neuronas son inhibidas por la insulina y la leptina, mientras las neuronas de POMC, que reducen la ingesta, son estimuladas por la insulina y la leptina. Ambos subconjuntos neuronales se proyectan a las áreas hipotalámicas adyacentes incluyendo el

PVN, donde se concentran las neuronas que reducen la ingesta (anorexigénicos), y el LN, que contiene las neuronas que estimulan la ingesta (orexigénicos) (Morton y col., 2006).

En este núcleo, el péptido agouti se expresa en las mismas neuronas que expresan NPY (neuronas AgRP/NPY). Esta co-expresión en la misma neurona supone un incremento del feed-back de la leptina: disminuye la señal orexígena del NPY, y aumenta la acción anoréxica del péptido AgRP, al competir con la acción del receptor α -MSH. Estas neuronas están inhibidas por la leptina, la insulina y el PYY (Blevins y col., 2004), y estimuladas por la grelina (Flier, 2004).

La ablación aguda de las neuronas NPY/AgRP indujo una anorexia profunda en ratones adultos (Luquet y col., 2005; Gropp y col., 2005), pero no en los ratones en los cuales estas neuronas fueron suprimidas por ablación durante el período neonatal (Luquet y col., 2005).

b) Núcleo ventromedial hipotalámico (VMN)

Fue definido como el centro de la saciedad (Williams y col., 2000), pues su estimulación inhibe el apetito, debido a la presencia de gran cantidad de neuronas que expresan receptores de leptina y CCK (Hillebrand y col., 2002), y las lesiones bilaterales inducían hiperfagia y obesidad (Powley y col., 1980). El VMN también es rico en neuronas glucosensitivas, que se activan cuando los niveles de glucosa en sangre son altos, disminuyendo la ingesta. El VMN recibe vías procedentes del ARC (NPY, beta-endorfina y CART) y envía otras hacia el DMN y el PVN. Como el núcleo arcuato, el núcleo ventromedial hipotalámico se demostró recientemente que tiene un papel esencial para la regulación de la leptina y del balance energético (Dhillon y col., 2006), por lo que identificar las neuronas sensibles a esta hormona en esta área hipotalámica se ha convertido en una alta prioridad.

La estimulación del núcleo ventromedial tiene efecto opuesto a la estimulación del hipotálamo lateral y es regulado por la glucosa intracelular. Al aumentar la glucosa intracelular se activa el centro de saciedad y se inhibe el del hambre.

c) Núcleo lateral (NL)

El (NL) es la zona de interacción entre varias zonas cerebrales e hipotalámicas. Lesiones en esta región producen afagia, adipsia y pérdida de peso (Bernardis y col., 1996) lo que permitió sugerir en 1951 que este núcleo era un centro del hambre (Brobeck., 1946; Anand y col., 1951), su estimulación inducía la necesidad de comer y se encontraba reprimido por el VMN. La demostración de que el NL contiene y produce la hormona concentrada de melanina (MCH), orexinas, glutamato y neuronas glucosensitivas, que producen un incremento de la ingesta (Qu y col., 1996; Peyron y col., 1998), apoya la evidencia sobre su participación en la regulación del apetito. Asimismo contiene receptores de leptina, aunque en

una concentración menor que el núcleo arcuato (Kalra y col., 1999). El hipotálamo lateral promueve la utilización de glucosa y la liberación de insulina.

El centro del hambre se encuentra constantemente activado, por lo que es un hecho natural el sentir hambre. El centro de la saciedad envía fibras inhibitorias al centro del hambre, de tal forma que cuando se estimula el centro de saciedad se inhibe el hambre.

d) Núcleo dorsomedial (DMN)

Otra área de interés en el control del metabolismo energético es el núcleo dorsomedial, localizado encima del ARC e importante en la regulación de la ingesta por la gran cantidad de circuitos neuronales provenientes del ARC, PVN, área hipotalámica lateral y tallo cerebral y su alta expresión de receptores de insulina y leptina (Meister, 2000). A su vez, el PVN y el DMN actúan conjuntamente produciendo la iniciación y el mantenimiento de la ingesta (Christophe, 1998). El DMN representa un componente en el circuito que involucra tanto la estimulación como la inhibición de la alimentación y depende, de manera específica, de la leptina.

Las lesiones del núcleo dorsomedial (DMN) producen una disrupción de la ingesta menor que las del VMN. Parece que a su nivel reside el área de interacción entre NPY y leptina, pudiendo representar un componente del circuito involucrado en la atenuación o inhibición de la ingesta inducida por la leptina (Yokosuka y col., 1998).

e) Núcleo paraventricular (PVN)

El PVN situado en la parte superior del tercer ventrículo en el hipotálamo anterior, es un centro integrador donde convergen gran cantidad de rutas neuronales, que están involucradas en la homeostasis energética (Broberger, 2005). Esta región está constituida por gran cantidad de proyecciones neuronales de NPY/AgRP y POMC/CART provenientes del ARC y por neuronas de orexina y MCH localizadas en el LN (Forbes y col, 2001).

La microinyección de NPY, galanina, orexinas, GABA opioides en el PVN estimulan el apetito (Schik y col., 1993) lo que indica la presencia de neuronas con receptores para ellos. El efecto opuesto lo ejercen el CRH y la leptina. La lesión del PVN también provoca hiperfagia e incremento de peso, esto apunta a que el PVN es una zona crucial en la regulación del apetito.

f) Núcleo del tracto solitario (NTS)

El control del apetito y peso corporal también está regulado por el tallo cerebral y médula espinal, encargadas de recoger la información aferente proveniente del nervio vago, que informa sobre el estado nutricional de la persona (Broberger, 2005). La comunicación

entre las rutas metabólicas y el tallo cerebral, en respuesta a señales de saciedad o inicio del hambre, son esenciales para la regulación de la ingesta y la homeostasis energética (Hillebrand y col., 2002). El nervio vago acoge terminaciones nerviosas provenientes de quimio- y mecanoreceptores sensibles a cualquier señal gastrointestinal producida por la distensión, la presencia de nutrientes o metabolitos y la síntesis de péptidos en células endocrinas de la pared del estómago e intestino (Woods, 2004). Toda la información proveniente de los tejidos periféricos termina en la zona del núcleo del tracto solitario, que junto con el hipotálamo mantiene conexiones sinápticas con todo el cerebro (Appleyard y col., 2005).

El NTS es un núcleo localizado en el tronco del encéfalo, que integra toda la información aferente mecánica procedente de las vísceras gastrointestinales, la metabólica procedente del hígado, todas ellas mediadas por el vago, las señales del sentido del gusto procedente de la cavidad oral y las señales humorales periféricas (CCK, enterostatina...), con las señales eferentes de información descendente de las áreas cerebrales involucradas en la homeostasis de energía (Schwartz y col., 2000). Las neuronas del NTS tienen interconexiones recíprocas con áreas del cerebro como el NPV y expresan receptores MC4, de leptina y de POMC, por lo que se admite que es el principal centro integrador de las señales de saciedad que puede procesar información independientemente del resto de los centros hipotálamicos (Emond y col., 1999).

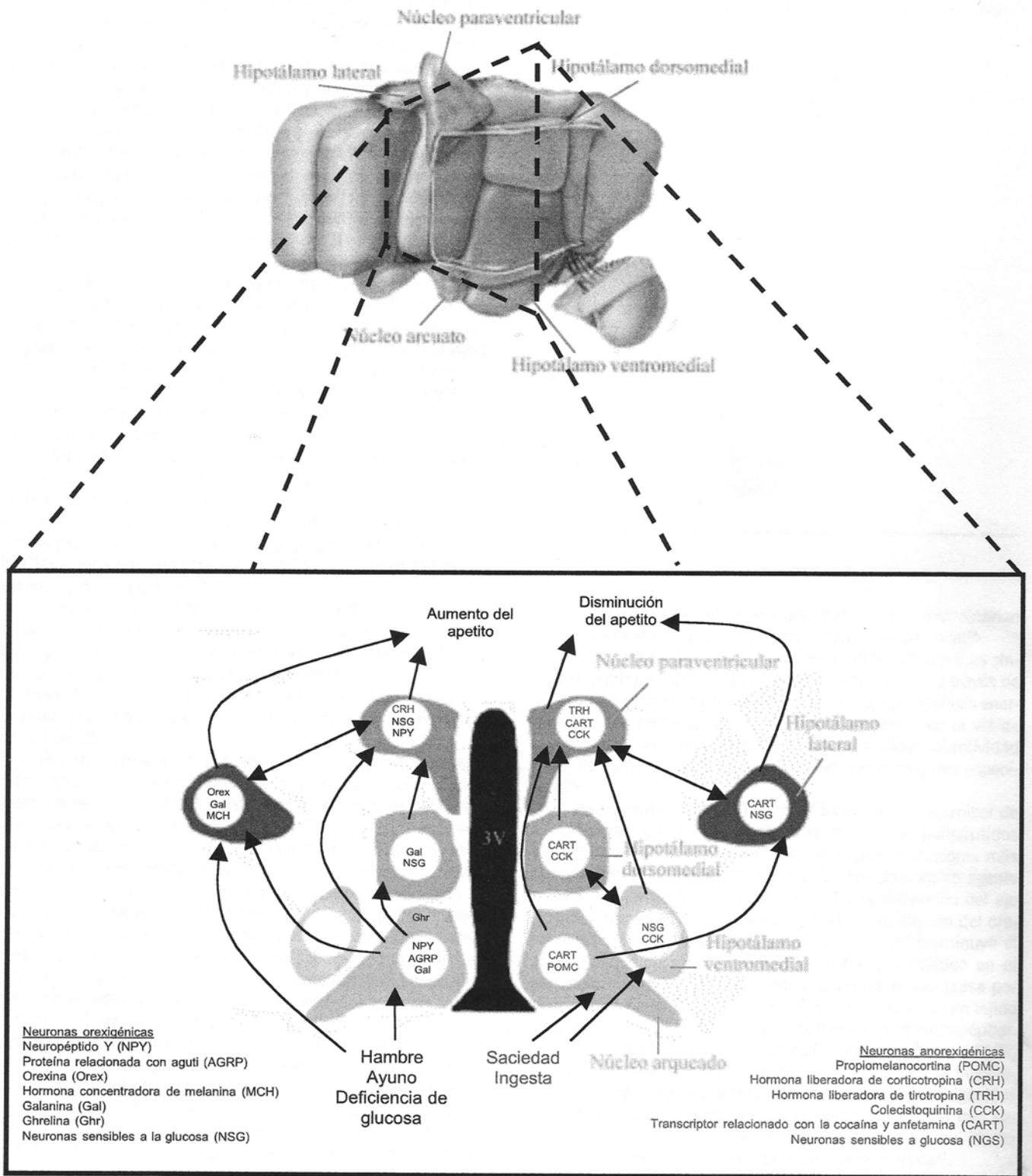


Figura I3: Núcleos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta
 (Tomado de Solomon y Martínez, 2006)

II.1.1.2- Señales aferentes en el hipotálamo que regulan la ingesta de alimentos

II.1.1.2.1- Monoaminas

a) Noradrenalina

Es sintetizada en áreas del tallo cerebral, como el complejo vagal dorsal, estas áreas proyectan al hipotálamo, talamo y corteza. Varios estudios han demostrado que la inyección aguda de adrenalina provoca un aumento importante de la ingesta. La administración de noradrenalina a nivel del PVN induce, a través de receptores de tipo α_2 , un incremento de la ingesta de alimentos y además una elección preferente por los hidratos de carbono frente a grasas y proteínas (Schwartz y col., 1999). El aumento de noradrenalina en el PVN u otras áreas hipotalámicas en ratones deficientes en leptina (ob/ob) puede contribuir a la hiperfagia existente, lo que sugiere una acción anabólica de la noradrenalina sobre el sistema nervioso central (Oltmans., 1983).

b) Dopamina

La dopamina es un neuroregulador, que desempeña un papel fundamental en la comunicación entre células. La dopamina, precursor metabólico inmediato de la noradrenalina y adrenalina, es sintetizada a partir de tirosina. Se puede decir que la dopamina es la catecolamina más importante precisamente porque presenta una localización encefálica más elevada que la noradrenalina. Los cuerpos celulares de las neuronas que contienen dopamina se localizan principalmente en el cerebro medio.

La ingesta alimentaria depende de las señales dopaminérgicas, estas señales pueden estar relacionadas con un profundo déficit en la ingesta alimentaria, este déficit se puede producir por alteraciones farmacológicas y alteraciones genéticas. Los efectos de la dopamina sobre la alimentación, son variables dependiendo de la región cerebral estudiada (Schwartz y cols., 2000) y no se ha demostrado un papel muy claro de ésta en el control de la ingestión de alimentos, aunque se ha descrito una disminución del tono dopaminérgico en humanos que parece correlacionado con el grado de obesidad (Arrizabalaga y cols., 2003), la depleción de dopamina origina un déficit profundo de la ingesta.

La dopamina ejerce un potente efecto inhibitor de la ingesta a nivel de receptores D2 del NL y VMN. Aumenta mucho su secreción en el núcleo accumbens cerebral tras la administración de un antagonista de la dopamina en el LN o un péptido orexígeno (GAL) en el PVN, o como respuesta a determinados sabores del alimento (dulces, sobre todo), lo que indica una vía reguladora de la ingesta entre el hipotálamo y el sistema mesolímbico.

c) Serotonina

La serotonina es el principal mediador inhibitor del núcleo hipotalámico ventro-medial que regula ingesta y saciedad. Este efecto es altamente específico para los hidratos de carbono, necesitando de cofactores centrales y periféricos para actuar sobre los otros nutrientes (proteínas y lípidos). La hiperserotoninergia produce anorexia (Blundell., 1984).

El sistema de la serotonina (5-HT), es utilizado por varios fármacos para el tratamiento de la obesidad que actúan centralmente, como sibutramina y dexfenfluramina, debido a que este sistema está implicado en la percepción de la saciedad. Hallazgos recientes sugieren la posibilidad de que al menos uno de los efectos de la leptina para reducir el peso sea mediado a través del aumento en la intensidad de la señal de serotonina (Calapai y cols., 1999), del mismo modo que este sistema aminérgico parece inhibir el sistema del NPY (Kalra y cols., 1999).

Por otra parte, el papel del sistema serotoninérgico en la transducción de saciedad parece contener además un componente periférico, pues la serotonina intestinal secretada durante la digestión afecta no solo la motilidad intestinal sino que parece que se une a los receptores de serotonina del núcleo del tracto solitario para promover la saciedad (Simansky y cols., 1996).

II.1.1.2.2- Neuropéptidos con efectos anabólicos y catabólicos

Todas las áreas hipotalámicas y extrahipotalámicas sintetizan péptidos que producen diversas señales que a través de conexiones neuronales regulan la ingesta y la homeostasis energética (Broberger, 2005). Los neuropéptidos actúan normalmente por la vía de receptores acoplados a proteína G y pueden variar la actividad neuronal junto con la producción de neurotransmisores específicos (Hillebrand y col., 2002).

II.1.1.2.2.1- Neuropeptidos orexígenos: Comprende un conjunto de péptidos centrales como neuropéptido Y, peptido relacionada con agouti (AgRP), hormona concentrada de melanina, orexinas... cuyo efecto final es aumentar la cantidad de energía ingerida y almacenada.

a) Neuropéptido Y

Es un neurotransmisor de 36 aminoácidos perteneciente a la familia de polipéptidos pancreáticos (PP), que es uno de los neurotransmisores más abundantes en el cerebro (Allen y col., 1983). Se sintetiza en el núcleo arcuato y es conducido al núcleo paraventricular y al hipotálamo ventromedial (Leibowitz y col., 1992). Además de ser un potente agente orexígeno, también está involucrado en la activación del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal (HHA), la regulación del crecimiento y funciones cardiovasculares (Stanley y col., 1986). El

NPY estimula la ingesta cuando se inyecta en el sistema ventricular del cerebro de ratas produciendo hiperfagia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. Estimula preferentemente la ingesta de carbohidratos a través de receptores Y1 y Y5. Estos dos receptores se expresan en los sitios hipotalámicos implicados en la regulación diaria del balance energético y del comportamiento de la ingesta, en el ARC, PVN, DMN, VMN y LN (Kishi y col., 2005). Se ha demostrado que la señalización de los receptores Y1 juega un papel importante en el estímulo de la ingesta y de la obesidad, de hecho se ha visto que los cambios en el balance energético inducen una plasticidad marcada en la función y la expresión de estos receptores en las regiones específicas del hipotálamo (Eva y col., 2006).

De igual forma, inyecciones repetidas de NPY en el PVN producen obesidad en pocos días (Stanley y col., 1996) incrementando la actividad lipogénica en el tejido adiposo blanco y modificando la actividad del sistema nervioso autónomo y la función neuroendocrina (Elmqvist y col., 1999). El NPY es el principal factor causante de hiperfagia y obesidad en situaciones con deficiencia de leptina (Erickson y col., 1996).

La principal localización de este neuropéptido es el ARC, desde donde se prolongan fibras nerviosas al PVN, DMN y LN, estableciendo un efecto estimulador de la ingesta. El NPY interacciona con gran cantidad de neuronas orexigénicas y anorexigénicas, siendo la más evidente la relación con las productoras de proteína relacionada con agouti y su efecto inhibitor en neuronas productoras de melanocortina (Leibowitz y Wortley, 2004).

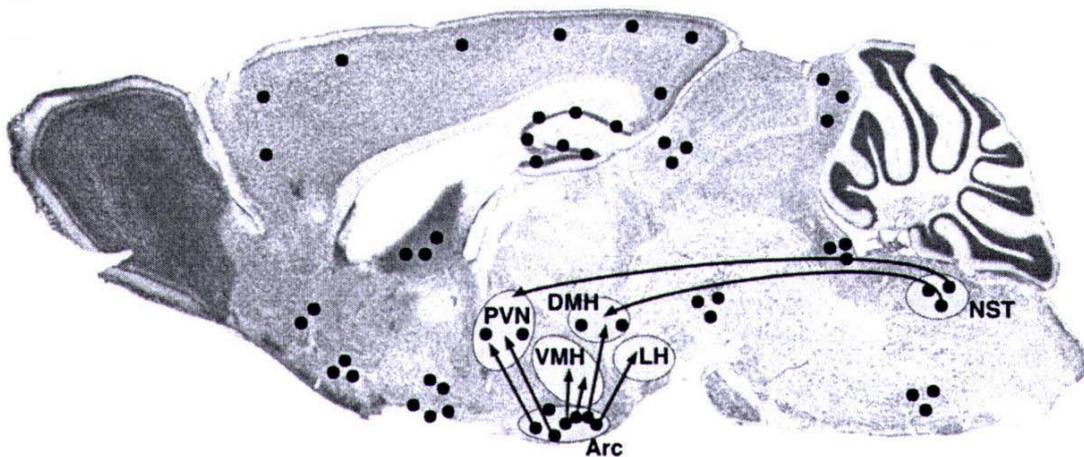


Figura I₄: Distribución de las neuronas que expresan el NPY
(Tomado de Eva y col., 2006)

b) Hormona concentrada de melanina (HCM)

La HCM es otra hormona con acción orexígena cuya síntesis se realiza en el hipotálamo lateral y área perifornical (Kawano y col., 2002) donde su ARNm se expresa en situaciones de ayuno o por la deficiencia de leptina (Viale y col., 1998). Las neuronas de HCM reciben prolongaciones desde el núcleo arcuado (Elias y col., 1998) estimulando el apetito. Además, presentan gran cantidad de conexiones con otras regiones cerebrales involucradas en la regulación del sentido del gusto, olfato y en las sensaciones viscerales (Bittencourt y col., 1992).

Los ratones transgénicos con bloqueo del gen HCM presentan una menor ingestión de alimentos y son extremadamente delgados (Shimada y col., 1998) y cuando se inyecta HCM intraventricularmente en el cerebro estimula la ingesta, pero esta acción no se mantiene de forma crónica (Rossi y col., 1997). Sin embargo con los datos actuales se piensa que puede jugar un papel importante en la regulación del apetito. Aunque su receptor es aún mal conocido, su acción inhibitoria del eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo hace pensar que junto con los otros factores orexígenos (NPY y AgRP), además de regular el apetito sea capaz de disminuir el gasto de energía (Kennedy y col., 2001).

c) Orexinas

Son péptidos orexígenos producidos por neuronas situadas en el área lateral y dorsomedial del hipotálamo (Milagro y Martinez, 2000). Estas áreas proyectan ramificaciones hacia varias zonas hipotalámicas relacionadas con el control del apetito y peso corporal, incluyendo el PVN y el ARC (Peyron y col., 1998), ya que cuando se inyectan en el cerebro intraventricularmente inducen la ingesta de alimentos. Los niveles de ARNm de orexina están regulados por las situaciones de ayuno e hipoglucemia, lo que sugiere un papel fisiológico, influenciado por los niveles de glucosa y la presencia de comida en el tracto gastrointestinal (Delecea y col., 1998; Sakurai y col., 1998). En general, las neuronas productoras de orexinas parece ser que están más involucradas en el control del apetito como una señal de corto plazo que en el control a largo plazo como reguladoras del peso corporal (Havel y col., 1998).

Las orexinas se ligan a dos receptores específicos ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (SNC) pertenecientes ambos al grupo de los acoplados a proteína G (Rodgers y col., 2002). El 50% de las neuronas productoras de orexinas expresan receptores para leptina. Las orexinas se han relacionado también con la ingesta de líquidos y con el sueño pues la delección del gen de orexinas en ratones induce narcolepsia (Taheri y col., 2002).

d) Péptido relacionado con agouti (AgRP)

Este neuropéptido de 132 aminoácidos fue aislado y clonado por la similitud que presentaba respecto a la proteína agouti. Este péptido se coexpresa junto con el NPY únicamente en el núcleo arcuato del hipotálamo aunque se distribuye hacia el NPV y otras regiones del SNC. El AgRP presenta, al igual que el NPY, una potente acción estimulante del apetito y de la ganancia de peso corporal cuando se administra en el SNC. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre, la respuesta a una única inyección de AgRP persiste durante varios días (Hagan y col., 2000).

AgRP antagoniza la unión de la hormona estimulante de los melanocitos alfa (α -MSH) no sólo al receptor 1 de la melanocortina del pelo (MC1), sino también a los receptores 3 y 4 (MC3 y MC4) que se encuentra en el hipotálamo evitando la acción anorexígena de esta hormona, y estimulando por tanto el apetito (Huszar y col., 1997; Nijenhuis y col., 2001). El AgRP también presenta tanto efectos agudos, mediados por el sistema opioide, como a largo plazo regulando el gasto energético y la termogénesis por el sistema de TRH (Fekete y col., 2004).

II.1.1.2.2.2- Neuropéptidos anorexígenos: Comprende los péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina, la hormona liberadora de corticotropina, la estimuladora de la tirotrópina, el péptido regulador de la transcripción de anfetamina y cocaína (CART) etc ..., que tienen por fin reducir la cantidad de energía ingerida y consumir la almacenada.

a- Pro-opiomelanocortinas

Las melanocortinas (MC) son péptidos procedentes de su precursor, la proopiomelanocortina (Pritchard y col., 2002), expresados principalmente en las neuronas del núcleo ARC, que se proyectan sobre áreas que participan en la homeostasis de energía tales como el PVN, el núcleo del tracto solitario y en tejido periférico (Williams y col., 2004). Estas áreas cerebrales expresan receptores de MC, concretamente receptores MC3 y MC4. Los agonistas de estos receptores originan anorexia mientras que los antagonistas tienen el efecto opuesto (Foster y col., 2003).

La POMC es procesada como la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y finalmente da lugar a la formación de la molécula hormona estimuladora de melanocitos (α -MSH). Debido a la presencia del receptor de leptina en neuronas de melanocortina, cuando los niveles de leptina están altos, las neuronas del núcleo arcuato que expresan POMC son estimuladas, disminuyendo el apetito y aumentando la actividad del sistema nervioso simpático asociada a una reducción en la liberación de insulina basal y un aumento de la glucemia (Fan y col., 2000).

La melanocortina endógena más implicada en el control de la ingesta y el peso corporal es la hormona α -MSH, que se une con una gran afinidad a los receptores MC3 y MC4. El ayuno reduce las concentraciones de ARNm de POMC en el núcleo ARC (Schwartz y col., 1997), lo que puede ser consecuencia de una menor señal de la leptina ya que en las neuronas POMC del núcleo arcuato se expresan receptores de leptina (Cheung y col., 1997). La administración de análogos de MSH han demostrado ser eficaces en la pérdida de peso (Forbes y col., 2001).

b) Hormona liberadora de la corticotropina (CRH)

Otro neuropéptido catabólico hipotalámico regulado parcialmente por la leptina y la insulina es la hormona liberadora de corticotropina (CRH), ampliamente distribuida por el cerebro, siendo el PVN la zona donde es más abundante.

El CRH regula el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA), ejerciendo un potente efecto sobre los niveles de ACTH y glucocorticoides (Jacobson L. 1999). Por otro lado, el CRH está íntimamente relacionada con el proceso de estrés producido por el ayuno (Asakawa y col., 2001). Dentro de esta familia peptídica existe la urocortina, que se expresa principalmente en el hipotálamo lateral. Ambos tienen un efecto inhibitorio sobre la ingesta calórica y de la activación del gasto energético (Leibowitz y Wortley, 2004), estimulando el sistema simpático y la lipólisis (Currie y col., 2001). La administración central de CRH reduce la ingestión de alimentos y el peso corporal (Spina y col., 1996) posiblemente por la activación del sistema simpático.

La sobreproducción de CRH está implicada en la anorexia asociada a insuficiencia adrenal y el descenso en la intensidad de la señal de CRH puede contribuir a provocar un aumento de peso y obesidad, ya que descienden los niveles de glucocorticoides que tienen efecto catabólico (Spina y col., 1996).

c) Hormona liberadora de la Tirotropina (TRH)

La hormona liberadora de tirotropina (TRH), es otro péptido que cuando se inyecta intraventricularmente produce un efecto inhibitorio de la ingesta de sólidos y líquidos. Por otro lado, estudios en ratas con su metabolito His-Pro han dado lugar a una disminución de la ingesta y pérdida de peso (Inui. 2000).

Esta hormona de carácter anorexigénico, localizada en el PVN, recibe terminaciones nerviosas de otras áreas hipotalámicas como DMN estimulando el gasto energético a través de la termogénesis (Hillebrand y col., 2002), e interactuando con el eje HHA.

d) Péptido regulador de la transcripción de la anfetamina y cocaína (CART)

El CART se expresa en el núcleo arcuato, en las mismas neuronas que el POMC (neuronas POMC/CART), en el núcleo paraventricular, en el dorsomedial y área hipotalámica lateral (Gautvik y col., 1996), en la hipófisis y médula adrenal (Kuhar y Yoho, 1999), produciendo un efecto de inhibición en la ingesta, en la activación del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal (HHA) y termogénesis (Sainsbury y col., 2002). También tiene un marcado efecto anorexígeno cuando se inyecta en el sistema ventricular del cerebro (Lutheshi y col., 1999). En el ratón ob/ob se encuentra en escasa cantidad pero tras administración de leptina se normaliza (Kristensen y col., 1998), lo que demuestra la importancia de está en su regulación.

Además, el CART inhibe la secreción y el vaciado gástrico, incrementando la circulación de ácidos grasos, probablemente regulado por la actividad de la leptina (Eleftheriou y col., 2005). El CART actúa sobre el núcleo PVN regulando funciones autonómicas y neuroendocrinas relacionadas con la alimentación pero no modifica el gasto de energía por lo que su acción parece ser exclusivamente inhibidora del apetito. Las neuronas del núcleo ARC que producen CART proyectan a otros núcleos hipotalámicos como: PVN y LN.

II.1.2- Regulación periférica de la ingesta

Uno de los sistemas periféricos que informan de manera relevante al SNC sobre la situación nutricional del individuo es el tracto gastrointestinal (Konturek y col., 2004). El aparato digestivo transforma y degrada los alimentos mediante procesos mecánicos y químicos para facilitar la asimilación de los nutrientes contenidos en ellos (Woods, 2004). Dichos procesos se acompañan de señales nerviosas y de la estimulación y secreción de distintas hormonas y péptidos, que mediante señalizaciones periféricas pueden informar al sistema nervioso central de la situación nutritiva y metabólica (Stanley y col., 2005). Por otro lado no se pueden excluir ambas conexiones de otro sistema esencial de la regulación de la ingesta y balance energético: el tejido adiposo (Erlanson-Albertson, 2005).

Además de todas las hormonas descritas, es evidente que los nutrientes ingeridos y las señales nerviosas de distensión afectan a la expresión de péptidos que regulan la sensación de hambre, el metabolismo energético y el peso corporal (Leibowitz y Wortley, 2004; Erlanson-Albertson, 2005). Moléculas como la glucosa, los aminoácidos y los ácidos grasos producen señales sobre el SNC. Por ejemplo, un estado de hipoglucemia promueve la activación de neuronas orexigénicas y glucosensitivas localizadas en el hipotálamo que estimulan la ingesta de alimentos (Oomura, 1990). Las señales de saciedad generadas por mecano y quimiorreceptores provenientes del tracto gastrointestinal y órganos anejos afectan a la ingesta de alimento (Woods, 2004), influyendo sobre el apetito mediante la activación de neuronas del hipotálamo y del cerebro medio a través del nervio vago (Thorens y Larsen,

2004), o atravesando directamente la barrera hematoencefálica (Broberger, 2005). Por otro lado, en las señales provenientes del tejido adiposo participan hormonas secretadas al sistema circulatorio en relación a la cantidad de grasa almacenada (Williams y col., 2004). Las hormonas y péptidos periféricos y señales sensoriales producidas por el sistema gastrointestinal y tejido adiposo generan señales orexigénicas o anorexigénicas con destino al SNC, que afectan al apetito y la composición corporal (Badman y Flier, 2005).

II.1.2.1- Señales que regulan la ingesta de alimentos a corto plazo

El número de comidas por día y los ritmos de alimentación pueden variar ampliamente según la disponibilidad y tipo de comida, oportunidad, situación social u otras condiciones, y, sin embargo, la mayoría de personas mantienen estable, a largo plazo, su peso corporal. Probablemente el control de la ingesta se puede describir mejor considerando, separadamente, dos sistemas de regulación, a corto y a largo plazo, si bien las señales de adiposidad, proporcionales al tamaño de reservas grasas (control a largo plazo), funcionan, al menos en parte modulando la efectividad de las señales de saciedad (que regulan el tamaño y la duración de las comidas individuales a corto plazo), y la integración de ambos tipos de señales conecta la regulación a corto y a largo plazo de la ingesta (Woods y col., 2000).

Tradicionalmente, se ha mantenido que el deseo de comer se iniciaba cuando la glucemia o los lípidos descendían y la saciedad se producía cuando se reponían sus valores, pero esta simple visión del problema enmascara, realmente, todas aquellas señales que, actuando de “feed-back”, inician o terminan a corto plazo una comida:

II.1.2.1.1- “Feed-back” sensorial: Una serie de señales sensoriales tales como la apariencia, olor, sabor, textura y temperatura de los alimentos son transportadas al sistema nervioso central a través de los pares craneales: I, II, V, VII, IX y X, aportando las posibles fuentes de localización de los alimentos para iniciar la ingesta. En conjunto, comprenden la denominada fase cefálica en la que la respuesta insulínica parece que media el efecto estimulante del hambre inducido por la palatabilidad y sabor dulce de los alimentos. Junto a este “feed-back” positivo se acopla otro negativo en el que la detección por receptores orofaríngeos del total calórico ingerido contribuye a la generación de señales para la terminación de la comida, jugando un papel primordial la sensibilidad del gusto a la palatabilidad de los alimentos; de hecho, un alimento ingerido continuamente se hace menos palatable y es comido cada vez en cantidades menores (Geiselman. 1996).

II.1.2.1.2- Distensión del aparato digestivo: Los receptores para el estiramiento o dilatación del aparato digestivo pueden detectar el volumen de comida ingerida, y los situados a nivel orofaríngeo, esofágico, gástrico e intestinal pueden aportar señales para finalizar una comida a través de un mecanismo de “feed-back” negativo. Las señales para la terminación de la comida alcanzan el cerebro por vía vagal, aunque solamente parecen

operativas cuando el volumen ingerido es grande. Por otra parte, la distensión duodenal, en ausencia de distensión gástrica puede producir saciedad también a través del vago (Geiselman. 1996).

La entrada de comida en el tracto digestivo genera una serie de señales mecánicas (distensión gástrica) y químicas (derivadas de nutrientes y de osmosensores situados en el intestino delgado que responden a los productos de la digestión) que se transmiten desde receptores vagales del tracto gastrointestinal al SNC, y contribuyen a la regulación a corto plazo de la ingesta.

II.1.2.1.3- Nutrientes: La composición en nutrientes, junto con las propiedades físicas del alimento (peso, volumen, textura, aromas y sabores), afecta la intensidad y duración de la sensación de saciedad (Palou y col., 2004c).

Se considera que las proteínas son los macronutrientes con un mayor poder saciante, que deriva, entre otras cosas, de la capacidad de las proteínas intactas de inducir la secreción de CCK (Blundell y col., 2002). Los aminoácidos pueden influenciar la ingesta a través de acciones directas en el SNC o vía receptores localizados en el hígado o la vena porta (Nijima y Seguid, 1995). Algunos aminoácidos (fenilalanina, triptófano) y péptidos (dipéptido fenilalanina-aspartato, macropéptido de caseína) tienen un efecto saciante por sí mismos actuando a nivel del tracto gastrointestinal, y algunos son precursores de neurotransmisores implicados en el control central de la ingesta (el triptófano, por ejemplo, es precursor de la serotonina, neurotransmisor que media los efectos de las señales de saciedad a corto plazo) (Rogers y Blundell, 1994). Diversas fluctuaciones en los niveles circulantes de aminoácidos se han asociado a alteraciones en el apetito (Bray, 1997).

Los carbohidratos tienen un poder saciante parecido al de las proteínas. Su interacción con receptores específicos del intestino delgado se traduce en la secreción de péptidos saciantes, como el GLP-1 y la amilina, y en retraso del vaciamiento gástrico y del tránsito intestinal (Feinle y col., 2002). Por otra parte, es posible que cambios en la concentración circulante de glucosa o en su utilización puedan ser una señal de inicio o finalización de la comida, de acuerdo con la hipótesis glucostática (Mayer, 1953). Así, se ha demostrado la presencia de neuronas sensibles a la glucosa en el hipotálamo y en otras áreas del cerebro implicadas en la regulación de la ingesta, y parece claro que la concentración circulante de la glucosa y los cambios en el metabolismo glucídico podrían ser señales importantes reconocidas por el SNC que participarían en la determinación del inicio de la ingesta (Campfield y col., 1996).

Las grasas tienen también un poder saciante pero menor que los otros macronutrientes (Blundell y col., 1996). Se sabe, por ejemplo, que los desayunos ricos en grasa (en comparación con los ricos en hidratos de carbono) van seguidos de una ingesta mayor de

comida durante la mañana (Blundell y col., 1993). La composición en ácidos grasos puede jugar un cierto papel, siendo más saciantes las grasas ricas en ácidos grasos de cadena corta y en poliinsaturados (Alfenas y Mattes, 2003). La absorción intestinal de grasas estimula la producción en el intestino y en el hipotálamo de apolipoproteína AIV (apo AIV), una glicoproteína que podría estar implicada en la inhibición central de la ingesta (Liu y col., 2001). El consumo crónico de una dieta rica en grasa reduce la respuesta de la apo AIV a los lípidos, lo que podría explicar en parte por qué este tipo de dietas predisponen a la hiperfagia y la obesidad (Tso y col., 2001). Por otra parte, se confiere también cierta relevancia a las reservas fisiológicas de lípidos (teoría lipostática) de tal modo que receptores en el sistema nervioso central detectan y regulan las concentraciones de metabolitos grasos (ácidos grasos, 3-hidroxiacetato) que señalizan el tamaño de los depósitos grasos.

Junto a las dos teorías fundamentales, varios autores han comunicado que, independientemente del tipo de alimento ingerido, la disminución de la oxidación se asocia con hambre, y su incremento con saciedad (teoría energostática), además de que el calor generado por el metabolismo de los nutrientes incrementa la temperatura que puede actuar, de acuerdo con la teoría termostática, como un supresor de la ingesta (Fried y col., 1986).

II.1.2.1.4- Péptidos gastrointestinales: De las posibles señales gastrointestinales que inducen saciedad hay una serie de péptidos liberados localmente durante o después de la comida, siendo influenciados alguno de ellos por nutrientes específicos. Estos péptidos pueden actuar localmente de forma auto o paracrina, o pueden ser liberados a la circulación y actuar de forma endocrina (Plata-salaman. 1991). Los péptidos de saciedad informan al cerebro a través de los nervios periféricos (fibras vagales aferentes) y de los receptores del propio cerebro. Esta información es transmitida al núcleo del tracto solitario que integra señales aferentes que llegan desde la lengua (gusto) y del sistema gastrointestinal, desde donde pasa al hipotálamo y otras áreas del cerebro. Su acción se combina con otras señales como la distensión gástrica que actúa sinérgicamente. El bloqueo de estos péptidos endógenos con antagonistas específicos aumenta la ingesta de comida (Woods. 1998).

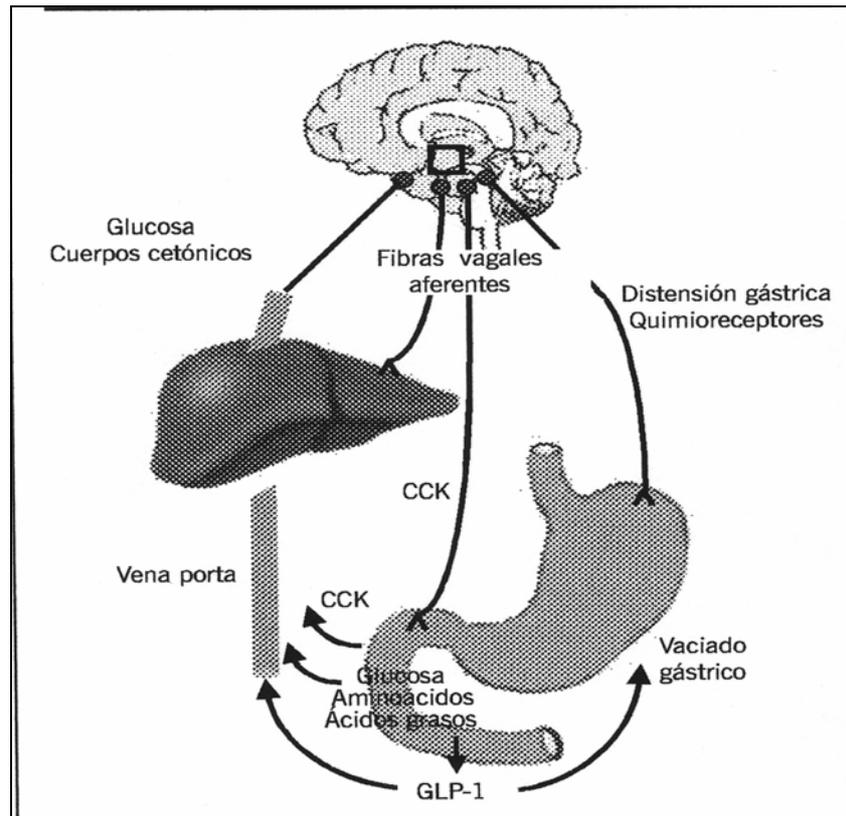


Figura 15: Señales implicadas en la regulación a corto plazo de la ingesta
(Tomado de Palou y col., 2004)

Entre los péptidos intestinales más relevantes destaca la colecistoquinina (CCK), la bombesina, la grelina, el GLP-1 y PYY.

a) Colecistoquinina (CCK)

La colecistoquinina (CCK) es una hormona de 33 aminoácidos producida en células endocrinas del intestino delgado se secreta en respuesta principalmente a la grasa de la dieta y a aminoácidos y pequeños péptidos liberados durante el proceso de la digestión (Woods y col., 1998). Se produce también en el SNC y se libera desde las neuronas hipotálamicas durante la ingesta (Schick y col., 1987). La CCK inhibe la ingesta por activación del receptor específico de tipo A (CCKA) (Moran y col., 1992; Woods y col., 1998). Además, la CCK produce un efecto paracrino, paralelamente con señales de distensión de la pared estomacal, sobre neuronas del nervio vago, disminuyendo la sensación de hambre (Moran y col., 1998). El efecto anorexigénico del CCK depende de la señalización correcta de la leptina (Wang y col., 2000). Ha sido la más estudiada desde que Gibas y col, en 1973, comunicaron por primera vez que su administración intraperitoneal suprimía la ingesta en la rata y en los humanos (Gibbs y col., 1973, 1986).

Parece que la CCK al unirse a su receptor CCKA, origina una contracción pilórica que retrasaría el vaciamiento gástrico, generando de esta forma una señal de saciedad, que se desplaza a través del nervio vagal hasta el núcleo del tracto solitario produciendo el cese de la ingesta (Corwin y col., 1991). De hecho, la vagotomía parece bloquear el efecto de la CCK (Bray y col., 1979). Además de esta acción periférica, la CCK ejerce un efecto central a través de su receptor CCKB, disminuyendo la ingesta e incrementando la actividad simpática (Crawley y col., 1994).

b) Péptido similar a glucagon-1 (GLP-1)

Es un péptido de 21 aminoácidos producido en el estómago, intestino, páncreas e hipotálamo (Holst, 1997). GLP-1 inhibe el vaciado gástrico, la secreción de glucagon y estimula la secreción de insulina (Flint y col., 2001). Este péptido gastrointestinal afecta directamente a las áreas hipotalámicas del PVN y el ARC a través del tallo cerebral, disminuyendo la ingesta (Gutzwiller y col., 1999; Kaushik y col., 2005). GLP-1 inhibe también el apetito en ratas en ayunas (Schwartz y col., 1999) y parece que actúa como mediador de los efectos anorexígenos de la leptina. Estudios han demostrado que la administración central del GLP-1 produce disminución aguda del consumo de alimentos y de agua (Turton y col., 1996).

c) Bombesina y Péptido liberador de gastrina (GRP)

La bombesina es un péptido de 14 aminoácidos sintetizado en el tracto gastrointestinal y el SNC presenta acciones similares a la CCK, ya que inhibe el apetito estimulando la síntesis y liberación de otros péptidos anorexígenos como la CCK y la gastrina (Lu y col., 1986). Además existen estudios que sugieren que la bombesina disminuye el apetito y el coeficiente respiratorio (Corwin y col., 1992). Un homólogo de la bombesina es el péptido liberador de gastrina (GRP), que favorece la síntesis de gastrina disminuyendo la ingesta por procesos de saciedad (Lieverse y col., 1993).

Cuando llegan los alimentos al estómago, lo distienden, lo que estimula la secreción de Bombesina/GRP la cual ejerce una acción directamente sobre el hipotálamo lateral como los neurotransmisores. Numerosos estudios han demostrado que la bombesina/ GRP participa de forma importante en el control de la función gástrica, actuando tanto a nivel central como periférico (Martínez y Taché., 2000) y otros han demostrado que reducen la ingestión de alimentos en animales y humanos (Gutzwiller., 1994).

d) Péptido YY (PYY):

Es una hormona gastrointestinal de 36 aa aislada del intestino del cerdo por Tatemoto en 1980, perteneciente a la familia del polipéptido pancreático y NPY (Tatemoto y col., 1980). Es secretada por las células L del intestino, localizadas fundamentalmente en el

intestino distal, páncreas y cerebro. Existen dos formas endógenas, la 1-36 y la 3-36. En ayuno predomina la forma 1-36 mientras que después de una comida la mayor forma circulante es la 3-36 que aumenta a los 15 minutos reflejando el tamaño de la comida y su naturaleza pues la grasa es el secretagogo fundamental (Batterham y col., 2003). El PYY pertenece a la familia del NPY ejerciendo un efecto inhibitor sobre el apetito y disminuyendo la ingesta en humanos (Batterham y col., 2003). Este péptido afecta principalmente a neuronas anorexigénicas de melanocortina localizadas en el ARC, sugiriendo que el PYY es un importante regulador a corto plazo de la ingesta (Small y Bloom, 2004).

Además, inhibe la secreción gástrica estimulada, la secreción pancreática exocrina, regula la secreción vegetativa de insulina y elentece el vaciamiento gástrico (Freddie y col., 1991). En los sujetos obesos, el PYY reduce la ingesta en un 30%, reduce significativamente la secreción de grelina y sus concentraciones basales y estimuladas son significativamente menores que en los controles no obesos (Batterham y col., 2003).

e) Grelina

Es un péptido de 28 aminoácidos, y es un importante factor orexígeno (Lazarczyk y col., 2003), originado fuera del SNC pero que ejerce su efecto a este nivel. Se produce fundamentalmente en el estómago, así como en el duodenum, el íleo y el colon (Hosoda y col., 2002) y en menor proporción en el riñón, el corazón y el páncreas. La grelina se implica directamente en el control a corto y a largo plazo de la ingesta (Wang y col., 2002a). En contraste con otras hormonas del tracto gastrointestinal, su administración periférica induce en ratas un incremento de la ingesta y del peso corporal, y diversos estudios muestran que los niveles circulantes de grelina son elevados en el ayuno y se reducen en respuesta a la alimentación (Palou y col., 2004b).

Su mecanismo de acción es consecuencia de una interacción competitiva con la leptina en la regulación de la ingesta, junto con la estimulación de la expresión de ARNm y la síntesis de NPY y AgRP (Nakazato y col., 2001). Puede considerarse, por tanto, como un regulado positivo del NPY (Seoane y col., 2004). En la población obesa los valores de grelina se encuentran bajos (Tschop y col., 2001), al igual que ocurre en personas normales tras la comida. Independientemente de su acción sobre el balance energético, la grelina es un agonista endógeno de la hormona de crecimiento (Kojima y col., 2001).

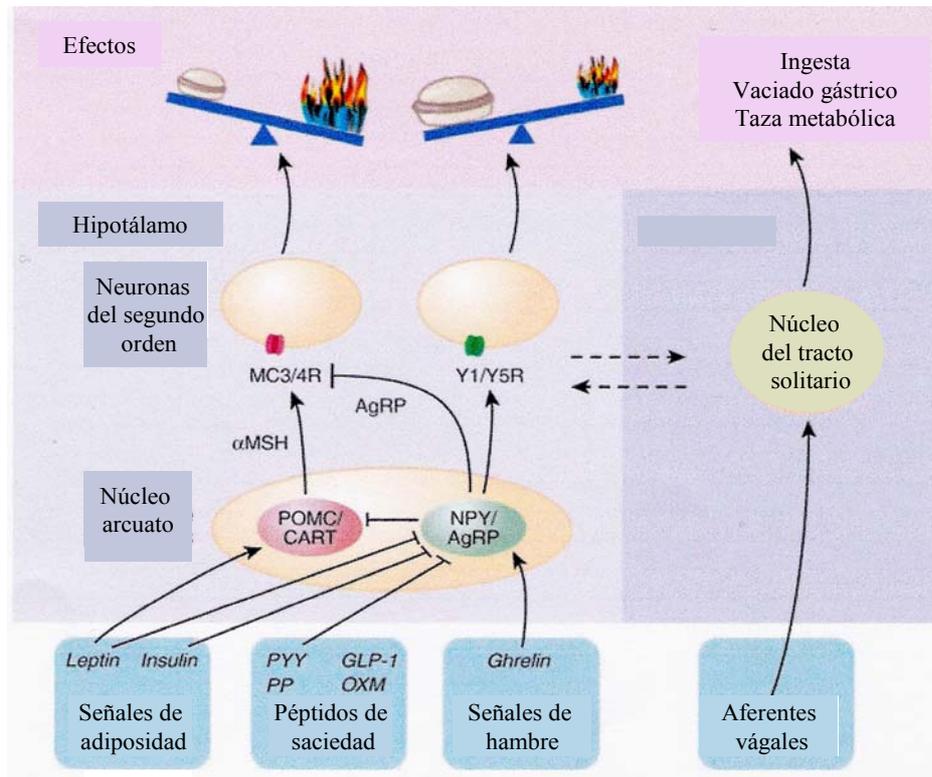


Figura I₆: Representación simplificada de la acción de los péptidos del tracto gastrointestinal en el hipotálamo (Tomado de Badman y Flier, 2005).

El acceso de agentes circulantes al núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo es facilitado por la barrera hematoencefálica. Las neuronas primarias en el ARC contienen múltiples péptidos neuromoduladores. Las neuronas que inhiben la ingesta contienen los péptidos de proopimelanocortina (POMC) como la hormona estimuladora de melanocortina (α MSH), que actúa sobre los receptores (MC3 y MC4), el péptido CART, mientras las neuronas que activan la ingesta contienen el NPY que actúa sobre los receptores Y1 y Y5, el péptido relacionado con agouti (AgRP), que antagoniza la actividad de los receptores MC3/4.

La integración de señales periféricas dentro del cerebro implica la interacción entre el hipotálamo y las estructuras del cerebro posterior incluyendo el NTS, que recibe aferencias vágales. Las entradas de la corteza, de la amígdala y de los núcleos del tallo cerebral se integran también, con efectos resultantes sobre el tamaño y frecuencia de la comida, el manejo del alimento ingerido por el tracto gastrointestinal y los gastos energéticos (Badman y Flier, 2005.; Figura I₆).

No obstante, en contra de lo que cabría esperar, la administración repetida de péptidos de la saciedad no modifica el peso corporal ya que, aunque en las ratas se observa una reducción de la cantidad de cada comida, existe una compensación mediante el aumento del número de comidas espontáneas por lo que estos péptidos tienen una influencia limitada en la adiposidad. Este hecho implica la existencia de otras señales que actúan a largo plazo.

II.1.2.2- Señales que regulan la ingesta a largo plazo

Se han postulado una serie de señales humorales que son generadas en proporción a la adiposidad, y que actúan a nivel del SNC para modular la ingesta y el gasto energético (Martínez., 2000). El mecanismo de regulación mediado por estas señales se mantendría durante periodos largos de tiempo interaccionando con sistemas neuronales cerebrales específicos caracterizados por la síntesis de diversos neuropéptidos y monoaminas (Schwartz y col., 1999). Todos estos neuropéptidos tienen en común, una marcada influencia sobre la ingesta y el gasto energético, y están regulados por las señales endocrinas originadas por la adiposidad.

La insulina y la leptina se han propuesto como “señales de adiposidad” para el control central y a largo plazo del peso corporal. Los cambios en los niveles plasmáticos de leptina y/o de insulina reflejarían cambios en el estado energético y la adiposidad, frente a los cuales, el SNC responde ajustando la ingesta para restablecer el tamaño de los depósitos grasos.

II.1.2.2.1- Leptina

La leptina es un péptido de 146 aminoácidos que se sintetiza mayoritariamente en el tejido adiposo y también en el estómago (Canello y col., 2004; Guilmeau y col., 2004) y circula en sangre en relación con la grasa corporal, cuyo efecto principal es la inhibición del apetito y la regulación del peso corporal a largo plazo (Flier, 2004; Friedman, 1998). La leptina atraviesa la barrera hematoencefálica hacia el hipotálamo estimulando neuronas anorexigénicas y glucosensitivas, reduciendo la sensación de apetito y la ingesta a través de acciones sobre el ARC, PVN, DMN y VMN, y ejerce la mayor parte de sus efectos sobre el balance energético a nivel central, tras su interacción con receptores presentes en neuronas hipotalámicas y otras regiones del cerebro (Tartaglia y col., 1995; Cowley y col., 2003). También se ha demostrado que la leptina está involucrada en la regulación del gasto energético y en procesos de lipólisis (Fruhbeck y col., 2001; Coppack y col., 2001).

El receptor de la leptina se expresa también en tejidos adiposo blanco y marrón, sobre los que la hormona tiene efectos directos. Aunque el tejido adiposo es la fuente principal, la leptina también es producida por otros tejidos, incluyendo la placenta (Masuzaki y col., 1997), el epitelio mamario (Casabiell y col., 1997) y el estómago (Bado y col., 1998; Cinti y col., 2000).

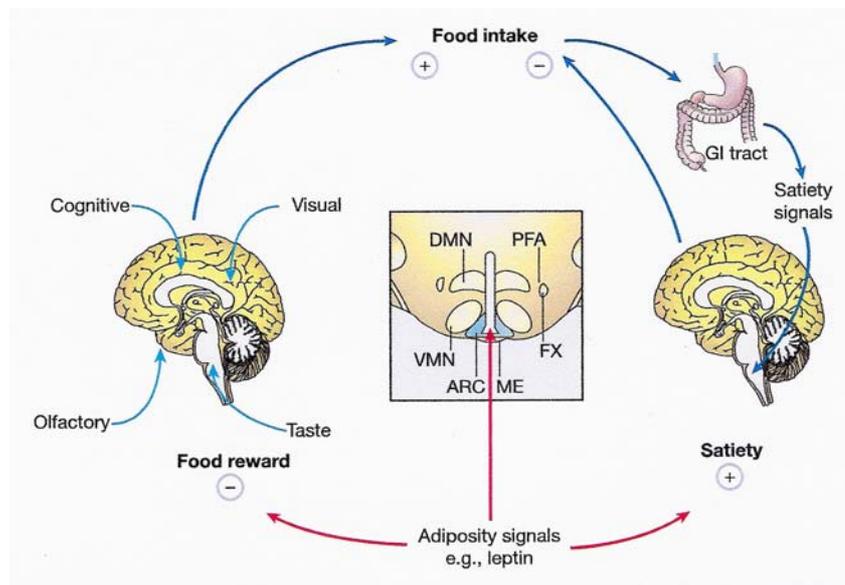


Figura I7: Modelo de la regulación de la ingesta por un mecanismo de retroalimentación negativo en respuesta a cambios en el contenido corporal de grasa

(Tomado de Morton y col., 2006).

ARC, núcleo arcuato; DMN, núcleo dorsomedial; FX, Formix; ME, eminencia mediana; VMN, núcleo ventromedial.

La leptina, se produce en proporción al contenido del tejido adiposo del cuerpo y entran en el cerebro donde actúan en los neurocircuitos que controlan la ingesta. A través de acciones directas e indirectas, la leptina disminuye la percepción de recompensa del alimento- la palatabilidad del alimento- mientras que aumenta la respuesta a las señales de la saciedad, generadas durante el consumo del alimento, los cuales inhiben la ingesta y conducen a la terminación de la comida. El efecto de la pérdida de peso rebajando los niveles de leptina aumenta las propiedades de recompensa del alimento mientras que disminuye la saciedad, una combinación que produce un fuerte aumento de la ingesta (Morton y col., 2006.; Figura I7).

La secreción de la leptina presenta un ritmo circadiano relacionado, entre otros, en la pauta de ingesta, aumentando a lo largo del día en humanos (de hábitos diurnos) y reduciéndose en el caso de roedores (de hábitos nocturnos) (Licinio y col., 1997). La administración central y periférica de leptina en ratones ob/ob provoca una pérdida de apetito y una disminución del peso corporal mediado por una reducción del depósito de grasa principalmente (Flier y col., 1998), sin olvidar que inhibe los procesos anabólicos (inhibición de NPY y AgRP) y estimula los catabólicos (POMC y CART) a escala central (Schwartz y col., 2000). El núcleo arqueado (ARC) es el principal sitio de traducción de señales de adiposidad (leptina e insulina) en una respuesta neuronal.

Por otra parte, la leptina producida por el estómago, y liberada al lumen gástrico en respuesta a la ingesta de alimentos podría participar, junto con otros péptidos gastrointestinales como la colecistoquinina (CCK), en el control del tamaño de la ingesta en un vía dependiente de receptores CCKA mediada por vías vagales aferentes. Dichas señales, junto con otras señales del tracto gastrointestinal (distensión gástrica), son procesadas en el NTS, en relación con el NPY donde se controla la información procedente de señales a largo plazo. Existen evidencias de que la leptina gástrica también puede liberarse a la circulación sanguínea, y actuara a nivel central igual que la leptina adipocitaria. A nivel periférico, la CCK también estimula la producción de leptina por los adipocitos, implicando receptores CCKB (Palou y col., 2004).

II.1.2.2.2- Insulina

Esta hormona de 51 aminoácidos, sintetizada en las células beta del páncreas, se considera como pieza clave en la regulación de la homeostasis glucostática y energética (Stockhorst y col., 2004). Fue propuesta por Woods como un regulador a largo plazo de la ingesta (Woods y col., 1974).

La insulina tiene un doble efecto sobre la ingesta y el peso corporal a nivel central, estimulando neuronas del ARC y VMN por la entrada a través de la barrera hematoencefálica, disminuyendo el apetito y la ganancia de peso (Plum y col., 2005). En cambio, la presencia periférica de insulina produce la disminución de los niveles de glucosa en sangre generando una señal orexigénica (Fanelli y col., 2004). La síntesis y secreción de insulina depende de los niveles de glucosa, aminoácidos y glucagón en sangre, de los sistemas simpático y parasimpático y estados de estrés (Hillebrand y col., 2002). Además, la insulina regula el metabolismo energético inhibiendo la gluconeogénesis y estimulando la lipogénesis y el gasto calórico (Pocai y col., 2005).

La administración central de insulina determina una reducción de la ingesta y del peso corporal proporcional a la dosis y reduce la hiperfagia en modelos animales de diabetes, mientras que la administración central de anticuerpos antiinsulina provoca un aumento de la ingesta y una ganancia de peso (Sipols y col., 1995). Los efectos anorexígenos de la insulina implican interacciones con diversos neuropéptidos hipotalámicos que forman parte del sistema lepténico de regulación del comportamiento alimentario, incluyendo NPY y ligandos de las melanocortinas y sus receptores.

En general, los individuos obesos secretan más insulina en respuesta a una determinada dosis de glucosa que los no obesos, y los niveles circulantes de insulina en un periodo de 24 horas son proporcionales al contenido de grasa corporal y a la ingesta reciente de carbohidratos y proteínas (Havel y col., 1998).. Y parece existir una relación entre leptina y insulina y probablemente esté a nivel del hígado; en un organismo que tiene resistencia

leptínica, la leptina en exceso produce una resistencia a la acción de la insulina a nivel hepático, lo cual produce la hiperinsulinemia.

Las interacciones entre la leptina y la insulina han sido exploradas extensamente, debido por una parte a la coexistencia de estados de resistencia a insulina y a leptina en individuos obesos y por otra, a la clara asociación entre obesidad y diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID). La DMNID se caracteriza por un estado severo de resistencia a la insulina asociado con hiperglicemia, lo que ha permitido postular a la leptina como la responsable de las relaciones entre obesidad y resistencia a la insulina y entre obesidad y DMNID (Ceddia y col., 2002). La evidencia demuestra que en los adipocitos de rata, la leptina disminuye la unión de la insulina con sus receptores (Walter y col., 1997). Además de su notoria acción lipolítica sobre estas células, la leptina también inhibe los efectos antilipolítico y lipogénico de la insulina (Rodríguez y col., 2003), aunque tal efecto aún no se haya demostrado en adipocitos humanos. La leptina y la insulina se regulan mutuamente. Así, la leptina inhibe la producción de insulina en las células b del páncreas (Seufert, 2004), mientras que la insulina estimula la producción de leptina en el adiposito.

II.1.3- Disfunción en el control de la ingesta de alimentos

El término de la "disfunción de ingesta" se utiliza para describir una serie de patologías asociadas a alteraciones en los mecanismos responsables de la regulación de la ingesta y del peso corporal cuyas principales manifestaciones son la obesidad y la anorexia.

II.1.3.1- Anorexia

La anorexia es una patología que se caracteriza por una importante pérdida del peso asociada principalmente con una inhibición permanente de la ingesta. Esta inhibición de la ingesta o hipofagia puede deberse a la desaparición de la sensación de hambre.

II.1.3.2- Obesidad

Deficiencias genéticas ó adquiridas en los mecanismos que regulan el comportamiento alimentario pueden conducir a un incremento del peso corporal y a la obesidad. La obesidad es una patología ampliamente extendida, de elevada prevalencia en los países industrializados, y se considera uno de los principales problemas de salud de la sociedad moderna.

La obesidad se caracteriza por un exceso de grasa corporal o tejido adiposo que generalmente conducirá a un deterioro significativo de la salud. Esta situación aparece como resultado del balance entre el consumo calórico y el gasto energético del individuo. Las causas que condicionan un balance de energía consumida frente al gasto realizado, parecen derivar de la combinación de factores ambientales y factores neuroendocrinos con una cierta predisposición genética, en algunos casos. Existen numerosos factores neuroendocrinos

encargados de regular la ingesta y el balance energético, la colecistoquinina o el neuropéptido Y, entre otros. Sin embargo, fue el descubrimiento de la leptina el desencadenante de múltiples investigaciones destinadas a establecer los mecanismos implicados en esta homeostasis (Martínez y col., 1996; Campfield y col., 1998).

Las interacciones entre genes y sus productos funcionales con los nutrientes parecen muy importante en el desarrollo de la obesidad (Palou y col., 2002; 2004a), y en varias otras patologías multifactoriales, incluidas las de mayor prevalencia: enfermedades cardiovasculares, cáncer o diabetes. Se describen dos tipos de obesidad: la obesidad genética y la obesidad común. Cada una de estas situaciones presenta características distintas:

La obesidad de origen genético se vincula principalmente con un exceso de la producción de la leptina, con una deficiencia en los receptores de la leptina (Sindelar., 1999) o de la melanocortina (receptores MC4) (Huszar y col., 1997). Se asocia a veces a un hipogonadismo o a una deficiencia en la hormona de crecimiento.

La obesidad común: se asocia a las alteraciones metabólicas, alteraciones que complican las posibilidades de intervención sobre el peso. Un estudio realizado en la rata puso de manifiesto que este tipo de obesidad pone en juego desórdenes en el funcionamiento de la transmisión monoaminérgica y el NPY del núcleo hipotalámico ventromedial (Levin y col., 1996).

Debido a que los mecanismos y las sustancias que se implican en la regulación del comportamiento relativo a la ingesta empiezan a ser conocidos, es posible buscar drogas capaces de corregir estos desórdenes. En el próximo capítulo revisamos la información bibliográfica sobre los derivados de cannabis que podrían constituir importantes herramientas farmacológicas para el tratamiento de alteraciones asociados al comportamiento alimentario.

La historia de los derivados del cannabis, junto a la de los opiáceos, constituye un reflejo fiel de las contradicciones humanas en materia de drogodependencias. Costumbres antropológicas, desarrollo científico, interés económico, lucha contra el sufrimiento, la enfermedad y los hábitos poco saludables, todos ellos se entremezclan en la especie animal que hace uso de esa planta, los humanos.

El uso de las drogas como el cannabis y la morfina es universal y data de la antigüedad. Una planta conocida desde milenios y rica en principios activos como el cannabis, suscita la curiosidad del hombre, que no tardó en descubrir el potencial terapéutico.

II.2- Cannabinoides, sistema endocannabinoide e ingesta

Los cannabinoides ejercen una amplia variedad de efectos tanto en el SNC como en otros lugares periféricos: los sistemas inmunitario, cardiovascular, respiratorio, reproductor y digestivo (Pertwee, 200; Porter y Felder, 2001). Actualmente, se admite que la mayoría de estos efectos están mediados, al menos en parte, por la unión de los cannabinoides a receptores específicos que son lugares de unión para una familia de ligandos endógenos designados bajo el término de “endocannabinoides” (Di Marzo y col., 1998; Piomelli y col., 2000).

El sistema cannabinoide endógeno esta implicado en la regulación de la ingesta y del apetito por la capacidad de los agonistas de los receptores cannabinoides de inducir hiperfagia. En efecto, el THC, el principio activo del cannabis, así como los agonistas cannabinoides estimulan la ingesta tanto en el hombre como en los animales de laboratorio (Abel, 1975; Williams y col., 2002).

II.2.1- Cannabis y cannabinoides

II.2.1.1- Cannabis:

La marihuana, Cannabis o Cáñamo es una planta anual perteneciente a la pequeña familia de las Cannabáceas. La inflorescencia femenina se caracteriza por segregar abundantemente una resina amarilla verdosa que contiene entre otros, los principios activos responsables de sus propiedades farmacológicas (Bruneton.1991).

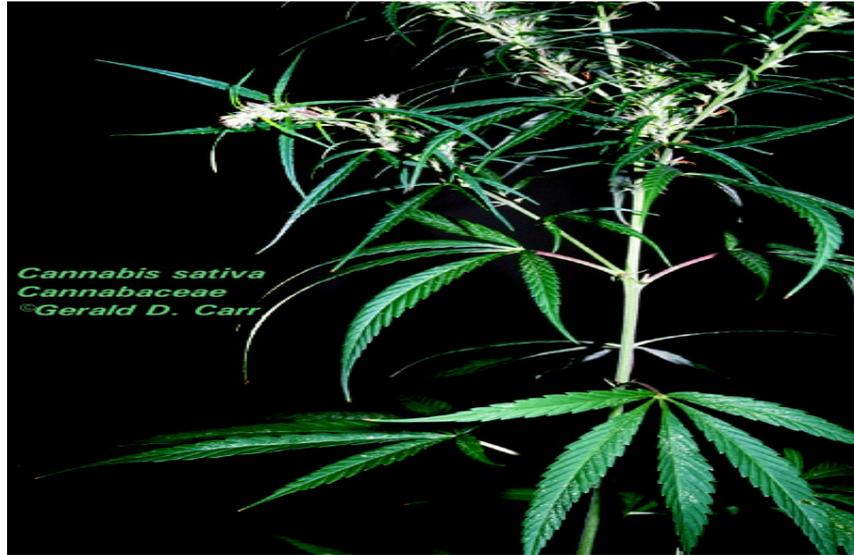


Figura II₁: Cannabis sativa

Independientemente del rango taxonómico, está bien establecida la existencia de dos fenotipos morfológicos que difieren en sus caracteres químicos (quimiotipos) (Turner y col., 1980):

- **Cannabis sativa** subespecie **sativa**: nombrado así por Linneo (1753), se aplica a las formas cultivadas para obtención de fibra o aceite de semilla, y es pobre en principios activos.
- **Cannabis sativa** subespecie **indica**: debido a Lamarck (1785) se aplica únicamente a las plantas cultivadas para el aprovechamiento de la resina, y es rica en principios activos.

Esta variabilidad en la cantidad de principios activos que produce la planta desde luego es consecuencia de factores genéticos, pero factores externos como el clima (temperatura, luz y agua) producen cambios muy importantes en la producción de principios activos.

II.2.1.2- Cannabinoides:

II.2.1.2.1- Propiedades

La planta marihuana contiene más de 360 componentes naturales provenientes del metabolismo secundario del cáñamo: aceites esenciales, flavonoides, monosacáridos, ácidos grasos, polifenoles y compuestos nitrogenados (aminas y alcaloides) aunque es probable que ninguno de ellos contribuya de forma significativa a la actividad farmacológica de los productos derivados de esta planta (Mechoulam y col. 1991; Turner y col. 1980).

Los principios activos de la planta, llamados cannabinoides, derivan de los terpenofenoles. Aunque estas últimas estructuras químicas están ampliamente distribuidas en

la naturaleza, sin embargo hasta el día de hoy no se han conseguido aislar cannabinoides de ninguna otra especie vegetal o animal. Los cannabinoides constituyen un grupo de compuestos de 21 átomos de carbono y suelen tener una estructura carbocíclica estando formados generalmente por tres anillos, ciclohexano, tetrahidropirano y benceno (Mechoulam. 1970).

Las muestras frescas de cannabis sativa contienen hasta 70 cannabinoides cuyas concentraciones relativas dependen y varían con la edad de la planta y su origen geográfico, los principales compuestos son:

Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), y cannabinol (CBN). Existen otros cannabinoides como: Cannabicromeno (CBC), Cannabiciolol (CBL), Cannabigerol (CBG), Cannabitriol (CBT) y Cannabicitrano que aparecen con cantidades diferentes según las variedades. El ácido cannabidiólico, que tiene actividad antibiótica es un constituyente importante del cáñamo del tipo fibra (Turner y col. 1980).

El Δ^9 -THC fue aislado por Gaoni y Mechoulam en el año 1964 y es el componente psicoactivo más potente de los cannabinoides, presenta propiedades hidrofóbicas por lo que es muy soluble en lípidos. El Δ^8 -THC tiene un perfil farmacológico muy parecido al del Δ^9 -THC, aunque sus efectos son más débiles. Solo aparece en algunas variedades de la planta y su concentración es muy pequeña en comparación con la del Δ^9 -THC (Mechoulam y col. 1992).

El cannabinol (CBN) también tiene propiedades psicoactivas, que son aproximadamente una décima parte de las descritas para el THC, presenta mayor afinidad para el receptor CB₂ que para el CB₁. Estudios recientes han demostrado que THC, CBN y cannabidiol (CBD) se pueden acoplar con los receptores CB₁ expresados por las células gliales y afectan la patogénesis de las enfermedades asociadas a la neuroinflamación, tal como esclerosis múltiple (Di Marzo y col., 2000; Pertwee, 2002; Walter y Stella, 2004; Witting y Stella, 2004).

El cannabidiol (CBD) es un compuesto bicíclico, al estar el anillo de tetrahidropirano escindido. Es un cannabinoide prácticamente desprovisto de propiedades psicoactivas, por lo que se están investigando sus posibles efectos clínicos. Así el tratamiento con CBD atenúa algunas de las alteraciones psicológicas inducidas por altas dosis de THC, como por ejemplo los sentimientos de ansiedad y de pánico (Zuardi y col. 1982). Se le ha atribuido al CBD un papel neuroprotector al comprobar su actuación como antioxidante frente a los efectos producidos en las neuronas por la liberación de glutámico (Hampson y col. 1998) y también ha sido relacionado desde hace tiempo con el sistema inmune.

Los efectos antiartríticos de este compuesto podrían ser el resultado de su actividad inmunosupresora, especialmente de la respuesta de los linfocitos Th1 y de una acción antiinflamatoria que reducirá los niveles de TNF en la sinovia (Malfait y col., 2000).

El CBD y el CBN se unen a los receptores cannabinoides expresados por las células inmunitarias y las del endotelio vascular, y causan una reducción de la presión sanguínea y de las respuestas antiinflamatorias (Herring y Kaminski, 1999; Járai y col., 1999; Malfait y col., 2000; Costa y col., 2004).

El cannabidiol también ha sido extensamente investigado debido a sus propiedades antiinflamatorias, antiesquizofrénicas y antiepilépticas (Pertwee, 2005).

Se ha demostrado la existencia de otro cannabinoide habitualmente despreciado es el tetrahidrocannabivarin (THCV), homólogo protil del THC (Thomas y col., 2005), es un antagonista potente del WIN 55,212-2 y de anandamida. Exhibe al menos cierto grado de selectividad, pues es más potente en antagonizar estas agonistas en el conducto deferente que en las membranas del cerebro. Es también más potente en antagonizar la inhibición de las contracciones eléctricamente evocadas de los conductos deferentes por el WIN 55,212-2 y anandamida que antagonizar la inhibición causada por el THC (Mechoulam, 2005).

II.2.1.2.2- Absorción y metabolismo

La ingestión de los cannabinoides por vía oral da lugar a unos niveles plasmáticos de THC inicialmente más bajos que cuando se toma por inhalación. Por vía oral su biodisponibilidad se ve reducida por su sensibilidad a la acidez del jugo gástrico, por el metabolismo hepático e intestinal, así como por su acceso a la circulación enterohepática (Aguere y col., 1986). Por tanto, hay que ingerir una cantidad mayor de THC por esta vía para conseguir el mismo efecto fisiológico que por la respiratoria y además conduce a unos niveles plasmáticos muchos más erráticos que los observados después de fumar.

Solo un 3% del THC presente en sangre está en forma libre. Dada su elevada hidrofobicidad se une a diferentes componentes plasmáticos. Un 9% está unido a las células sanguíneas. Otro 60% lo está a las lipoproteínas plasmáticas y el resto a albúmina (Widman y col., 1974). En humanos, las LDL parecen ser las lipoproteínas principalmente implicadas en el transporte, mientras que en ratas lo son las VLD y HDL.

Esta misma propiedad explica su rápida penetración en los tejidos, sobre todo en aquellos que están altamente vascularizados: pulmón, hígado, riñón, corazón, estómago, bazo, tejido adiposo marrón, placenta, corteza adrenal, tiroides, pituitaria y glándula mamaria. Posteriormente pasa al tejido adiposo, que junto con el bazo son sus principales depósitos tres días después de su ingesta. La droga puede tardar varias semanas en ser totalmente eliminada tras el cese de su administración (Harvey, 1999). Su retención en estos reservorios

hidrofóbicos amortigua la penetración del THC en el cerebro, donde su concentración y la de sus metabolitos es más baja (suele ser un 1% de la concentración plasmática máxima) (Aguere y col., 1986).

El THC y su metabolito, el 11-hidroxi-THC (11-OH-THC) son los que en mayor proporción se acumulan en los tejidos. Una parte del THC aparece conjugada con ácidos grasos, sobre todo en la fase final del almacenamiento. La paulatina liberación del THC, desde estos almacenes a la sangre, ententece la caída de los niveles plasmáticos de este compuesto, tras el cese de su administración, esto prolonga su presencia en sangre y la posterior entrada al cerebro, lo que podría explicar las dificultades para identificar un síndrome de abstinencia a esta droga, tras la suspensión de su administración (Aguere y col., 1986).

La eliminación del THC se produce principalmente mediante sus metabolitos en heces (un 68%) o en orina (12%), aunque también lo hace a través del pelo, la saliva y el sudor. La mayor parte del metabolismo ocurre en el hígado, aunque también puede producirse en otros órganos como el pulmón y el intestino. En orina se detecta la presencia de 11-OH-THC y hay una elevada concentración de ácido Δ^9 -THC-11-oico, ambos en forma libre o conjugada. La concentración de este ácido, no muestra una correlación apreciable con la cantidad presente en sangre, aunque los resultados son más precisos cuando lo que se comparan son los logaritmos de estas concentraciones (Huestis y col., 1996).

La primera enzima que actúa en el catabolismo del Δ^9 -THC es el citocromo P-450 que lo oxida a derivados mono-di- o trihidroxilados. La primera hidroxilación suele producirse en el hígado a 11-OH-THC (Matsunaga y col., 1995). Este compuesto tiene una actividad farmacológica parecida a la del THC y puede oxidarse al ácido Δ^9 -THC-11-oico (THC-11-COOH) o volver a hidroxilarse. En el segundo caso se convierte en 8,11-dihidroxi Δ^9 -THC, que puede ser hidroxilado en la cadena lateral. Estos compuestos hidroxilados son transformados, posteriormente, en otros metabolitos más polares, por rotura de la cadena lateral y oxidación al correspondiente ácido carboxílico. El que se haya encontrado CBN y sus derivados en orina y bilis de animales a los que se les administró THC, parece indicar que el CBN es un metabolito del THC (Harvey, 1984).

El retraso de la aparición de los efectos psicológicos y cardiacos del THC con respecto a la elevación de sus niveles en plasma puede estar relacionado con la más tardía aparición en sangre de la máxima concentración de OH-11-THC. Al tratarse de un compuesto psicoactivo, su presencia en cerebro potenciaría los efectos iniciados por el THC (Pérez-Reyes y col., 1972).

El THC-11-COOH se detecta algunos minutos después de la finalización del consumo y su concentración crece lentamente hasta que alcanza una meseta durante un periodo

prolongado de tiempo, pudiendo llegar a superar hasta 5 veces los niveles de THC. El máximo nivel se alcanza entre 30 minutos y una hora después de haberlo fumado (Huestis y col., 1992).

El metabolismo del CBD es bastante complejo, habiéndose catalogado unos 83 metabolitos (Harvey, 1999). Se forman derivados mono-, di- y trihidroxilados, y se produce la oxidación a ácidos y la pérdida de cadena lateral. El metabolismo del CBN es menos complejo que el de los otros cannabinoides. Predomina en la mayoría de las especies la hidroxilación en 11, aunque también hay una importante hidroxilación en la cadena lateral. Los metabolitos excretados son principalmente 11-hidroxi-CBN, el ácido CBN-11-oico y sus análogos hidroxilados en la cadena lateral (Brown y harvey, 1990).

Los metabolitos de los cannabinoides son eliminados en forma de ácidos libres o conjugados con glucurónico. Estos últimos se almacenan en el cuerpo durante periodos relativamente prolongados de tiempo y pueden llegar a ser detectados en la orina varias semanas después del consumo de los cannabinoides (Williams y Moffat, 1980).

También se ha podido demostrar en ratas preñadas que los cannabinoides pueden pasar a través de la placenta desde la sangre materna a la fetal. Los cannabinoides también son excretados en la leche materna durante la lactancia, lo que implica la exposición de las crías a este compuesto (Fernández-Ruiz y col., 1992).

II.2.2- Sistema endocannabinoide

Los receptores cannabinoides, sus ligandos endógenos así como los mecanismos de transporte y enzimas de síntesis y de degradación constituyen el sistema endocannabinoide (Di Marzo y col., 1998; Fride, 2002).

II.2.2.1- Receptores cannabinoides:

Los múltiples efectos producidos por el cannabis sugieren que los cannabinoides, principalmente Δ^9 -THC, actúan tanto sobre receptores centrales como periféricos. El descubrimiento del receptor ocurrió en 1988 en la escuela médica de la universidad de St Luis donde Allyn Howlett y colaboradores identificaron y caracterizaron un receptor del cannabinoides en el cerebro de la rata. La búsqueda del receptor del cannabinoide dependió del uso de un agonista sintético potente, el CP 55-940 que permitiría la observación del mecanismo de unión. Es un ligando menos lipófilo que el THC selectivo y con alta afinidad para sitios de unión de THC.

Hasta ahora se han clonado dos receptores para cannabinoides: CB₁ y CB₂, se trata de proteínas que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G caracterizados por la presencia de siete dominios transmembrana (Matsuda 1990, Joanne y

col., 2003). La distinción entre estos receptores se basa en diferencias en las secuencias de los aminoácidos (figII3), los mecanismos de señalización, la distribución tisular y la sensibilidad a algunos agonistas y antagonistas (Howlett y col., 2003).

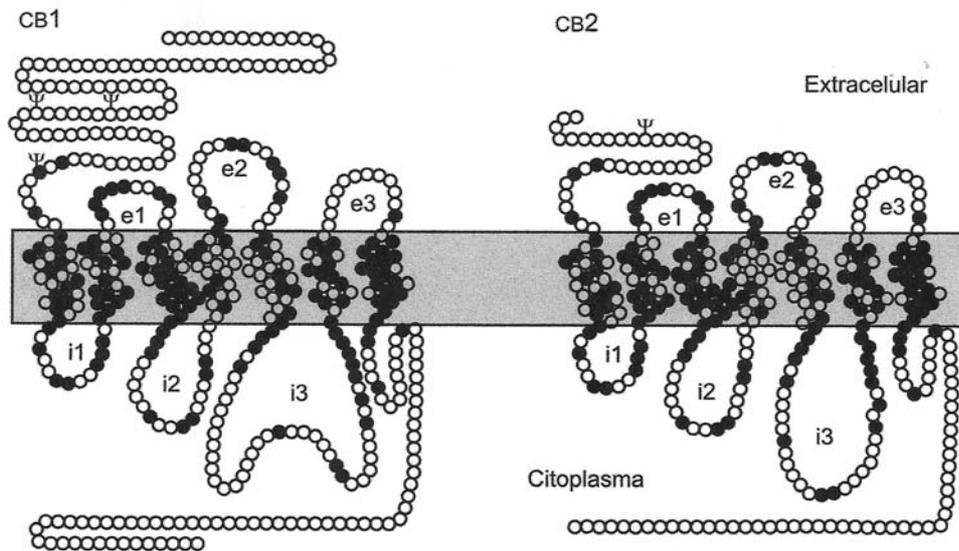


Figura II₂: Representación esquemática de los receptores CB₁ y CB₂
(Tomado de Rodríguez y col., 2005)

Los receptores tienen siete segmentos transmembrana. Los círculos llenos representan aminoácidos comunes a los dos receptores; los círculos vacíos representan aminoácidos diferentes; ψ sitios consensos de glicosilación. e1, e2, e3 son asas extracelulares; i1, i2, i3 son asas intracelulares.

II.2.2.1.1- Receptor CB₁:

En 1990 se describió por primera vez la estructura molecular del CB₁ (Matsuda 1990), en ratas, en ratones y en humanos. La clonación del gen en la corteza cerebral de la rata permitió la caracterización de un polipéptido de 472 o 473 aminoácidos (Pertwee y col 1995) organizados en una secuencia típica, altamente conservada entre las distintas especies estudiadas, y se expresan preferentemente sobre poblaciones neuronales del cerebro de mamíferos (Herkenham y col., 1991; Glass y col., 1997a), donde se les atribuye un papel importante como moduladores de la liberación de distintos neurotransmisores. En humanos, el gen se encuentra en la región q14-q15 del cromosoma 6, presentando una homología del 97.3% con el de rata (Hoehe y col 1991). Este receptor media los efectos psicoactivos de los cannabinoides (Devane y col 1988).

Los receptores CB₁ aparecen en etapas tempranas del desarrollo presentando en el cerebro de rata una distribución transitoria (Berrendero y col., 1998). La naturaleza transitoria de este fenómeno podría estar relacionada con eventos del desarrollo como la proliferación y la migración celular, la elongación axonal y la sinaptogénesis (Fernández-Ruiz y col., 2000). El SR 141716 A antagoniza algunos efectos producidos por los agonistas de los receptores CB₁, como la inhibición de la adenilato ciclasa, la hipotermia, la inmovilidad y la antinocicepción.

II.2.2.1.1.1- Distribución:

Los receptores CB₁ se han localizado fundamentalmente en el sistema nervioso central (Ameri., 1999; Howlett, 2002; Freund y col., 2003). Mediante la aplicación de diferentes técnicas autorradiográficas y de estudios inmunohistoquímicos se ha descrito de forma detallada la distribución de este receptor en el cerebro de rata (Herkenham y col., 1991; Tsou y col., 1998): al nivel de algunas regiones del cerebro: corteza, ganglios basales, hipocampo, hipotálamo.... (Glass y col 1997; Tsou y col 1998; Buckley y col 1998; Harrold y col., 2002; Shawn., 2004). Su distribución es heterogénea: su máxima densidad se encuentra en ganglios basales (sustancia negra, globos pallidus, núcleo entopeduncular y cuadado- putamen lateral) (4-6.4 pmol/mg proteína), en capa molecular del cerebro y ciertas partes del hipocampo (región CA3 del asta de ammon y capas I y IV de la corteza cerebral, mientras que es escasa (1-2 pmol/mg proteína) en hipotálamo, tallo cerebral, amígdala y tálamo (Pertwee y col 1997).

De su distribución podemos explorar la estrecha relación existente con los efectos farmacológicos que producen los cannabinoides:

- La alta densidad de los receptores en los ganglios basales se relaciona con los marcados efectos motores de la marihuana y que se extrapolan a los efectos tóxicos por la ingesta elevada de dicha sustancia, pudiendo llegar a provocar una verdadera catalepsia a dosis elevadas (Pertwee y col 1995).
- Su presencia en áreas hipocámpales y corticales explicaría los efectos de los cannabinoides sobre el aprendizaje y la memoria así como las propiedades anticonvulsivantes de los mismos.
- Su baja densidad en tallo cerebral, área que controla las funciones cardiovasculares y respiratorias, explica la baja toxicidad y ausencia de letalidad de la marihuana.

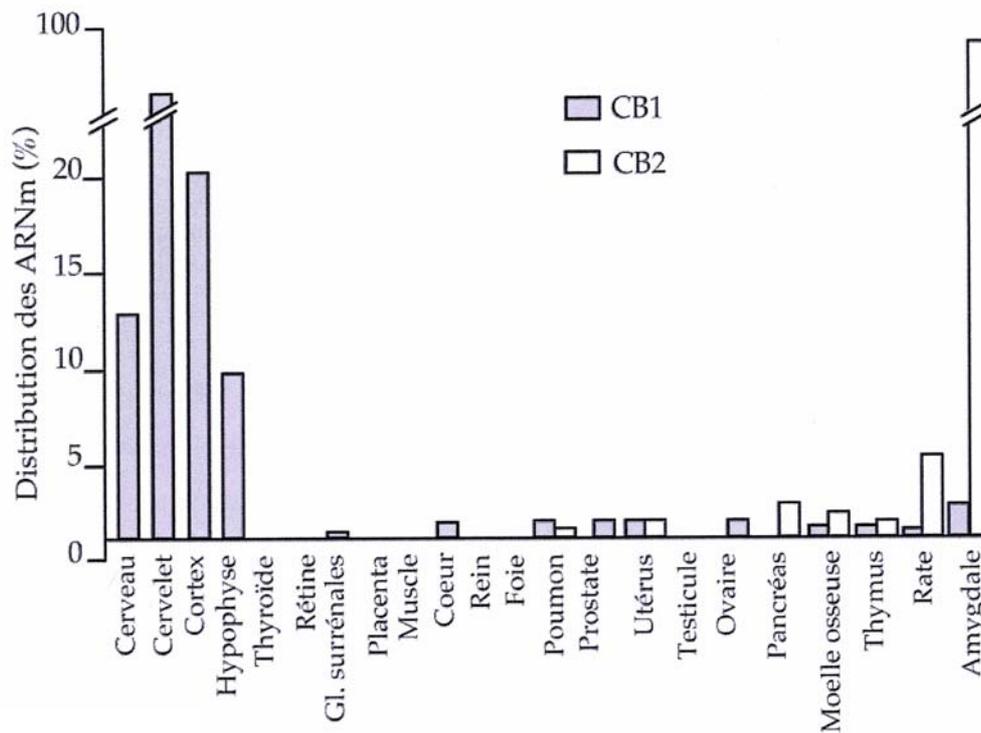


Figura II₃: Distribución de los receptores cannabinoides
(Tomado de Matsuda y col., 1990)

En el cerebro adulto, diversas circunstancias fisiológicas pueden alterar la densidad de estos receptores. Así, la exposición crónica a cannabinoides produce un fenómeno de desensibilización, lo que sugiere que la aparición de tolerancia para alguno de los efectos producidos por estos compuestos puede deberse a una disminución del número de receptores CB₁ (Rodríguez y col., 1994a, Romero y col., 1997; Maldonado, 2002). El fenómeno de desensibilización no es igual en todo el cerebro, existiendo regiones particulares sensibles al tratamiento crónico con cannabinoides, como el hipocampo, y regiones más resistentes, como hipotálamo y algunas estructuras de los ganglios basales (Romero y col., 1997).

Los receptores CB₁, también son afectados por la variación de las hormonas sexuales que se produce durante el ciclo ovárico (Rodríguez y col., 1994b). Los glucocorticoides también inhiben la expresión del receptor CB₁ en cerebro de rata, lo que en situaciones de estrés podría conducir a una alteración de la funcionalidad cannabimimética (Mailleux y Vanderhaegen, 1993).

Los receptores CB₁ existen también fuera del sistema nervioso central, en sistemas periféricos como: sistema reproductor (testículos, úteros) inmunitario y digestivo (intestino delgado, plexos...) y al nivel de terminaciones nerviosas presinápticas del sistema parasimpático (Pertwee y col 1997, Buckley y col 1998, Casu y col., 2003).

Al nivel periférico, los receptores CB₁ se han identificado en el bazo, la amígdala (Galiege y col., 1995), en el intestino delgado de la cobaya (Pertwee y col., 1996a), en la vejiga urinaria del ratón (Pertwee y Fernando, 1996), en el nervio simpático terminal (Ishac y col., 1996; Vizi y col., 2001), y en los niveles muy bajos en glándula suprarrenal, corazón, próstata, útero y ovario (Galiege y col., 1995).

La presencia de los receptores cannabinoides CB₁ en el aparato gastrointestinal ha sido demostrada por evidencia anatómica y funcional. En estudios anteriores, la autoradiografía demostró la presencia de los receptores CB₁ en la rata, y la inmunohistoquímica identificó la inmunoreactividad de los receptores CB₁ en el plexo neuronal en secciones representativas del aparato gastrointestinal del cerdo (Kulkarni-Narla y Brown, 2000).

Los estudios recientes (Mascolo y col., 2002; Pinto y col., 2002; Izzo y col., 2003; Storr y col., 2004; MacNaughton y col., 2004), han confirmado la localización de los receptores CB₁ en neuronas colinérgicas en una variedad de especies animales, y esas neuronas constituyen la mayor proporción de neuronas en el intestino. En el plexo mientérico de la cobaya, los cuerpos celulares sensoriales, interneuronales y motoneuronales y las fibras nerviosas expresan los receptores CB₁ (Couttis y col., 2002), mientras que CB₁ inmunoreactivos se colocan con los péptidos intestinales vasoactivos (non colinérgicos) y las secretoras neuronas del neuropeptido Y (colinérgicas) en el plexo submucosal. Esta distribución confirma el efecto inhibitorio de la activación del antagonista de los receptores CB₁, SR141716A, sobre la motilidad y los procesos secretorios.

II.2.2.1.1.2- Mecanismos de transducción de señales de los receptores CB₁:

Los principales mecanismos de transducción de las señales intracelulares en los que están implicados los receptores CB₁ se basa en el acoplamiento de estos receptores a proteína G_{i/o} que da lugar a la inhibición de la adenilacilasa (Pertwee y col 1997, Matsuda y col 1980) lo que produce un descenso en los niveles de AMP_c intracelular, y una activación de proteína quinasa A, vía involucrada en la regulación de fenómenos de proliferación y diferenciación celular (Bouaboula y col., 1995).

Por otro lado, la proteína G_{i/o} produce una inhibición de los canales de calcio tipo N y Q (Makie y col 1993) y un aumento de la conductancia del canal de potasio.

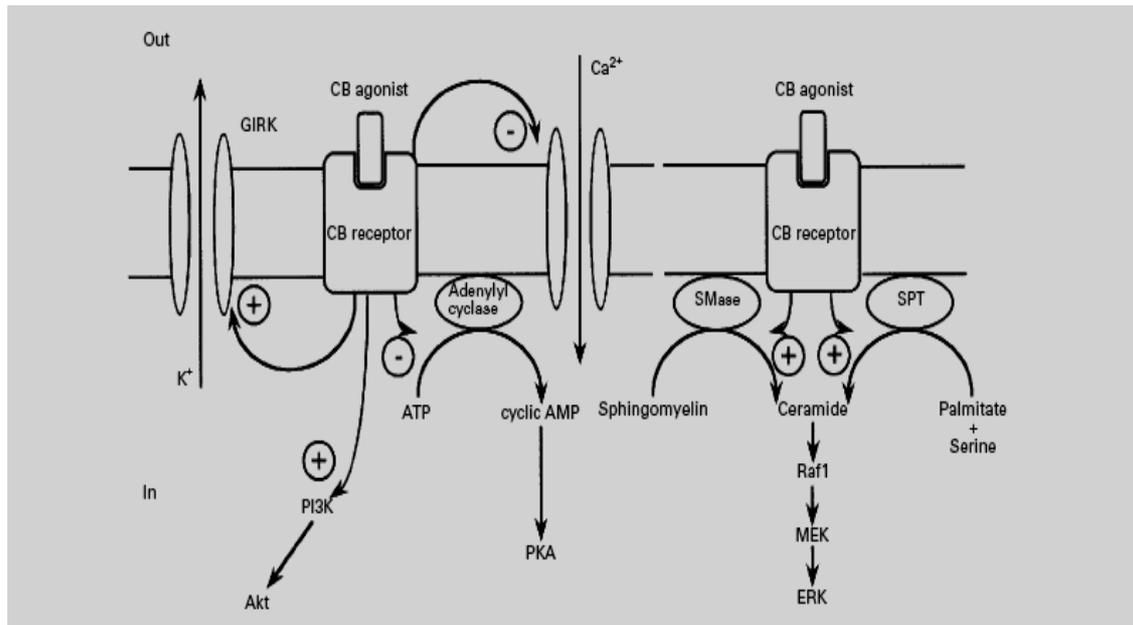


Figura II₄: Vías de señalización de los agonistas de los receptores cannabinoides CB
(Tomado de Robin Hiley y col., 2004).

El efecto combinado de los cannabinoides sobre ambos tipos de canales parece ser la base de su efecto antagonista sobre la liberación de los neurotransmisores. De hecho, los cannabinoides inhiben vía los receptores CB₁, la liberación de acetilcolina en el hipocampo (Gifford y col., 1997), la noradrenalina en el hipocampo, la corteza, el cerebelo y al nivel de los terminaciones nerviosas periféricas (Schilcker y col., 1997) y por último parecen estar relacionados con la inhibición de la transmisión glutaminérgica en el hipocampo (Shen y col., 1996; Allain y col. 1999). Así, la inhibición presináptica de varios neurotransmisores por los cannabinoides puede resultar ser un efecto neuronal dominante de los cannabinoides.

Los Cannabinoides inhiben las transmisiones GABAérgicas y glutamérgicas (Gerdeman y Lovinger, 2001; Huang y col., 2001; Gerdeman y col., 2002; Brown y col., 2003; Ronesi y col., 2004), las corrientes sinápticas de los núcleos accumbens (Robbe y col., 2001; 2002) con la activación presináptica del receptor CB₁.

Sin embargo, Köfalvi y col (2003) y otros (Hájos y col., 2001), han demostrado recientemente que los cannabinoides todavía disminuyen la liberación del glutamato en el hipocampo en los ratones deficientes de los receptores CB₁.

La activación de los receptores CB₁ atenúa la actividad neuronal por la inhibición presináptica de la liberación de los neurotransmisores y de la hiperpolarización postsináptica (Freund y col., 2003). El estudio de Köfalvi y col., 2005 permitió una visualización directa de los receptores CB₁ por primera vez en los terminales catecolaminérgicos en el cuerpo

estriado. La inhibición presináptica de la liberación de los neurotransmisores por los cannabinoides parece ser más eficaz debido a dos hechos: 1- los receptores CB₁ aparecen estar presentes en una densidad más alta en el terminal presináptico (Herkenham y col., 1991; Twichell y col., 1997); 2- la activación de los canales de potasio por los cannabinoides pueden amplificar una inhibición presináptica de los canales de calcio reduciendo la duración del potencial de acción.

II.2.2.1.2- Receptor CB₂:

Posteriormente, se caracterizó un segundo subtipo del receptor para compuestos cannabinoides que exhibe una homología global del 44% (68% en las regiones transmembrana) con los receptores CB₁ (Munro y col., 1993), denominado CB₂, aislado del bazo de rata y de una línea leucémica humana (HL60); es un polipéptido de 360 amino ácidos que también es miembro de la súper familia de receptores acopladas a la proteína G. La expresión y la dicotomía farmacológica entre los receptores CB₂ y CB₁ tienen enorme potencial farmacéutico, ya como que compuestos que interactúan selectivamente con los receptores CB₂ pueden proporcionar drogas antiinflamatorias desprovistas de efectos nocivos inducidos por los CB₁. Desde el punto de vista molecular, la estructura secundaria de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ comparte las características estructurales que definen a la familia de receptores acoplados a proteína G, es decir, un dominio amino-terminal extracelular, un dominio carboxi-terminal intracelular, y siete dominios transmembrana.

El receptor CB₂ actúa por los mismos mecanismos que el CB₁, puede modular la actividad de adenilatociclasa y de la proteína quinasa MAPK, con su capacidad de unirse a las proteínas Gi/o (Kobayashi y col., 2001). Pero a diferencia de los receptores CB₁ no es capaz de modificar los corrientes de los canales de calcio y potasio.

Los resultados de Molina-Holgado y colaboradores (2007) sugieren que los cannabinoides estimulan la proliferación de las células madres neuronales actuando sobre los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂.

II.2.2.1.2.1- Distribución

El receptor CB₂ se localiza fundamentalmente en el sistema inmunitario (Howlett y col., 2002), en el bazo (Schatz y col., 1997), amígdalas y en distintas células del sistema inmune (linfocitos B, monolitos y linfocitos T....) (Munro y col., 1993; Galiegue y col., 1995), parecen ser los responsables de las propiedades inmunosupresores del cannabis (Pertwee col 1997, 2002; Klein y col 1998; De Petrocellis y col., 2004). Estos receptores también se pueden expresar en el sistema nervioso central, en las células microgliales del cerebro bajo condiciones inflamatorias (Howlett y col., 2002; Núñez y col., 2004; Pertwee, 2005).

Los efectos producidos por los cannabinoides condujeron las industrias farmacéuticas a la síntesis de numerosas agonistas y antagonistas de los receptores CB de los cuales el objetivo es la puesta a punto de tratamiento farmacológico para las numerosas patologías del comportamiento alimentario como la obesidad, la anorexia, y síndromes caquéticos vinculados con el AIDS y para diversas enfermedades, algunas de ellas son el dolor crónico y ciertos tipos de cáncer y enfermedades que cursan con alteraciones del movimiento (Porter y Felder., 2001).

II.2.2.1.3- Agonistas de los receptores cannabinoides

A partir de la estructura química de los cannabinoides naturales se han desarrollado una serie de cannabinoides sintéticos que han resultado muy importantes para avanzar en el conocimiento de la farmacología de estos compuestos (Pertwee, 2001). Se pueden clasificar en cuatro grupos de compuestos, en función de su estructura química: Cannabinoides clásicos, no clásicos, aminoalquilindoles y eicosanoides.

El grupo de cannabinoides clásicos incluye compuestos con estructura de dibenzopirano, como son los cannabinoides derivados de *Cannabis sativa* (Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, cannabinol y cannabidiol), y los análogos sintéticos del Δ^9 -THC, como el HU-210, el HU-243 y la nabilona.

Los cannabinoides no clásicos son análogos bicíclicos y tricíclicos del Δ^9 -THC que carecen el anillo pirano. El principal representante de este grupo es el CP55, 940, cuya forma tritiada se utilizó para demostrar, por primera vez, la presencia de receptores específicos para cannabinoides en cerebro de rata (Devane y col., 1988). Otros agonistas cannabinoides no clásicos son el CP 55,244, CP 50,556 (Levonantradol) y el desacetilevonantradol (DALN).

El tercer grupo de compuestos cannabimiméticos son los aminoalquilindoles, cuyo principal representante es el WIN 55,212-2. Esta familia incluye moléculas cuya estructura química deriva de la pravadolina, y difiere bastante de la de los dos grupos de compuestos anteriormente mencionados. Se ha descrito que los tres tipos de compuestos son capaces de desplazarse mutuamente de su unión a receptores CB₁ y CB₂ (Pertwee., 2001).

La última familia se ha desarrollado a partir del descubrimiento de la existencia de ligandos cannabinoides endógenos (Devane y col., 1992). Este grupo incluye una serie de compuestos estructuralmente derivados del ácido araquidónico, cuyo principal representante es la anandamida, considerada el ligando endógeno por excelencia del sistema. Otros componentes de la familia de los eicosanoides son también ligandos cannabinoides endógenos, como 2-Araquidonil-glicerol (2-AG), y el recientemente descubierto 2-araquidonilgliceril éter (noladin éter). En el grupo de los eicosanoides se incluyen derivados sintéticos más estables a la hidrólisis enzimática que los cannabinoides endógenos, como son

la (R)-(+)-araquidonil-1-hidroxi-2'-propilamida (metanandamida), araquidonoyl-2'-cloroetilamida (ACEA) que son agonistas selectivos de los receptores CB₁ (Hillard et col., 1999).

Varios de los agonistas cannabinoides citados han sido marcados radiactivamente, y empleados en ensayos de localización y cuantificación de los receptores CB₁ en sistemas de expresión homóloga y heteróloga. Entre estos compuestos, los más ampliamente utilizados para marcar los receptores CB₁ en membranas y secciones cerebrales son el [³H] HU-243, el [³H] WIN 55,212-2, y sobre todo, el [³H] CP55, 940 (Pertwee, 1997).

En cuanto a la capacidad de interacción de los compuestos cannabimiméticos más frecuentemente utilizados con los receptores cannabinoides, el (-)-Δ⁹-THC se une con afinidad similar a los receptores CB₁ y CB₂, funcionando como agonista parcial en ambos casos. Sin embargo, su eficacia es mayor en la interacción con los receptores CB₁, llegando incluso a comportarse como un antagonista en determinados sistemas CB₂. Debido a la alta afinidad del WIN 55,212-2 y el CP 55,940 para los receptores CB₁ y CB₂, la eficacia de estos compuestos es relativamente alta observándose efectos a concentraciones que se encuentran en el rango nanomolar.

El CP 55,940 exhibe una afinidad esencialmente similar por los receptores CB₁ y CB₂, mientras que el WIN 55,212-2 muestra una ligera selectividad CB₂. La anandamida (AEA), en cambio presenta una cierta selectividad CB₁, y se comporta como un agonista parcial de ambos subtipos de receptores, siendo su eficacia mayor en la interacción con los receptores CB₁. Por último, el HU-210 y el HU-243 son potentes agonistas cannabinoides clásicos, cuya eficacia es similar a la de CP 55,940 y WIN 55,212-2, siendo su afinidad por ambos subtipos de receptores cannabinoides superior a la de estos compuestos.

II.2.2.1.4- Antagonistas de los receptores cannabinoides

En los últimos años se han desarrollado varias moléculas capaces de antagonizar de forma selectiva los efectos cannabimiméticos mediados por los receptores CB₁ y CB₂, que han supuesto una herramienta fundamental para la caracterización farmacológica de estas proteínas. Entre estos compuestos, la molécula más potente y más ampliamente utilizada como antagonista de los receptores CB₁ es el SR 141716A (Rinaldi-Carmona y col., 1994). Este compuesto exhibe una marcada selectividad por los receptores CB₁ frente a los CB₂, de forma es capaz de prevenir y/o revertir las acciones de los agonistas cannabinoides que actúan a través de CB₁ tanto *in vitro*, como *in vivo* (Pertwee, 1997).

Algunos autores han puesto de manifiesto que el SR141716A revierte los efectos de la anandamida con menor potencia que los otros agonistas cannabinoides en determinados sistemas *in vitro*, y también se ha sugerido que este antagonista cannabinoide no es capaz de

bloquear algunos efectos farmacológicos de la AEA en ensayos *in vivo*, a concentraciones que revierten totalmente las acciones de otros agonistas. En los sistemas *in vivo*, esta discrepancia se ha atribuido a la capacidad de la AEA para activar receptores vanilloides, además de receptores cannabinoides (Smart y col., 2000).

A partir de la estructura del SR 141716A se han desarrollado moléculas como el AM-251 y el AM-281, que también antagonizan de forma selectiva efectos cannabimiméticos derivados de la activación de receptores CB₁. Existen además antagonistas competitivos de los receptores CB₁ que difieren estructuralmente del SR141716A, como es el caso del Ly320135. Finalmente, el metilaraquidonilfluorfosfonato (MAFP) es un potente inhibidor irreversible de la degradación enzimática de cannabinoides endógenos por la FAAH, que también se comporta como un antagonista irreversible de los receptores CB₁ (Pertwee, 2001).

En cuanto a los efectos cannabimiméticos inversos que pueden producir el AM 251 y el AM 281 podemos citar:

- AM 251 induce la supresión de la ingesta y el comportamiento reforzado por la ingesta (McLaughlin y col., 2003), inhibición de la actividad basal de la proteína G en las membranas cerebrales de la rata (Savinainen y col., 2003) y la mejora de la liberación de glutamato eléctricamente evocada de las neuronas cerebrosas de la rata (Kreitzer y Regehr, 2001).
- AM 281 induce un aumento en la actividad locomotora en ratones, en la presión de la eyección peristáltica en el íleo aislado de la rata y en transmisiones sinápticas glutamatérgicas de la rata (Cosenza y col., 2000; Izzo y col., 2000; Huang y col., 2001).
- AM 281 aumenta la liberación de acetilcolina del hipocampo de la rata (Gifford y col., 1997) y de [³H] D-aspartato en los cultivos primarios de las células granulosas del cerebro de la rata (Breivogel y col., 2004)
- AM 281 inhibe la unión de la [³⁵S] GTPγS a los cultivos primarios de las células granulosas del cerebro de la rata (Breivogel y col., 2004).
- AM 251 y AM 281 aumentan la liberación del ácido γ-aminobutírico de las neuronas hipocampales (Ohno-Shosaku y col., 2001; Wilson y Nicoll, 2001).
- AM 251 y AM 281 aumentan las corrientes de Ca²⁺ y disminuyen las corrientes compensatorias de potasio en las células HEK293 (Vásquez y col., 2003).

Es significativo que aunque los agonistas inversos AM 251 y AM 281 son muy similares estructuralmente al SR141716A y comparten su capacidad de bloquear los receptores CB₁ y de producir efectos cannabimiméticos inversos, varias diferencias farmacológicas entre SR141716A y cualquiera de las dos, AM 251 o AM 281 se han detectado *in vitro* (Hájos y col., 2001; Hájos y Freund, 2002).

Es también significativo que hay algunos informes de que se puede desarrollar tolerancia rápidamente por lo menos a algunos de los efectos cannabimiméticos inversos de SR141716A, por ejemplo su capacidad de reducir la ingesta en ratas (Vickers y col., 2003; Kirkham y Williams, 2004; Verty y col., 2004; Järbe y DiPatrizio, 2005), y su capacidad de aumentar el peristaltismo intestinal en ratones (Caria y col., 2004). Sin embargo, los mecanismos que son la base de esta tolerancia no han sido establecidos.

Experimentos con ratones deficientes en los receptores CB₁ apoyan la hipótesis de que SR141716A produce por lo menos algunos de sus efectos inversos ligándose a los receptores CB₁. Así, por ejemplo, mientras que SR141716A aumenta la liberación eléctricamente evocada de noradrenalina en los ratones normales, no produce este efecto en ratones deficientes en los receptores CB₁ (Schilcker y col., 2003).

De forma similar, el SR141716A reduce la ingesta en los ratones normales pero no en ratones deficientes de los receptores CB₁. También el efecto de reducción de ingesta y la severidad creciente de la colitis inducida, efectos opuestos a los producidos por los agonistas del receptor CB₁, se observan en ratones normales (con receptores CB₁) tratados con el SR141716A y en ratones deficientes no tratados con SR141716A (Di Marzo y col., 2001; Massa y col., 2004).

En relación con los receptores cannabinoides CB₂, la molécula más potente y mejor caracterizada como antagonista selectivo de estas proteínas es el SR 144528. Otros fármacos utilizados como antagonistas cannabinoides selectivos para los receptores CB₂ son el AM 630 y el cannabinoide clásico 6'-zidohe-2'-ine- Δ^8 -THC (O-1184).

Además de su capacidad para prevenir o atenuar acciones cannabimiméticas, algunas de estas moléculas desarrolladas como antagonistas de los receptores CB₁ o CB₂ son capaces de provocar efectos contrarios a los evocados por agonistas cannabinoides: agonistas inversos. La molécula para la que se han descrito y estudiado en mayor detalle repuestas como agonista inverso de los receptores cannabinoides es el SR141716A (Pertwee, 2001). Otros compuestos que también han demostrado cierta capacidad como agonistas inversos son el AM-281, AM-251 y el SR 144528.

La administración de las agonistas de los receptores CB₁ como THC, WIN 55,212-2, los endocannabinoides, anandamida y 2-arachidonilglicerol (2AG), produce un aumento de la

ingesta en humanos (Hart y col., 2002) y en animales (Williams y Kirkham, 2002; Berry y Mechoulam, 2002; Gómez y col., 2002), mientras los agonistas inversos dismiuyen la ingesta y producen un efecto hipofágico, entre ellos citando el SR 141716A (Verty y col., 2003; McLaughlin y col., 2003; Kirkham y Williams, 2004; Verty y col., 2004; Järbe y DiPatrizio, 2005) y el AM 251 (Shearman y col., 2003; Hildebrant y col., 2003; Chen y col., 2004; Chambers y col., 2004; Chambers y col., 2005; Rodgers y col., 2005; McLaughlin y col., 2005).

II.2.2.2 Endocannabinoides

La identificación, caracterización farmacológica y localización de receptores específicos de membrana que mediaban los efectos centrales y periféricos de los cannabinoides exógenos conducen a la identificación de compuestos lipídicos endógenos que se vinculan de una manera muy selectiva con los receptores CB₁ y CB₂ tanto en el cerebro como en otros órganos periféricos. Estos ligandos propios del organismo y agonistas de los receptores cannabinoides se denominan cannabinoides endógenos o endocannabinoides (Di marzo y col., 1998).

Los endocannabinoides son compuestos naturales derivados de ácidos grasos poliinsaturados y similares al principio activo del cannabis, siendo los más representativos la etanolamida del ácido araquidónico, conocida como anandamida (Devane y col., 1992) que se aisló a partir de un extracto lipídico obtenido de cerebro de cerdo. Posteriormente, a partir de intestino de perro y cerebro de rata se aisló otro ligando endógeno, el 2-araquidonil glicerol (2AG) (Mechoulam y col., 1995). Otro miembro de esta familia de lípidos, la palmitoiletanolamida, comparte con los cannabinoides endógenos diversos efectos fisiológicos aunque no es capaz de unirse a ninguno de los dos subtipos de receptores de cannabinoides (Sugiera y col., 2000). Recientemente se ha aislado un nuevo endocannabinoide a partir de cerebro porcino, el 2-araquidonil gliceril éter (Hanus y col., 2001).

No obstante, sobre la base de la localización de los receptores cannabinoides en el organismo (Mailleux y Vanderhaeghen, 1993) y de los efectos farmacológicos ejercidos por distintos cannabinoides tanto de origen natural como sintético (Pertwee, 1997), este sistema parece estar implicado en funciones tales como la coordinación motora, el aprendizaje y la memoria, la antinocicepción, el control de las emociones, el desarrollo neuronal así como en la mediación de diferentes procesos a nivel cardiovascular e inmunológico.

Los principales endocannabinoides: anandamida y 2AG cumplen las condiciones necesarias de todo neurotransmisor ya que son sintetizados y liberados a partir de las neuronas, son capaces de unirse y activar receptores de membrana y finalmente son inactivados por recaptación y degradación enzimático en el interior de la célula. Únicamente, a diferencia de lo que ocurre en el caso de otros neurotransmisores y dada la naturaleza de

estos compuestos, los endocannabinoides no son almacenados en el interior de vesículas sinápticas quizás debido a su naturaleza hidrófoba que le permite atravesar fácilmente las membranas plásmicas (Felder y Glass., 1998). Su almacenamiento se producirá en forma de un precursor (fosfolípidos de membrana) que se hidroliza después de la activación de un fosfolipasa apropiada o una enzima relacionada. La síntesis de estos endocannabinoides se producirá cuando sea necesaria su activación.

Los endocannabinoides actúan principalmente sobre tres vías de indicación intracelular: la modulación de adenilatociclasa, la modulación de la permeabilidad de algunos canales iónicos y la activación de la vía de proteínas quinasas activadas por agentes mitógenos.

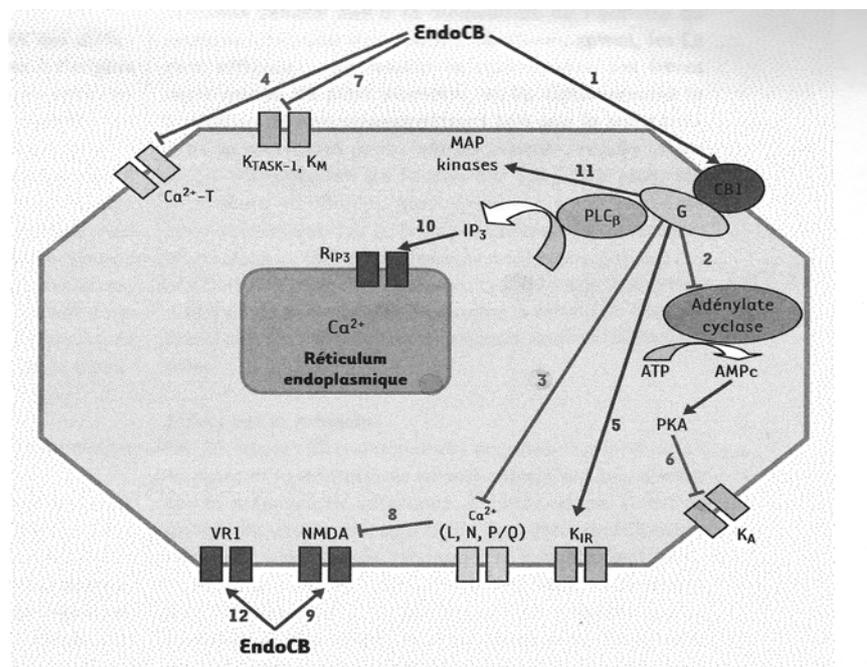


Figura II₅: Principales vías de transducción de señal modificadas tras la acción de los endocannabinoides vía los receptores CB₁, VR1 o por acción directa (Tomada de Venance y col., 2004)

II.2.2.2.1- Anandamida

La anandamida es capaz de unirse a los receptores CB₁ y CB₂ (Munro y col., 1993; Felder y col., 1993) aunque muestra una mayor afinidad por los receptores CB₁. Anandamina mimetiza los efectos del THC pero con una duración de acción mas corta, Smith y col (1994) han demostrado que produce antinocicepción, hipotermia, hipomotilidad y catalepsia en ratones después de la inyección intraperitoneal o intratecal.

Los estudios del comportamiento han demostrado que la administración intraventricular de anandamida induce efectos farmacológicos inmediatos. Sin embargo, estos efectos a excepción del antinocicepción se terminan casi totalmente tras 30 minutos, en contraste THC produce una duración de acción más larga para la hipoactividad y la motilidad (Smith y col., 1994). Las diferencias en la duración de acción de anandamida y de THC se pueden atribuir a las diferencias en el metabolismo de los dos compuestos. La exposición crónica a anandamida produce, igual que ocurría con los cannabinoides, la desensibilización del receptor CB₁. Se ha descrito la aparición de tolerancia para alguno de los efectos producidos por esta amida, que puede deberse a una disminución del número de receptores CB₁ (Romero y col., 1995).

La anandamida fue aislada y cuantificada por cromatografía líquida y espectrometría total en varios tejidos del ser humano y de la rata, y se ha demostrado que se distribuye extensamente en cerebro y varios tejidos periféricos (Felder y col., 1993; 1996). Dentro del cerebro, los niveles más altos de anandamida se corresponden con áreas que también presentan una elevada densidad de receptores de cannabinoides tales como el hipocampo, cuerpo estriado, cerebelo y corteza. La anandamida se detectó también en el bazo humano y de la rata que expresa altos niveles del receptor cannabinoide CB₂. Cantidades pequeñas también fueron encontradas en corazón y tálamo humano así como en piel de la rata, mientras que solamente las cantidades mínimas fueron detectadas en suero humano, plasma y líquido cefalorraquídeo (Felder y Glass., 1998; Calignano y col., 2000; Ramos y col., 2000). Los niveles de anandamida en el cerebro son equivalentes a los otros neurotransmisores por ejemplo: dopamina y serotonina.

La anandamida se sintetiza y se libera tras la entrada de Ca⁺⁺ a la interior de las neuronas, tras la estimulación de la membrana por un agente de despolarización. La síntesis de anandamida se produce mediante la hidrólisis, catalizada por un fosfolipasa D, de un precursor fosfolipídico presente en la membrana celular, el N-araquidonil-fosfatidiletanolamina, liberando ácido fosfatídico y anandamida (Di Marzo y col., 1994), este compuesto sirve como depósito de almacenaje para la anandamida que va a ser sintetizada y liberada cuando sea necesaria su activación.

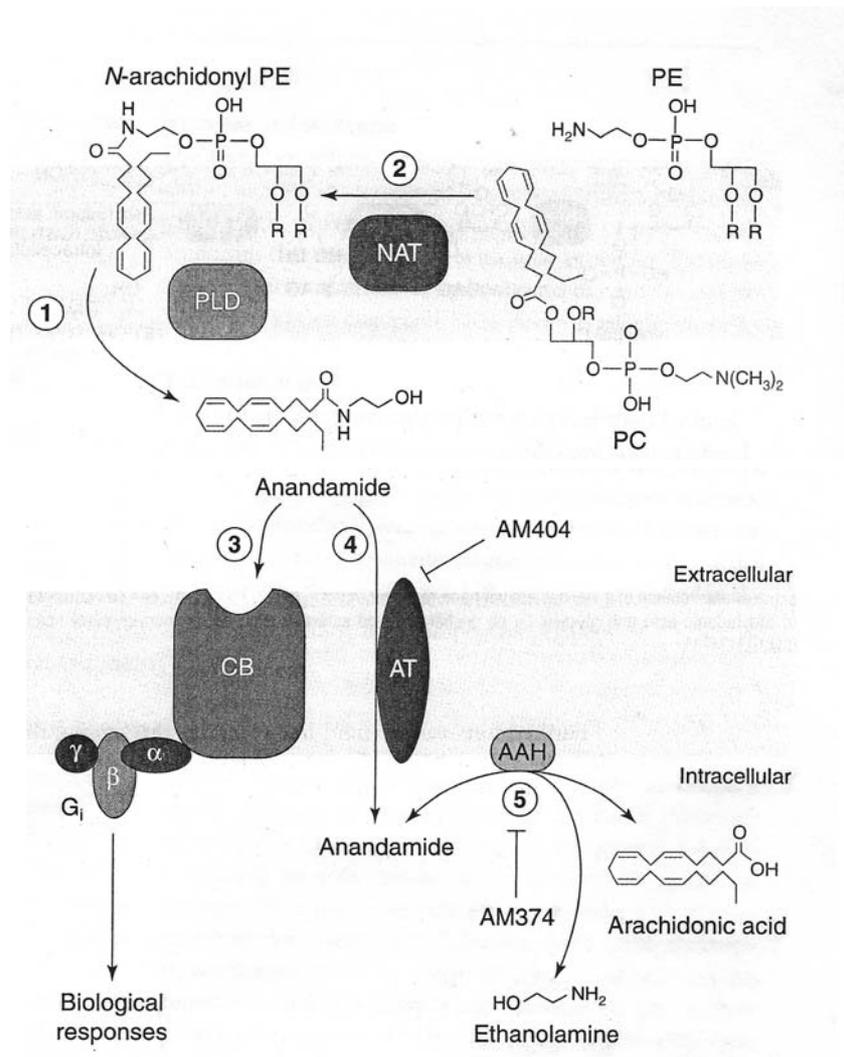


Figura II.6. Mecanismo de formación y inactivación de anandamida en neuronas

(Tomado de Piomelli y col., 2000).

La anandamida nuevamente formada, se lanza inmediatamente al espacio extracelular donde puede activar los receptores cannabinoides acoplados a proteína G. Una vez que la anandamida ha sido transportada al interior de la célula puede ser sustrato de la FAAH, enzima intracelular cuya función es hidrolizar el enlace amida dando lugar a ácido araquidónico y etanolamina, y produciendo así la inactivación del endocannabinoide. La FAAH ha sido clonada y secuenciada en diversas especies animales (Cravatt y col., 1996; Ueda y col., 2000) y se clasifica como pertenecientes a un grupo de enzimas hidrolíticas denominado familia de las amidasas.

Los inhibidores de los procesos de inactivación de los endocannabinoides podrían representar una interesante y novedosa estrategia para el tratamiento de diversas alteraciones tales como la nocicepción, siendo aplicable tanto al dolor inflamatorio como al neuropático, y también del shock hipotensivo, debido a sus acciones en el sistema cardiovascular (Giuffrida y col., 2001). También la FAAH puede constituir una prometedora diana terapéutica para el tratamiento del dolor y de ciertas enfermedades neuropsiquiátricas (Cravatt y col., 2001) mientras que su adecuado funcionamiento parece implicado en la correcta implantación y desarrollo embrionarios en las primeras etapas del embarazo (Maccarrone y col., 2000b; Maccarrone y col., 2002). El importante papel que la FAAH desempeña y que se deduce de todos estos datos está siendo confirmado en la actualidad con la reciente obtención de ratones que carecen de la enzima (ratones knockout o FAAH^{-/-}). Los resultados obtenidos con estos ratones indican que la FAAH juega un papel clave en la regulación de los procesos mediados por anandamida siendo la responsable del mantenimiento de un tono cannabinoide endógeno, el cual está implicado en la percepción del dolor (Cravatt y col., 2001).

II.2.2.2.- Araquidonil-glicerol (2AG)

Araquidonil-glicerol (2AG), es el segundo endocannabinoide identificado en el cerebro, se ha aislado del intestino del perro (Mechoulam 1995). Su afinidad para los receptores CB₁ y CB₂ es también tan baja como la de anandamida pero sus concentraciones cerebrales son 170 veces mayor que las de anandamida (Stella y col., 1997), y su liberación se estimula por inomycina vía la activación de fosfolipasa C (Allain .1999). A parte se encuentra sobre todo en el SNC y el intestino. En el SNC hay concentraciones elevadas en el tronco cerebral, el núcleo estriado y el hipocampo, y concentraciones más bajas en la corteza cerebral y el cerebelo (Bisogno y col., 1999). Se han identificado diversas funciones, como por ejemplo que participa en la regulación de la sensación de hambre y de la temperatura corporal (Mechoulam y col., 1998).

En los mismos tejidos en los cuales se ha aislado 2AG (sobre todo intestino y cerebro), se han encontrado, 2 linoleilglicerol y palmitoilglicerol. Aunque estos compuestos no se unen al receptor cannabinoide, se ha sugerido que podrían inhibir la actividad de las amidasas y potenciar el efecto del 2AG por un mecanismo que se ha llamado efecto de entorno (Mechoulam y col., 1998). Ambos compuestos potencian algunos efectos producidos por el 2-araquidonilglicerol, como la inhibición del comportamiento motor, la inmovilidad y la hipotermia (Ben-Shabat y col., 1998). Esta activación podría deberse a su capacidad de inhibir la hidrolasa que degrada el 2AG, lo que prolongaría la permanencia de este compuesto en el organismo.

En cuanto los posibles funciones del 2-araquidonilglicerol en el organismo, además de los efectos sobre el comportamiento motor y la regulación de la temperatura corporal, inhibe

la potenciación a largo plazo en hipocampo de rata (Stella y col., 1997). También participa en las respuestas proliferativas de los linfocitos T a los mitógenos B y T (Lee y col., 1995).

Los endocannabinoides son mensajeros retrógrados que, en respuesta a una despolarización postsináptica, reducen durante algunas decenas de segundos la liberación de neurotransmisores, contra corriente de la transmisión sináptica inhibitoria o excitadora.

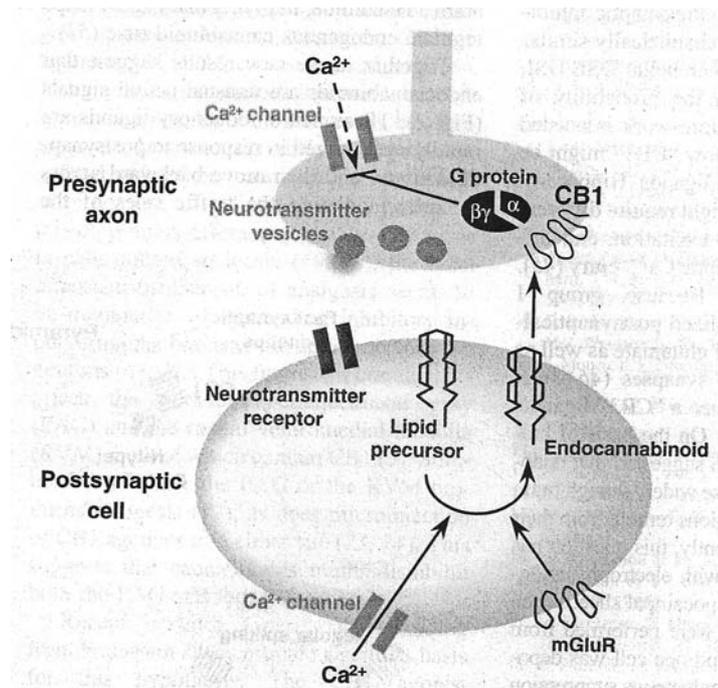


Figura II.7: La señalización retrógrada de los endocannabinoides
(Tomado de Wilson y Nicoll., 2002)

La despolarización postsináptica abre los canales voltaje-dependientes de Ca^{2+} , el Ca^{2+} postsináptico después activa las enzimas que sintetizan los endocannabinoides a partir de los precursores lipídicos. La activación de los receptores postsinápticos mGluR puede también generar endocannabinoides, posiblemente por la activación de la fosfolipasa C, generando el diacilglicerol, que entonces se hidroliza por la diacilglicerol lipasa para dar lugar al 2-araquidonilglicerol. Los endocannabinoides después abandonan la célula postsináptica y activan los receptores presinápticos CB₁. La activación de la proteína G libera la G $\beta\gamma$, que entonces inhibe directamente la entrada presináptica de Ca^{2+} , esto disminuye la probabilidad de la liberación de una vesícula del neurotransmisor (Wilson y Nicoll, 2002).

Los cannabinoides ejercen una amplia variedad de efectos tanto en el SNC como en otros lugares periféricos y su uso clínico es limitado debido a dos razones importantes.

Primero, los cannabinoides causan efectos secundarios centrales, tales como sedación, la debilitación temporal de la memoria, y efectos psicotrópicos (Iverson, 2003; Mariscano y Lutz, 2006). En segundo lugar, la eficacia analgésica de los cannabinoides disminuye progresivamente durante el uso repetido, un fenómeno designado a la tolerancia (De Vry y col., 2004; Martin y col., 2004; Gonzalez y col., 2005; Rubino y col., 2005).

II.2.3- Efectos de los cannabinoides y de los endocannabinoides

II.2.3.1- Efecto inmunomodulator y antiinflamatorio

Los cannabinoides han demostrado diferentes efectos inmunomoduladores; a dosis bajas, son inmunoestimulantes, y a dosis altas, inmunosupresores (Guzmán y col., 2002; Duran y col., 2004). Estos efectos requieren la intermediación de receptores CB₂, y probablemente también VR1, pero igualmente pueden ser independientes de receptores (Klein, 2005). Se ha demostrado un aumento de la producción de endocannabinoides, así como de la expresión de receptores CB₂, en células inmunitarias estimuladas por bacterias o por lipopolisacáridos, diversos estudios sugieren que los endocannabinoides serían importantes moduladores de la quimiotaxis (Duran y col., 2004; Klein, 2005).

Por otra parte, los cannabinoides han demostrado un potente efecto antiinflamatorio en diversos modelos de enfermedad, como neurodegeneración, neuroinflamación, enfermedad inflamatoria intestinal o artritis. Este efecto antiinflamatorio se debe especialmente a la inhibición de la liberación y la síntesis de citocinas (especialmente IL-1 y factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α]) (Duran y col., 2004; Klein, 2005), e incluye la inhibición de la expresión génica. Además, los cannabinoides ejercen efecto modulador sobre linfocitos T helper (Guzmán y col., 2002; Duran y col., 2004; Klein, 2005).

Evidencias recientes muestran también los efectos beneficiosos de los cannabinoides en modelos experimentales de inflamación aguda (Conti y col., 2002) y crónica como la artritis reumatoide (Malfait y col., 2000) o en el caso de la diabetes autoinmune (Li y col., 2001).

El tipo de regulación ejercida por los cannabinoides sobre la red de citoquinas parece ser dependiente del grado de activación celular, como lo indica el hecho de que el cannabinoide aumenta la liberación de IL-2 en situaciones de activación subóptima y la disminuye en los casos de activación máxima en linfocitos de bazo (Jan y col., 2001). Por otro lado, es importante tener en cuenta que las acciones de los cannabinoides sobre la red de citoquinas pueden ser vitales no sólo a nivel del propio sistema inmune, sino también en múltiples patologías del sistema nervioso central (SNC) que cursan con alteraciones en la barrera hematoencefálica y con procesos de inflamación.

Los cannabinoides actúan a través de los distintos mecanismos de los receptores CB₁ y CB₂ para suprimir la hipersensibilidad mecánica después del establecimiento de la inflamación crónica a dosis que producen cambios modestos en la hiperalgia termal. Los efectos antihiperalgésicos aditivos fueron observados después de la co-administración profiláctica de los agonistas selectivos de los receptores CB₁ y CB₂. Estos resultados sugieren que las acciones antihiperalgésicas de los cannabinoides se puedan explotar para el tratamiento de los estados inflamatorios del dolor (Gutierrez y col., 2007).

II.2.3.2- Efecto cardiovascular

Aunque los datos no son absolutamente concluyentes, parece que los cannabinoides producen disminución de la presión arterial en sujetos normotensos y también en animales con hipertensión inducida por estímulos ambientales, esto ha dado pie al ensayo de compuestos cannabinoides en el tratamiento de la hipertensión inducida por el estrés.

El efecto más claro de la ingesta de THC o similares es el leve aumento del ritmo cardiaco (Beaconsf y col., 1972) no perjudicial para una persona normal. El THC produce vasodilatación con tolerancia rápida y taquicardia refleja.

Los efectos sobre el sistema cardiovascular, como con cualquier sustancia, dependen de la dosis, la vía de administración y la duración del consumo. La presión sanguínea aumenta ligeramente con el consumo ocasional. No hay indicios de que el THC tenga efectos directos sobre la circulación cerebral. Tampoco se producen cambios electrocardiográficos sustanciales (Hardman y col., 1976), habiéndose observado taquicardias sensuales, si bien a dosis elevadas pueden producir ligera hipotensión ortostática (Benowitz y col., 1979) aunque por poco tiempo, alteración electrocardiográfica inespecífica del segmento ST y onda T y extrasístoles ventriculares. También pudiera ocurrir la vasoconstricción cutánea y sensación de frío en extremidades por efecto reflejo compensador de los cambios hemodinámicos (Cami, 1988).

Los cannabinoides son vasodilatadores, por un doble mecanismo: en primer lugar, por modular la liberación de catecolamina (Duran y col., 2004) y, en segundo lugar, por acción directa sobre los receptores vanilloides (VR1) y posiblemente sobre otros receptores aún no definidos, que inducen la relajación de la fibra muscular vascular mediante un mecanismo dependiente de calcio y que conduciría a la hiperpolarización de dicha fibra muscular en virtud de la apertura de canales de potasio (Begg y col., 2005).

El hecho de que este mecanismo vasodilatador sea especialmente potente en las arterias mesentéricas ha hecho suponer a algunos autores que los endocannabinoides podrían participar en la vasodilatación esplácnica posprandial, que se pondría en marcha tras el aumento de calcio extracelular que conlleva la absorción de nutrientes (Begg y col., 2005).

II.2.3.3- Efecto sobre la actividad motora

Unos de los tipos de patologías que mayor interés suscita en relación a la posible utilidad de los cannabinoides, son las enfermedades motoras, ya que se ha demostrado que el sistema endocannabinoide participa en el control del movimiento, como lo hacen otros neurotransmisores más clásicos como la dopamina, el GABA o el glutamato (Consroe, 1998; Sañudo-Peña y col., 1999; Fernández-Ruiz y col., 2002). Dos de las enfermedades motoras de mayor incidencia, como son la enfermedad de Parkinson y el corea de Huntington, han centrado la mayor parte de los estudios acerca de una posible utilidad de los cannabinoides (Fernández-Ruiz y col., 2002).

Los efectos motores provocados por la activación de los receptores CB₁ con los diferentes tipos de cannabinoides vegetales, sintéticos o endógenos, son el resultado de la capacidad de estas sustancias de interferir en la actividad de los tres principales neurotransmisores implicados en la funcionalidad de los ganglios basales: dopamina, GABA y glutamato.

Una de las enfermedades neurológicas donde los cannabinoides podrían tener una prometedora acción terapéutica es la esclerosis múltiple. Esta enfermedad es un desorden de origen inmune que provoca diversas alteraciones a nivel neurológico, sobre todo al nivel motor (espasticidad, temblor y ataxia), que se producen como consecuencia de una profunda desmielinización y pérdida axonal (Riechman y Smith, 2001). Se ha visto que tanto la activación de los receptores CB₁ como de los CB₂ reduce la espasticidad de ratones con esta enfermedad (Baker y col., 2000a). También originan esta reducción los inhibidores de la recaptación de los endocannabinoides (Baker y col., 2000b). Este dato junto con la observación de que estos ratones tienen niveles altos de endocannabinoides en el cerebro y la médula espinal (Baker y col., 2003) y de que el desarrollo de la enfermedad en ratas produce alteraciones de la densidad y/o activación de los receptores CB₁, ha sido interpretado como indicativo de que la enfermedad provoca un aumento del tono endógeno cannabinoide como un mecanismo de protección frente al daño neurológico.

También hay descritos efectos farmacológicos de los cannabinoides en otras patologías motoras como son la disquinesia, la distonía (Fernández-Ruiz y col., 2002), Alzheimer, y Parkinson (Consroe, 1998).

En la tabla se recoge un resumen de los efectos motores producidos por la administración de diferentes tipos de cannabinoides en animales de experimentación. Estos datos, en su conjunto, apoyan la idea de que el sistema endocannabinoide desarrolla un importante papel a nivel de los ganglios basales, de forma que aquellas sustancias vegetales, sintéticas o endógenas que activan directa o indirectamente los receptores CB₁ producen efectos inhibitorios a nivel motor que se manifiestan por un aumento de la inactividad

llegando incluso a la catalepsia (Romero y col., 1995; González y col., 1999; Fernández-Ruiz y col., 2002).

Compuestos		Efectos motores
Cannabinoides vegetales	Δ^9 -tetrahidrocannabinol	↓ Actividad espontánea y estereotipada en ratas. ↑ Inactividad en ratas. ↑ Hipoquinesia inducida por reserpina en ratas. ↓ Hiperactividad inducida por anfetamina en ratas. Deterioro del control motor fino en ratas. Inducción de catalepsia en ratones. ↑ Actividad motora a dosis bajas.
	Cannabinol y cannabidiol	Producen inhibición motora aunque de menor magnitud.
Cannabinoides sintéticos	CP55,940 y WIN55,212-2	Marcada inhibición motora en ratas. Inducción de rotaciones a dosis bajas en ratones.
Endocannabinoides (también análogos sintéticos)	Anandamida	Inmovilidad en ratas. ↓ Estereotipias en ratas. ↓ Actividad espontánea en ratas. ↑ Catalepsia inducida por muscimol en ratas. Inducción de rotaciones a dosis bajas en ratones.
	Metanandamida	↑ Inactividad en ratas. ↓ Actividad espontánea y estereotipias en ratas.
Inhibidores de la recaptación	AM404, UCM707 y VDM11	↓ Actividad espontánea y ↑ inactividad en ratas.
Antagonistas de los receptores	SR141716A	Bloquea los efectos motores de los agonistas CB ₁ . Produce estereotipias e hiperlocomoción.

Tabla 1: Efectos más representativos a nivel motor de diferentes tipos de cannabinoides en animales de experimentación (Tomado de Fernández-Ruiz y col., 2002).

Los agonistas de los receptores CB₁ también son capaces de potenciar el efecto de otras sustancias que también reducen el movimiento, como el muscimol o la reserpina, o de atenuar el efecto hiperlocomotor de sustancias como la anfetamina (Fernández-Ruiz y col., 2002). Por el contrario, el bloqueo de estos receptores con antagonistas produce hiperlocomoción. No obstante, se debe mencionar que existen variaciones en cuanto a la magnitud y/o la duración de los efectos de los distintos tipos de cannabinoides vegetales, sintéticos o endógenos, variaciones que están relacionadas con sus diferencias en cuanto a afinidad por los receptores, potencia farmacológica y/o estabilidad metabólica.

Numerosos estudios desarrollados principalmente en la última década permiten realizar la siguiente afirmación: "el sistema endocannabinoide actúa como modulador a nivel de los ganglios basales y participa, por tanto, en el control de la actividad motora". Esta afirmación deriva de las siguientes observaciones:

- Los cannabinoides son capaces de producir importantes cambios en la actividad motora en humanos y animales de experimentación (Consroe, 1998; Fernández-Ruiz y col., 2002).
- Los cannabinoides alteran la funcionalidad de los tres neurotransmisores que tienen una participación más destacada a nivel de los ganglios basales, es decir, la dopamina, el GABA y el glutamato (Sañudo-Peña y col., 1999; Fernández-Ruiz y col., 2002).
- Los diferentes elementos que forman parte del sistema endocannabinoide, es decir tanto los ligandos endógenos como sus receptores, se encuentran presentes de forma abundante en los ganglios basales (Bisogno y col., 1999; Fernández-Ruiz y col., 2002).

Otra de las evidencias a favor de que la actividad endocannabinoide juega un papel en el control de la actividad motora es la importante presencia, en cantidad y calidad, de elementos de este sistema, principalmente de los receptores CB₁ y de sus ligandos endógenos, en las diferentes estructuras que forman los ganglios basales, lo que explica el por que de los marcados efectos motores de los agonistas CB₁.

En relación a la presencia de ligandos endocannabinoides en las estructuras motoras, puede decirse que también están en concentraciones superiores a las que se miden en otras regiones cerebrales, siendo particularmente abundantes en dos estructuras, el globo pálido y la substancia negra (Bisogno y col., 1999; Di Marzo y col., 2000).

II.2.3.4- Efecto antinociceptivo

Los agonistas de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ tienen efectos antinociceptivos en especies animales diferentes (ratón, rata, conejo, perro y mono) (Pertwee, 2001). Estos efectos antinociceptivos de los cannabinoides se han puesto de manifiesto en muchos modelos de comportamiento de nocicepción: los modelos mecánicos que miden las respuestas motrices, las pruebas químicas de dolores abdominales inducidos por fenilbenzoquinona (Welch y col., 1995). Estudios electrofisiológicos han confirmado ampliamente estos efectos antinociceptivos (Chapman y col., 1999).

Los cannabinoides han sido igualmente efectivos en diferentes modelos de dolores inflamatorios, como la hiperalgia inducida por carragenina (Mazzari y col., 1996), capsaicina (Li y col., 1999), formalina (Calignano y col., 1998) y la inflamación de la vejiga inducida por turpentina (Jaggar y col., 1998). Los agonistas cannabinoides han demostrado también una gran eficacia en los dolores de origen neuropático, como el dolor inducido por la ligadura unilateral del nervio ciático (Mao y col., 1995; 2000).

El sistema endocannabinoide constituye un mecanismo de defensa biológico importante contra el dolor agudo y patológico (Calignano y col., 1998; Rice, 2001). Los efectos neuronales de los cannabinoides son mediados sobre todo por los receptores cannabinoides (CB₁), que son receptores acoplados a la proteína G (GPCR_S) (Rice, 2001; Walter y Hohmann, 2005; Mackie, 2006). Los cannabinoides atenúan con eficacia la hipersensibilidad nociceptiva en modelos de animales con dolor crónico (Rice, 2001; Walter y Hohmann, 2005; Mackie, 2006).

Los receptores implicados en la actividad antinociceptiva de los cannabinoides pueden ser cannabinoides y no cannabinoides (vanilloides) (Pertwee, 2001).

Básicamente, la antinocicepción se debe a la activación de los receptores cannabinoides, sobre todo los CB₁. De esta manera, se puede establecer una alta correlación entre la potencia antinociceptiva de una serie de agonistas cannabinoides, su capacidad para desplazar radioligandos del receptor CB₁ y para inhibir la señal de traducción.

La actividad antinociceptiva cannabínérgica central se debe a la presencia de receptores a nivel supraespinal y espinal. La administración de agonistas cannabinoides permite la disminución de la intensidad de entrada del impulso nociceptivo en el cerebro al alterar el sistema de control ascendente y descendente. Por lo tanto, se reduce la percepción central del dolor y el descenso de la actividad espontánea y evocada de los centros supraespinales por la actuación de un sistema descendente (Meng y col., 1998; Hohmann y col., 1999). La actividad antinociceptiva de los cannabinoides es reducida aunque está preservada en ratas espinalizadas, lo que demuestra la participación de los mecanismos espinales en esta respuesta antinociceptiva (Hohmann y col., 1999). Una actividad antinociceptiva de los agonistas cannabinoides ha sido igualmente demostrada en conejos espinalizados (Clarke y col., 2001).

La acción cannabínérgica periférica se confirma comprobando la antinocicepción tras la administración intradérmica de agonistas CB₁ y CB₂ (Richardson y col., 1998; Malan y col., 2001). Existen sistemas de modulación nociceptiva regulados por la acción agonista-receptor cannabinoide. La relación más importante es la que implica al sistema opioide (Manzanares y col., 1999). Los mecanismos bioquímicos que explican la interacción sinérgica entre el sistema cannabinoide y opioide pueden relacionarse con la interacción a nivel de la traducción de las señales causadas por el agonista opioide y cannabinoide y la liberación o no de diversos mediadores relacionados con la modulación de la nocicepción e inflamación.

Es interesante mencionar que los cannabinoides y opioides inducen una inhibición gabaérgica de las neuronas que se proyectan desde la sustancia gris periacueductal y bulbo ventromedial rostral al no permitir su liberación (Vaughan y col., 1999), y facilitan la liberación de noradrenalina en neuronas descendentes (Lichtman y Martin, 1991; Pertwee,

2001). Por otro lado, la administración de cannabinoides aumenta la liberación y síntesis de péptidos opioides endógenos (Manzanares y col., 1999). De esta manera, la administración de agonistas del receptor cannabinoide CB₁ estimula la transmisión opioidérgica (fundamentalmente encefalinas, dinorfinas y β -endorfina). Este mecanismo implica la potenciación de la antinocicepción mediante la acción sinérgica de opiáceos y cannabinoides y/o mediante la asociación de agentes cannabinoides con inhibidores selectivos de la degradación de opioides (Fuentes y col., 1999).

Otras relaciones entre el cannabis y las sustancias moduladoras de la nocicepción implican al neuropéptido CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina), un neuropéptido con función álgica (Richardson y col., 1998). Los cannabinoides modulan la inflamación neurogénica al inhibir la neurosecreción del CGRP en las terminaciones centrales y periféricas de fibras aferentes primarias. Los cannabinoides inhiben la producción de eicosanoides por lo que facilitan la antinocicepción al actuar sobre mediadores de la inflamación (Martin, 1986).

II.2.3.5- Efecto sobre el sistema nervioso central (SNC)

Los efectos de los cannabinoides sobre el SNC son los más relevantes ya que constituyen la base de su abuso y se asocian a algunas de las complicaciones más frecuentes tras el consumo agudo y crónico.

Efecto	Consecuencia clínica
Efectos psicológicos	Euforia, bienestar, relajación, somnolencia
Efectos cognitivos	Alteración de la memoria a corto plazo, dificultad en la concentración
Efectos sobre el rendimiento psicomotor	Empeoramiento tiempo reacción y atención. Incoordinación motora
Efectos sobre la conducción de vehículos	Empeoramiento conducción. Mayor riesgo de accidentes
Efectos sobre el sueño	Somnolencia
Efectos sobre el apetito	Aumento del apetito
Analgesia	Disminución del dolor

Tabla 2: Efectos centrales agudos del cannabis
(Tomado de Ministerio de Sanidad y Consumo, Comisión Clínica de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas. Cannabis 2006).

II.2.3.5.1- Efectos psicológicos agudos

Los preparados del cannabis se han utilizado desde hace mucho tiempo por sus propiedades psicoactivas. El principal responsable de la actividad farmacológica psicoactiva es el THC y su administración produce efectos similares al cannabis en humanos (Wachtel y col., 2002).

El consumo de cannabis produce generalmente un efecto bifásico. Tras una fase inicial de estimulación, euforia, bienestar, aumento de la percepción, ansiedad (Maykut, 1985), le sigue una fase donde predomina la sedación (relajación, somnolencia, sueño). Se produce una agudización de las percepciones visuales, auditivas y táctiles, así como una ligera distorsión del espacio y tiempo. También aparece risa fácil y locuacidad e incremento de la sociabilidad en un entorno social. Paralelamente se altera la memoria reciente, y existe dificultad en la concentración, disminución de la atención e incoordinación motora (Ahston, 2001; Abanades y col., 2005).

El uso aislado en sujetos sensibles, inexpertos o predisuestos produce episodios breves de ansiedad, pánico, depresivos o maniformes, despersonalización y desrealización, conductas bizarras y autoheteroagresivas, delirios o alucinaciones (Fehr y Kalant, 1983; Negrete, 1984; Hollister, 1988; Adams y Martin, 1996).

También ha sido descrito un estado psicótico con síntomas esquizofrénicos y maníacos con una duración de semanas o meses, la llamada “psicosis cannábica” (Ghodse, 1986), cuya existencia está en discusión (Thomas, 1983), aunque estudios recientes parecen confirmar su existencia (Núñez Domínguez y Gurpegui, 2002), que puede cronificarse con la esperanza de que esta sustancia le libre de los síntomas que padece.

Actualmente disponemos de varias revisiones sistemáticas de los estudios publicados sobre la asociación entre consumo de cannabis y psicosis (Arseneault y col., 2004; MacLeod y col., 2004; Smit y col., 2004; Semple y col., 2005; Henquet y col., 2005; Fergusson y col., 2005). Globalmente estos estudios muestran que el consumo de cannabis puede aumentar en 2-3 veces el riesgo de aparición psicosis a lo largo de la vida.

Se han descrito una serie de mecanismos biológicos que pueden explicar todo esto. Los más probables implican los efectos del THC en la regulación de la dopamina en el cerebro. La hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia propone que los síntomas psicóticos están causados, al menos en parte, por un aumento en la transmisión dopaminérgica por las terminales nerviosas que proyectan en el sistema límbico y en el neocórtex. Hay evidencia que la estimulación de los receptores cannabinoides por el THC pueden aumentar la liberación de dopamina (Cheer y col., 2004).

Otro mecanismo implicado puede ser la sensibilización dopaminérgica inducida por el consumo regular de cannabis, en la que los sujetos se hacen progresivamente más vulnerables a las alteraciones cognitivas y perceptivas inducida por la dopamina y progresan a síntomas psicóticos completos (Howes y col., 2004). En general se puede afirmar que los estudios neurobiológicos sobre los efectos del cannabis en el SNC sugieren claramente que esta sustancia afecta el sistema dopaminérgico, el cual tiene un papel clave en el desarrollo de los síntomas psicóticos (Fergusson y col., 2006).

II.2.3.5.2- Efectos cognitivos

Uno de los efectos comportamentales más comúnmente informados de los cannabinoides es el deterioro que estas sustancias producen en procesos de aprendizaje y memoria. Existen muchos datos en la literatura que demuestran que los cannabinoides perjudican los procesos cognitivos (aprendizaje y memoria) tanto en humanos como en primates y en roedores.

El uso diario y durante periodos prolongados de cannabis puede producir deficiencia en la memoria, en la atención, la capacidad psicomotora y la velocidad de procesamiento de la información (Iverson, 2003). Estas alteraciones parecen relacionarse con cambios funcionales, del flujo sanguíneo, y metabólicos en regiones prefrontales y cerebrales que se observan en estudios de neuroimagen en usuarios crónicos de cannabis (Pope y col., 1995; Rogers y col., 2001; Verdejo-García y col., 2004; Lundqvist, 2005).

Los efectos agudos de los cannabinoides sobre la memoria se cree que son debidos a sus efectos directos sobre el hipocampo. Diversos estudios comportamentales indican que existe una conexión entre el déficit de memoria mediado por cannabinoides y el deterioro de la función del hipocampo.

Una explicación alternativa para los efectos negativos de los cannabinoides sobre procesos cognitivos implica al sistema colinérgico septohipocambal. Se considera que este sistema juega un papel central en la adquisición y almacenamiento de información. Hay datos que sugieren que los cannabinoides interaccionan con el sistema colinérgico septohipocampal. Así, los cannabinoides inhiben la liberación de acetilcolina en el hipocampo de rata tanto *en vitro* (Gifford y Sabih, 1996) como *in vivo* (Gessa y col., 1997). Por contraste, la liberación de acetilcolina hipocampal es aumentada por el antagonista del receptor CB₁ así como en ratones deficientes en receptor CB₁ (Kathmann y col., 2001). Estos datos sugieren que la actividad hipocampal colinérgica puede mediar los efectos de los cannabinoides sobre la memoria.

Hay datos que demuestran que la liberación del neuropéptido CCK en el hipocampo se relaciona con la adquisición de la memoria espacial en ratas. Un estudio más reciente indica que el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 induce una fuerte inhibición de la liberación

(inducida por potasio) de CCK por neuronas hipocampales (Beinfeld y Connolly, 2001). Por tanto, la inhibición de la liberación de CCK mediada por el receptor CB₁ en el hipocampo podría también contribuir a los defectos de aprendizaje y memoria producidos por los cannabinoides.

Existen también datos que indican que el sistema dopaminérgico está implicado en el déficit cognitivo inducido por cannabinoides (Chaperon y Thiébot, 1999). Se ha encontrado que el sulpiride, un antagonista del receptor D₂ de dopamina, bloqueaba tanto la inhibición de la concentración de acetilcolina hipocampal como el déficit de memoria (Laberinto en T) inducido por el THC. Según estos resultados, el deterioro de la memoria y la inhibición de la concentración de acetilcolina extracelular en el hipocampo estarían mediados por la activación concomitante de los receptores D₂ dopaminérgicos y CB₁ cannabinoides. También se ha propuesto que durante un tratamiento crónico con THC, la hiperactividad del sistema dopaminérgico en áreas límbicas y corticales podría ser responsable del déficit de memoria persistente que se observa durante un tratamiento crónico con THC o en abusadores de cannabis.

Los ratones deficientes en receptores CB₁ (*Knockout*) muestran una PLP aumentada, (concepto de potenciación a largo plazo que se refiere al aumento y facilitación de larga duración de la transmisión sináptica producida tras una estimulación breve pero de alta frecuencia), (Bohme y col., 2000), así como una mejor retención de memoria en un test de reconocimiento de objetos. Además, muestran un aumento significativo en las respuestas condicionadas producidas en un modelo de evitación activa, lo que también sugiere una mejora en los procesos de aprendizaje y memoria (Martín y col., 2002). Por tanto, estos estudios con ratones deficientes en receptor CB₁ apoyan la hipótesis de que en condiciones fisiológicas está presente un tono cannabinoide endógeno que está implicado en la modulación de los procesos de aprendizaje y memoria.

II.2.3.5.3- Efecto neuroprotector

Diversos estudios en los últimos años sugieren que los cannabinoides podrían desarrollar un importante papel en la neuroprotección, tanto ante los procesos neurodegenerativos agudos como el daño cerebral hipóxico-isquémico o el traumático, como antes procesos crónicos como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer (Mechoulam y col., 2002; Baker y col., 2003).

Varios efectos fisiológicos de los cannabinoides justificarían su posible papel en la encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal (EHIN). Es conocido que tras un episodio hipóxico-isquémico, la disfunción de las bombas iónicas, con la consiguiente alteración de la polaridad transmembrana, permite la entrada de masivas cantidades de calcio en la neurona, lo que activa diferentes enzimas destructivas (Martín y Martínez- Ogrado, 2000), la disfunción

de las bombas permite asimismo la acumulación de neurotransmisores excitotóxicos, como el glutamato, que diversos estudios (Fernández-López y col., 2005), han señalado como una pieza de extraordinaria importancia en la cascada neurotóxica (Martín y Martínez-Ogrado, 2000; Fernández-López y col., 2005).

La acumulación de glutamato crece progresivamente, como causa y efecto de un aumento de la entrada de calcio en la célula, asimismo, el glutamato coadyuva a la activación de la síntesis de citocinas, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), así como a la inducción de la sintetasa de óxido nítrico inducible (NOS) (Fernández-López y col., 2005), que conduce a la producción de masivas cantidades de NO (Martín y Martínez-Orgado, 2000), tanto citocinas como NO resultan lesivos para la neurona. Finalmente, durante la fase de reperfusión la llegada de grandes cantidades de radicales libres de oxígeno inicia un proceso de estrés oxidativo, ampliado y agravado por el NO, así como por la llegada de células inflamatorias activadas que liberan más radicales libres y más citocinas (Martínez-Orgado y col, 2005).

En este escenario, los cannabinoides aportan, como primer efecto positivo, el de reducir sustancialmente la entrada de calcio en la neurona (Freund y col., 2003; Howlett y col., 2004; Stella, 2004), Además, los cannabinoides son antioxidantes, vasodilatadores, inmunomoduladores y potencian la actividad de los astrositos (Stella, 2004; Mechoulam y col., 2002; Baker y col., 2003). Estos datos explican resultados que demuestran que el agonista de los receptores cannabinoides WIN 55,212-2 ejerce un potente efecto neuroprotector en ratas recién nacidas (Martínez-Ogrado y col, 2003).

Los endocannabinoides, anandamida y 2-araquidonoilglicerol ejercen también un papel neuroprotector *in vivo* en modelos de daño cerebral por excitotoxicidad o trauma mecánico, respectivamente (van der Stelt y col., 2001b; Panikashvili y col., 2001). Además, como ocurre en los procesos de lesión cerebral, la síntesis de endocannabinoides se activa por un aumento en la concentración citoplasmática de Ca^{2+} , lo que podría ejercer una función neuroprotectora (Piomelli y col, 2000; Hansen y col., 2001). Todos estos hallazgos han conducido a la propuesta de que una de las funciones biológicas más relevantes del sistema endocannabinoide sería la neuroprotectora (Piomelli y col, 2000, Porter y Felder, 2001; Mechoulam y col., 2002). Las características de los endocannabinoides han conducido a varios autores a postular que el cannabinoide podría constituir un sistema natural de neuroprotección (Mechoulam y Lichtman, 2003).

El THC y el WIN 55,212-2 protegen las neuronas hipocampales contra la excitotoxicidad inducida por un patrón aberrante de la actividad sináptica glutamatérgica. La exposición prolongada al WIN 55,212-2 o al THC desensibiliza la inhibición de la actividad sináptica mediada por los receptores CB1, y disminuye la neuroprotección producida por cualquier droga. El efecto de la eficacia del agonista y la desensibilización del receptor CB1

en la supervivencia neuronal son factores importantes a considerar en la modulación de la señalización de los receptores cannabinoides (Gilbert y col., 2007).

Los cannabinoides desempeñan un papel neuromodulador como mensajeros retrógrados inhibiendo presinápticamente los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje dependiente y con ello la liberación de diversos neurotransmisores (Wilson y Nicoll, 2001), entre ellos el glutamato, que cuando se produce en exceso posee efectos neurotóxicos bien demostrados (Piomelli y col., 2000; Schlicker y Kathman, 2001). Aparte de este efecto sobre las propias neuronas, los cannabinoides podrían ser neuroprotectores por su propia naturaleza antioxidante (Hansson y col., 1998) o por sus acciones sobre las células de glía, que modulan la función neuronal en el cerebro. Entre estas últimas acciones podríamos destacar la inhibición de la producción de óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias, el bloqueo de la señalización de Ca^{2+} a través de las uniones en hendidura, y el aumento en el aporte de nutrientes a las neuronas (Guzmán y col., 2001), así como el propio efecto glioprotector.

Los cannabinoides han demostrado un efecto inductor de apoptosis en células en cultivo, especialmente en precursores gliales (Guzmán y col., 2002). Este efecto, relacionado con la estimulación de la producción de ceramida y la expresión de genes de respuesta rápida, parece muy dependiente del grado de diferenciación celular, lo que ha motivado la investigación del posible uso de los cannabinoides en el tratamiento de tumores de baja diferenciación, como los gliomas o el adenocarcinoma de mama (Guzmán y col., 2002; Duran y col., 2004).

Un nuevo papel de los cannabinoides es su implicación en la fiebre inducida por los lipopolisaccharidos (LPS) bacterianos. Los resultados de Benamar y colaboradores (2007) han demostrado que los cannabinoides interaccionan con la inyección sistémica de los LPS bacterianos e indican un papel del receptor CB_1 en la patogénesis de la fiebre inducida por los LPS.

II.2.3.6- Efecto sobre el aparato digestivo

II.2.3.6.1- Efecto sobre la ingesta

El THC y otras agonistas cannabinoides producen sensación de apetito y un efecto antiemético que pudiera ayudar en el incremento de ingesta en personas con algún grado de anorexia, de interés en los casos de sida, de anorexia nerviosa ó cáncer terminal ampliamente demostrado desde los trabajos de Hollister (1971) hasta los de Randall (1990).

Los receptores cannabinoides CB_1 están implicados fuertemente en la regulación de la ingesta (Di Marzo y Matías, 2005; Wiley y col., 2005). Estos receptores están presentes en el SNC y en los sistemas periféricos. En el cerebro, los receptores CB_1 se han identificado en las estructuras responsables de la recompensa y del balance energético (Cota y col., 2003; Robbe

y col., 2003; Pickel y col., 2004). Mientras en los sistemas periféricos, se han identificado en el intestino (Crocí y col., 1998; Kulkarni-Narla y Brown, 2000; Coutts y col., 2002), así como en los hepatocitos (Osei-Hyiaman y col., 2005) y en el tejido adiposo (Bensaid y col., 2003; Cota y col., 2003).

La administración de las agonistas de estos receptores CB₁ como THC, WIN 55,212-2, los endocannabinoides, anandamida y 2-arachidonilglicerol (2AG), produce un aumento de la ingesta en humanos (Hart y col., 2002) y en animales (Williams y Kirkham, 2002; Berry y Mechoulam, 2002; Gómez y col., 2002), mientras los antagonistas disminuyen la ingesta y producen un efecto hipofágico, entre ellos el SR 141716A (Verty y col., 2003; McLaughlin y col., 2003; Kirkham y Williams, 2004; Verty y col., 2004; Järbe y DiPatrizio, 2005) y el AM 251 (Shearman y col., 2003; Hildebrant y col., 2003; Chen y col., 2004; Chambers y col., 2004; Chambers y col., 2005; Rodgers y col., 2005; McLaughlin y col., 2005). Este efecto es dosis dependiente (Vickers y col., 2003; Bensaid y col., 2003).

Recientemente, un análogo de Δ^8 -tetrahidrocannabinol, con una alta afinidad para los receptores cannabinoides CB₁, fue desarrollado, este "antagonista silencioso" llamado O-2050 inhibe la ingesta y también la actividad locomotora (Gardner y Mallet, 2006).

El antagonista SR141716A disminuye el consumo de alimento con buenas propiedades organolépticas en ratas (Rinaldi-Carmona y col., 1994; Arnone y col., 1997; Carai y col., 2004), atenúa el consumo de alcohol en ratones (Wang y col., 2003), e inhibe el efecto orexigénico de anandamida en ratas (Williams y Kirkham, 1999). El SR141716A es particularmente potente en la inhibición de la ingesta en animales genéticamente obesos tales como ratones ob/ob, ratones db/db, ratas fa/fa Zucker y animales alimentados con dietas altas en grasas (Di Marzo y col., 2001; Vickers y col., 2003). Un estudio reciente mostró que el tratamiento agudo y crónico con SR141716A (10mg/kg, i.p.) activa la termogénesis en ratones obesos, según lo revelado por un aumento en el consumo de oxígeno (Liu y col., 2005). Este efecto estaba acompañado por un aumento en la absorción de la glucosa inducido por el SR141716A en el músculo esquelético aislado, sugiriendo un efecto de este antagonista en la homeostasis de la glucosa.

Recientes evidencias en ratas sugieren que el antagonista SR141716A puede inducir la evitación del gusto condicionado, que es una disminución del consumo de alimento después de asociar el alimento con un estímulo potencialmente aversivo (De Vry y col., 2004). Además, Parker y Mechoulam (2003) han encontrado que la inyección de la dosis de 2.5 mg/kg de SR141716A reforzaron las reacciones condicionadas del rechazo a la sacarina que fueron producidas por la coadministración del litio. Estos resultados sugieren la posibilidad de que el efecto anoréxico del SR 141716A se debe a la inducción de náuseas.

La depleción del gen que codifica los receptores CB₁ se ha asociado a una disminución de la ingesta en ratones *knokout* privados de comida (Ledent y col., 1999; Zimmer y col., 1999) que comen menos que los ratones controles (Di Marzo y col., 2001; Cota y col., 2003), así como una disminución de la masa de grasa y del peso corporal (Cota y col., 2003). Actualmente, los ratones *knokout* son el único roedor genético dirigido para expresar un fenotipo magro. La pérdida del peso en estos animales se asocia a una reducción de la ingesta diaria, y de la síntesis y el almacén de grasa (Cota y col., 2003; Ravinet-Trillou y col., 2004; Jbilo y col., 2005; Osei-Hyiaman y col., 2005).

También se demostró un efecto de la administración crónica de las agonistas y antagonistas de los receptores CB₁. El efecto hipofágico del antagonista AM 251 fue descrito por Chambers y colaboradores (2004; 2005) a dosis de 1.25, 2.5, 1 y 5mg/kg, y Hildebrandt y colaboradores (2003) a dosis de 3 y 30mg/kg, los cuales observan una disminución significativa de la ingesta dosis dependiente tras la administración crónica del fármaco. Otros autores (Colombo y col., 1998; Bensaid y col., 2003; Ravinet-Trillou y col., 2003; Vickers y col., 2003) han confirmado este efecto inyectando el antagonista de los receptores cannabinoides SR 141617 a dosis de 2.5 y 10mg/Kg. Este efecto hipofágico produce una pérdida del peso corporal de los animales sugiriendo que este antagonista pueda tener cierta utilidad en el tratamiento de la obesidad (Van Gaal y col., 2005).

Los endocannabinoides parecen tener un papel importante en los sistemas que regulan el apetito y el peso corporal. La activación de los receptores CB₁ por los endocannabinoides se considera como un factor central en el control neuronal del apetito (Harrold y col., 2002 a, b). Un trabajo más reciente, sin embargo, ha implicado fuertemente un papel del sistema endocannabinoide en el comportamiento alimentario en roedores (Ravinet Trillou y col., 2003; 2004) así como en ser humano. La implicación de los endocannabinoides en la regulación de la ingesta esta vinculada a la presencia de la leptina en plasma (Di Marzo y col., 2001). Los resultados obtenidos por Di Marzo y col., 2001 han demostrado que las señales defectuosas de leptina se relacionan con la presencia de niveles elevados de endocannabinoides en el cerebro de los ratones obesos db/db y ob/ob.

Williams y Kirkham han demostrado que la anandamida, vía receptores CB₁, produce hiperfagia en ratas y que su efecto sobre el apetito puede ser variable dependiendo de la dosis y de las circunstancias experimentales (Williams y col., 1999). Otro estudio puso en evidencia que la anandamida a dosis bajas provoca una disminución significativa en la concentración en tégido de noradrenalina, dopamina y de serotonina a nivel del hipotálamo en ratas sometidas a un régimen de consumo de alimento restringido (40%) (Hao y col., 2000) sin olvidar que su administración en el hipotálamo y precisamente en el VMH, estimula la ingesta (Jamshidi y col., 2001).

El mantenimiento de la homeostasis energética y del peso corporal implica la regulación coordinada del comportamiento en relación al apetito y al metabolismo energético periférico (Seeley y Woods, 2003), tal como se demuestra la capacidad de la leptina de reducir el apetito para regular el metabolismo de la grasa en el hígado (Cohen y col., 2002). Los endocannabinoides son mediadores lipídicos que modulan el comportamiento en relación al apetito a través la activación de los receptores CB₁ (Williams y Kirkham, 1999; 2002). Estructuras hipotálamicas, y terminales de nervios sensoriales periféricos han estado implicados en mediar el efecto orexigénico de los endocannabinoides, que es reforzado por el hambre o en la hiperfagia asociada a la obesidad (Di Marzo y col., 2001; Kunos y col., 2002; Vickers y col., 2003) y antagonizado por el bloqueo de los receptores CB₁. De hecho, los antagonistas del receptor CB₁ demuestran capacidad en el tratamiento de la obesidad (Vastag, 2003).

Los ratones deficientes en receptores CB₁ son resistentes a la obesidad inducida por la dieta aunque su ingesta calórica total sea similar al grupo control, que llegan a ser obesos con la misma dieta (Ravinet-Trillou y col., 2004), esto sugiere que los endocannabinoides y los receptores CB₁ regulan el metabolismo energético. De hecho, los adipocitos expresan los receptores CB₁, el estímulo de los cuales puede afectar el metabolismo de la grasa regulando el nivel de la adiponectina (Bensaid y col., 2003), hormona derivada de los adipocitos, o aumentando la actividad de la lipoproteína lipasa (Cota y col., 2003).

Recientemente, otros autores han demostrado que los endocannabinoides también tienen el hígado como su tejido diana, donde la activación de los receptores CB₁ produce un aumento en la síntesis de ácidos grasos con la inducción del factor de transcripción lipogénica SREBP-1c y de su grupo de enzimas dianas ACC1 y FAS (Osei-Hyiaman y col., 2005). Los resultados también sugieren que la activación de esta vía por el agonista endógeno anandamida en el hígado tiene un papel dominante en el desarrollo de la obesidad inducida por la dieta y en el hígado graso. Las mismas vías moleculares son inducidas por la activación de CB₁ en el hipotálamo, donde la inhibición de FAS se ha demostrado previamente para dar lugar a una anorexia profunda (Loftus, 2000; Kim y col., 2002). Así, éstos resultados sugieren que la misma vía molecular está implicada en los efectos apetitivos centrales y los efectos anabólicos periféricos de los cannabinoides.

Se han presentado varias líneas de la evidencia de que los endocannabinoides actúan directamente en el hígado para estimular la síntesis de la grasa, y se demostró por primera vez, la presencia de los receptores CB₁ en los hepatocitos usando una combinación de técnicas (Osei-Hyiaman y col., 2005).

Estos datos, junto con el papel neuromodulator de los endocannabinoides establecido a través de los receptores CB₁ (Di Marzo y col., 2004), sugirieron que el sistema endocannabinoide del cerebro controla la ingesta en dos niveles: Primero, refuerza

tónicamente la motivación para encontrar y para consumir los alimentos, posiblemente obrando recíprocamente con las vías mesolímbicas implicadas en el mecanismo de la recompensa. En segundo lugar, se activa a demanda en el hipotálamo después de la privación a corto plazo del alimento y después regula transitoriamente los niveles y/o la acción de otros mediadores orexigenicos y anoréxicos para inducir el apetito.

Se ha sugerido que tras la privación del alimento, un nivel elevado de los endocannabinoides está ligado a los niveles elevados de grelina en la circulación sanguínea. Esto puede ser la base de algunos de los efectos orexigenicos de este péptido cuando se inyectada en el hipotálamo de la rata, efectos que están en hecho bloqueados por el antagonista de los receptores CB₁, el SR141716A (Tucci y col., 2004).

El sistema endocannabinoide puede influenciar la ingesta regulando la expresión y/o la acción de varios mediadores anoréxicos y orexigenicos hipotalamicos. Los receptores CB₁ se colocan con la hormona CRH en el núcleo paraventricular (PVN), con la hormona concentrada de la melanina en el hipotálamo lateral, y con la orexina en el hipotálamo ventromedial (Cota y col., 2003; Horvath, 2003). La depleción genética de los receptores CB₁ aumenta la expresión de CRH, señalando a una inhibición tónica de la expresión de este mediador anoréxico por los endocannabinoides. Adicionalmente, en el PVN, los endocannabinoides postsinápticos inhiben retrógradamente la liberación glutamatergica de las neuronas presinápticas, así mediando la inhibición rápida, inducida por la corticosterona, y de la hormona CRH en este núcleo (Di y col., 2003).

Poco se sabe del mecanismo de acción a través del cual los cannabinoides producen su conocido efecto orexigénico. Al ser el neuropéptido Y es uno de los factores orexigénicos más potentes y un mediador principal en el control hipotalamico de la ingesta. Gamber y colaboradores (2005) han examinado el efecto de la inyección del agonista de los receptores cannabinoides el CP55, 940 y el agonista inverso AM 251 sobre la liberación del NPY, sus resultados han demostrado que los cannabinoides aumentan la liberación del NPY por el hipotálamo lo que podría tratarse de un mecanismo potencial para explicar la actividad orexigénica de los cannabinoides.

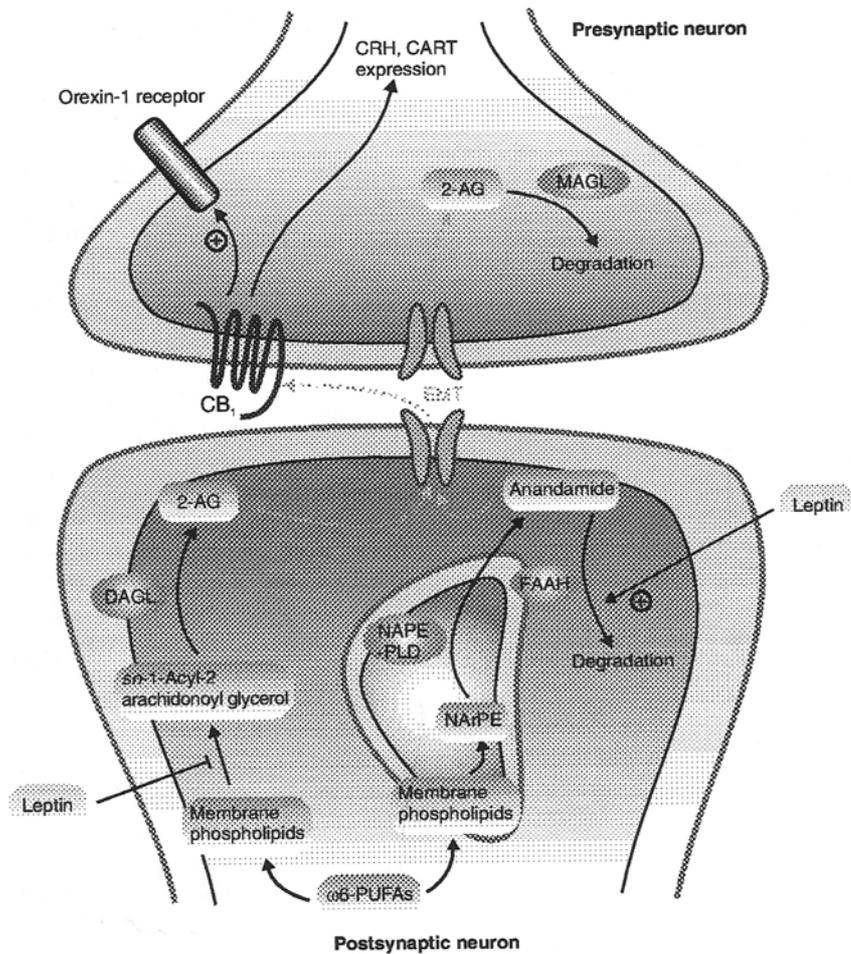


Figura II₁₃: El sistema endocannabinoide en las neuronas
(Tomado de Di Marzo y Matías, 2005)

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

CART: Peptido regulador de la Transcripción de la anfetamina y cocaína

MAGL: monoacilglicerol lipasa

DAGL: Diacilglicerol lipasa

NAPE-PLD: N- acetil fosfatoetanolamina

NArPE: N-araquidonil- fosfatidil etanolamina

ω6-PUFAS : Ácidos grasos ω6 polinsaturados derivados de la dieta

El estímulo de los receptores CB₁ también causa la sensibilización de los receptores orexina-1 cuando las dos proteínas se expresan en la misma célula, con la mejora subsecuente de la posible acción inductora del apetito de las orexinas (Hilairet y col., 2003). No se encontró ninguna co-expresión de los receptores CB₁ y del neuropeptido Y, pero parece que la activación de los endocannabinoides a consecuencia de NPY media algunos de sus efectos

orexigénicos, que, por consiguiente, están atenuados por la inhibición farmacológica o genética de los CB₁. En contraste, el antagonista SR141716A es eficaz como agente anoréxico tanto en el grupo control como en ratones deficientes de NPY (Di Marzo y col., 2001).

Finalmente, los receptores CB₁ parecen inhibir también el efecto anoréxico de los receptores melanocortina-4 (Verty y col., 2004). Referente al sistema mesolímbico, la evidencia apoya la hipótesis de que los endocannabinoides aumentan el deseo para comer aumentando la liberación de la dopamina en los núcleos accumbens, o sinergizando la acción de los opiodes a través de mecanismos no definidos hasta ahora (Rowland y col., 2001; Williams y Kirkham, 2002; Chen y col., 2004).

El sistema endocannabinoide del cerebro parece ser muy importante en el control de la ingesta en roedores jóvenes y aún más en los ratones recién nacidos, donde el bloqueo farmacológico de los receptores CB₁ en el primer día postnatal (PND1) conduce a la supresión de la ingestión de la leche de las crías y eventual a la muerte (Fride, 2004). Los ratones recién nacidos que carecen a los receptores CB₁ también ingieren menos leche, pero con consecuencias menos mortales (Fride, 2004). Esta observación es particularmente notable porque los niveles 2-AG se aumentan en el cerebro de la rata en PND1 y se encuentran en leche altas concentraciones de 2AG (Di Marzo, 1998).

Otro punto de comprobación en el cual el sistema endocannabinoide actúa sobre la ingesta ocurre en el nervio vago que conecta el aparato gastrointestinal con los núcleos de la médula y del tallo cerebral implicados en el control de la saciedad. En la rata, la privación del alimento aumenta los niveles de anandamida en el duodeno. Aquí el endocannabinoide puede reducir la saciedad actuando sobre el nervio vago, según lo sugerido por la acción anoréxica de la administración periférica del SR141716A y por la desaparición de esta acción después de la destrucción de los nervios vágales sensibles a la capsaicina que también media saciedad inducida por la colecistokinina (CCK) (Gómez y col., 2002).

Existe una relación entre la sensación de saciedad producida por el CCK y los receptores endocannabinoides. La privación del alimento aumenta la expresión de los receptores CB₁ en las neuronas del ganglio nodular de la rata, que expresan receptores CCK-1 y que se proyecta al duodeno. La realimentación o el tratamiento con CCK reestablece los niveles altos de los receptores CB₁ en estas neuronas (Burdyga y col., 2004).

Burdyga y colaboradores (2004) sugieren que la CCK disminuye los niveles de receptores CB₁ en las neuronas aferentes del vago, y así disminuyendo la capacidad de los endocannabinoides a mejorar el apetito. Estos autores también sugieren que el ayuno suprimiría la sensación de saciedad al aumentar los niveles de los receptores CB₁ en las

neuronas intestinales y desbloquea el efecto inhibitorio que causa la CCK sobre dichos receptores, así desinhibiendo el sistema endocannabinoide en el nervio vago.

Finalmente, al encontrar los niveles alterados de endocannabinoides en la sangre de mujeres con anorexia nerviosa y desorden en la ingesta, pero no la bulimia nerviosa (Monteleone y col., 2005), la investigación futura debe también tratar el papel y la regulación posibles del sistema endocannabinoide en estos desórdenes. Un estudio reciente (Sipe y col., 2005), demostró que el exceso de peso en seres humanos está asociado a un mal funcionamiento de una de las enzimas que degradan los endocannabinoides, postulando la hipótesis de un sistema endocannabinoide hiperactivo como posible causa de la obesidad.

II.2.3.6.2- Efecto sobre las secreciones gastrointestinales

Los receptores CB₁ se han encontrado en el sistema digestivo (Pertwee, 2001), donde median varias funciones, incluyendo la inhibición de la secreción del ácido gástrico (Coruzzi y col., 1999; Adami y col., 2002), la contractilidad y el vaciado gástrico (Izzo y col., 1999; Krowicki y col., 1999), la motilidad intestinal (Landi y col., 2002; Casu y col., 2003), y la secreción (Izzo y col., 2003), así como aumento de la defensa mucosal gástrica (Germanó y col., 2001).

En distintos estudios, se ha demostrado que la inmunoreactividad a los receptores CB₁ estaba presente en los elementos neuronales que inervan el músculo liso, la mucosa y los vasos sanguíneos submucosales (Adami y col., 2002). De acuerdo con esto, el receptor CB₁ fue localizado en neuronas periféricas del plexo mientérico en diversas especies animales (Griffin y col., 1997; Kulkarni-Narla y Brown, 2000; Pinto y col., 2002).

Se ha demostrado el efecto inhibitorio de la secreción gástrica de las agonistas de los receptores CB₁ inducido por la pentagastrina y 2-deoxi-D-glucosa en ratas anestesiadas (Adami y col., 2002; 2004), mientras no se observó este efecto cuando la secreción gástrica está inducida por la histamina. Estos datos confirman y amplían los estudios anteriores que indican que los agonistas de los receptores CB₁ redujeron los efectos secretorios tras una sola administración de la pentagastrina (Coruzzi y col., 1999; Adami y col., 2001). La ausencia del efecto sobre la secreción gástrica inducida por la histamina excluye la presencia del receptor CB₁ en las células parietales. Esto apoya la posibilidad de un control de la secreción ácida estimulada vagalmente modulado por los receptores CB₁.

Sin embargo, el papel significativo del sistema nervioso central en la regulación de la secreción gástrica que se debe de una parte a la presencia de los cannabinoides endógenos en el cerebro y también, a la distribución de los receptores CB₁ en las áreas del cerebro que controlan las funciones gastrointestinales, tales como el complejo vagal dorsal (Taché, 1987; Wenger y Moldrich, 2002), sugiere la posibilidad que los cannabinoides puedan influir en la

secreción gástrica también por los mecanismos centrales. La administración intracerebroventricular de las agonistas WIN 55,212-2 y HU-210 podía modificar la secreción gástrica inducida por la pentagastrina (Adami y col., 2001).

El agonista de los receptores CB₁, el WIN 55,212-2 reduce las úlceras gástricas inducidas por el stress en ratas (Germanó y col., 2001). Este efecto está contrarrestado por el antagonista SR141716A pero no por el SR144528 (antagonistas de los receptores CB₁ y CB₂ respectivamente), eso indica la implicación de los receptores CB₁. El efecto antiulcerativo del WIN 55,212-2 se podría relacionar con su efecto antisecretorio (Izzo y col., 2001; Di Carlo y Izzo, 2003).

Los agonistas de los receptores cannabinoides también reducen la acumulación del fluido intestinal *in vivo* (Izzo y col., 1999a; Tyler y col., 2000; Pertwee, 2001). Sin embargo, no se sabe si este efecto de los cannabinoides sobre la acumulación del fluido implicó una acción inhibitoria directa sobre el transporte mucosal, produciendo cambios en la motilidad intestinal, o era debido a los cambios en el flujo intestinal sanguíneo. Todo esto podía producir la inhibición significativa de la acumulación del fluido intestinal.

Los resultados de Tyler y colaboradores (2000), sugieren que los agonistas de los receptores cannabinoide puedan producir sus efectos antisecretorios a través de un mecanismo neuronal, que con toda probabilidad, implican la inhibición de la secreción del acetilcolina de las neuronas del plexo submucosal.

Recientemente se ha demostrado que anandamida, a través de la activación de los receptores CB₁, inhibe la secreción intestinal en ratones tratados con la toxina de cólera (Izzo y col., 2003). La administración por vía oral de la toxina de cólera aumenta la acumulación del fluido intestinal en ratones y este aumento se asocia con el aumento de los niveles de anandamida y la expresión de la mRNA de los receptores CB₁.

El WIN 55,212-2 redujo tanto la secreción intestinal producida por el estímulo del campo eléctrico, mediada principalmente por la liberación de la acetilcolina de las neuronas secromotoras submucosales, como la secreción inducida por la capsaicina, causada por la liberación evocada del neurotransmisor de los aferentes primarios extrínsecos en el íleo de la cobaya que actúan directamente en el epitelio para mejorar la secreción (MacNaughton y col., 2004).

II.2.3.6.3- Efecto sobre la motilidad gastrointestinal

Diversos estudios de experimentación animal sugieren que el sistema cannabinoide tendría un papel en la inhibición del vaciado gástrico y el peristaltismo intestinal (Vigna, 2003). Los efectos sobre la motilidad gastrointestinal y la modulación de la motilidad intestinal estarían mediados también por los receptores CB₁ (Izzo y col., 2001; Pertwee,

2001). Los receptores CB₁ se han localizado en el sistema nervioso entérico (Griffin y col., 1997; Kulkarni-Narla y Brown, 2000) y su activación por los cannabinoides endógenos así como los agonistas sintéticos disminuyó el peristaltismo intestinal (Calignano y col., 1997; Colombo y col., 1998; Izzo y col., 1999b; 2000; Krowicki y col., 1999).

In vitro, los agonistas de los receptores CB₁ inhiben las contracciones de los músculos lisos longitudinales y circulares de tiras aisladas del tejido iléico de seres humanos (Crocì y col., 1998) y de roedores del laboratorio (Pertwee, 1992; 1996).

Los agonistas cannabinoides actúan sobre los receptores presinápticos CB₁ reduciendo la contractilidad y el peristaltismo del músculo liso en diferentes regiones del aparato gastrointestinal (Izzo y col., 2001) como el íleo y el colon humanos (Simoneau y col., 2001; Van Sickle y col., 2003). Se han propuesto mecanismos por los cuales la activación de los receptores CB₁ reduce la contractilidad, como la reducción de la liberación de acetilcolina de los nervios entéricos, aunque se han propuesto otros mecanismos, tales como la inhibición de la transmisión excitatoria no adrenérgica no colinérgica NANC, la modulación de la liberación de la adenosina y la activación de canales K⁺ sensibles a la apamina (Begg y col., 2002; Manara y col., 2002). Un informe reciente sugirió que la activación de los receptores CB₁ pudiera reducir la apamina componente de la transmisión inhibitoria NANC (Store y col., 2004).

Varios agonistas de los receptores CB₁, como la anandamida, cannabinoil, WIN 55.212-2, CP 55-940, pero no JWH-133 (agonista selectivo del receptor CB₂), inhiben la motilidad gástrica e intestinal en ratas y ratones, este efecto se inhibió por el antagonista SR141716A, que en sí mismo produce un aumento en la motilidad (Di Carlo y Izzo, 2003). En ratones, las pruebas inmunohistoquímicas y farmacológicas apoyan un papel de los endocannabinoides y de los receptores mientéricos CB₁ en la regulación de la motilidad intestinal *in vivo* (Pinto y col., 2002).

La adición del SR141716A a las preparaciones *in vitro* aumenta la liberación del acetilcolina eléctricamente evocada de los nervios mientéricos (Coutts y Pertwee, 1997), y evocó eléctricamente las contracciones del músculo longitudinal del plexo mientérico (Pertwee y col., 1996; Izzo y col., 1998; Coutts y col., 2000). Además, la administración aguda de SR141716A estimula el paso de una comida no absorbible en el intestino delgado (Calignano y col., 1997; Colombo y col., 1998; Izzo y col., 1999b; Carai y col., 2004), y la defecación (Izzo y col., 1999a) en ratones.

Algunos endocannabinoides como anandamida han mostrado efecto antidiarreico en modelos animales al inhibir la secreción de acetilcolina desde las neuronas mientéricas mediante la activación de los receptores CB₁ (Izzo y col., 2003). También se han implicado en procesos de inflamación intestinal (Izzo y col., 2001). En modelos animales de enfermedad

inflamatoria intestinal se ha visto que los endocannabinoides son más activos al inhibir la motilidad gastrointestinal que en las ratas control. Se ha sugerido que durante la inflamación se produciría un aumento de la expresión de los receptores CB₁ en el intestino (Izoo y col., 2001). Durante la inflamación, se aumenta la expresión de los receptores entéricos CB₁ y los niveles de los endocannabinoides intestinales lo que aumenta el efecto de los cannabinoides.

Massa y col (2004) demostraron que la ablación genética de los receptores CB₁ hizo los ratones más sensibles a la colitis inducida por el dinitrobenceno interacolónico o el dextrano sulfato, mientras que los ratones deficientes de FAAH, que se espera que tengan niveles más altos de anandamida (Weber y col., 2004), demostraron una protección significativa contra la inflamación intestinal. Croci y colaboradores (2003) demuestran que el antagonista SR141716A previno la inflamación intestinal inducida por la indometacina en ratas y ratones.

Mc Vey y colaboradores (2004) han demostrado que la anandamida y 2AG estimulan las neuronas sensoriales primarias intestinales vía los receptores vanilloides (VR1) para liberar la sustancia P, dando por resultado ileitis en ratas, y que los endocannabinoides pudieron mediar los efectos inflamatorios de la toxina. Así, los endocannabinoides pudieron tener un papel protector (vía la activación de los receptores CB₁) y perjudicial (vía la activación de los receptores VR1, probablemente en concentraciones más altas) en la mucosa intestinal.

Mathison y col (2004) proporcionan una evidencia farmacológica de que la reducción del tránsito gastrointestinal mediada por los receptores CB₁ estaba ausente en las ratas tratadas con un agente inflamatorio endotóxico, pero se reestablece por una inhibición del tránsito mediada por los receptores CB₂.

Se presume que los cannabinoides actúan sobre los receptores CB₂ expresados por las células inflamatorias, inmunitarias y/o las células epiteliales para inhibir la liberación de los mediadores inflamatorios, que estimulan el peristaltismo intestinal. Ihenetu y sus colegas (2003) han demostrado recientemente que la liberación de las interleucinas-8 inducida por TNF- α fue inhibida por los cannabinoides a través la activación de los receptores CB₂ en las células epiteliales intestinales humanas, que ejercen una influencia importante en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria intestinal.

El valor terapéutico potencial de tales resultados parece ser relevante. La activación de los receptores CB₂ representa un mecanismo nuevo para el re-establecimiento del tránsito gastrointestinal normal después de un estímulo inflamatorio y para reducir el aumento de la motilidad intestinal inducido por un endotóxico inflamatorio (Izzo, 2004).

La estrategia para utilizar los agonistas selectivos del receptor CB₂ para el tratamiento de la hipermotilidad durante las enfermedades inflamatorias del intestino es altamente

prometedora porque es probable evitar los efectos indeseables de los cannabinoides, bien conocidos, que son debidos a la activación de los receptores del cerebro CB₁.

II.2.4- Fenómenos de tolerancia y dependencia

La mayoría de estos efectos observados tras la administración de cannabinoides desarrollan un fenómeno de tolerancia cuando la administración se repite durante varios días, esto se ha visto tanto en humanos como en animales de experimentación, tal y como se ha demostrado en estudios realizados en diferentes especies animales: ratones, ratas, palomas, perros y monos (Abood y Martin, 1992). Estos estudios han demostrado la aparición de tolerancia a los efectos inducidos por los cannabinoides sobre las respuestas al dolor, actividad locomotora, control de la motricidad, temperatura corporal, respuestas cognitivas, motilidad gastrointestinal, evolución del peso corporal, función cardiovascular, actividad anticonvulsivante y respuestas endocrinas (Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002).

El desarrollo de la tolerancia es extremadamente rápido para la mayor parte de las respuestas y una importante disminución del efecto farmacológico ya fue observada tras la segunda administración de una dosis elevada de cannabinoide (Abood y Martin, 1992). El máximo grado de tolerancia cannabinoide se obtiene también con cierta rapidez durante la administración crónica de estos compuestos (Bass y Martin, 2000). Otros estudios han demostrado que puede existir tolerancia cruzada entre los diferentes agonistas cannabinoides exógenos sobre los efectos analgésicos, de hipolocomoción e hipotermia (Pertwee y col., 1993).

La tolerancia al efecto analgésico a los cannabinoides *in vivo* podría estar causada por la regulación baja y la endocitosis de los receptores cannabinoides inducidas por el agonista de estos receptores. Se ha demostrado que el receptor cannabinoide (CB₁) interactúa con la proteína 1 asociada a la proteína G (GASP1) (Heydorn y col., 2004; Simonin y col., 2004; Barlett y col., 2005). La interacción CB₁-GASP1 se ha observado, se requiere la regulación baja del receptor CB₁ inducida por el agonista en las neuronas espinales *ex vivo* bien como *in vivo*. Sorprendentemente, el desacoplamiento del receptor CB₁ de la proteína GASP1 en ratones *in vivo* mejoró la tolerancia hacia la analgesia inducida por los cannabinoides. Estos resultados sugieren que GASP1 sea un regulador principal del destino del receptor CB₁ tras la exposición del agonista en el sistema nervioso y determine críticamente la tolerancia al efecto analgésico de los cannabinoides (Tappe-Theodor y col., 2007).

Diversos mecanismos de tipo farmacocinético han sido sugerido que pudieran participar en el desarrollo de la tolerancia cannabinoide, tales como cambios en la absorción, distribución, biotransformación y excreción de estos compuestos. Sin embargo el papel desempeñado por el conjunto de estos mecanismos farmacocinéticos parece muy secundario o incluso inexistente (Martin y col., 1996). Diversas modificaciones farmacodinámicas que

afectan la expresión, características de fijación y actividad funcional de los receptores cannabinoides CB₁ desempeñan un papel importante en el desarrollo de la tolerancia cannabinoide. De hecho una disminución significativa del número total de los receptores CB₁ se ha observado en varias estructuras del cerebro, tal como el striatum, sistema límbico, corteza y el cerebelo durante la administración crónica de las agonistas cannabinoides (Rubino y col., 2000).

Diversos estudios han demostrado claramente que esta tolerancia está relacionada mayoritariamente con reducciones de la disponibilidad de los receptores para cannabinoides en el cerebro (Maldonado, 2001), aunque puedan existir algunos cambios a nivel del metabolismo de estos compuestos (Rodríguez de Fonseca y col., 1991; Costa y col., 1996) o una pérdida significativa, variable según regiones cerebrales, de los receptores a la que se unen tanto los cannabinoides vegetales, sintéticos o los endógenos.

Algunos estudios en animales sugieren que la administración crónica de agonistas cannabinoides induce una disminución del número total de los receptores cannabinoides CB₁ en diversas estructuras cerebrales, como el cuerpo estriado, sistema límbico, corteza y el cerebelo (Rodríguez de Fonseca y col., 1994; Fan y col., 1996; Rubino y col., 2000; Sim-Selley y Martin, 2002). También se ha visto que los niveles de mRNA que codifica el receptor cannabinoide CB₁ también resultaron disminuidos en diversas áreas del sistema nervioso central durante el tratamiento crónico con cannabinoides, sobre todo en la porción anterior del cerebro (Rubino y col., 1994; Romero y col., 1998). Esta disminución en la densidad y expresión de los receptores cannabinoides CB₁ parece jugar un importante papel en el desarrollo de la tolerancia.

Recientemente, se ha demostrado que la administración crónica del THC modula la activación del (ERK) (miembro de la subfamilia de las proteínas quinasa responsables de la regulación de la señal extracelular) en el cerebelo y el núcleo caudado sin afectar otras estructuras cerebrales (hipocampo, corteza prefrontal, etc...) (Rubino y col., 2004).

Se parece haber una relación entre el estado del receptor CB₁ y los niveles de los endocannabinoides. En las ratas tolerantes a THC, hay alteraciones en el contenido de los endocannabinoides en varias estructuras cerebrales. Específicamente, la concentración de anandamida se aumenta en el sistema límbico y disminuye en el cuerpo estriado, cerebro medio y diencefalo en ratas tolerantes a THC (González y col., 2004).

Diversos estudios clínicos también han demostrado el desarrollo de la tolerancia a diversas acciones farmacológicas del THC en humanos (Compton y col., 1990; Haney y col., 1997). En este sentido, se ha demostrado que el consumo repetido de THC da lugar a una disminución de sus efectos subjetivos, cardiovasculares y de sus acciones sobre la presión intraocular y la actividad electroencefalográfica (Gibbins y col., 1976; Jaffe, 1990).

En paralelo a estos estudios que explican cómo el fenómeno de tolerancia a cannabinoides tiene una base farmacodinámica, consecuencia de la disminución en la densidad, expresión génica y capacidad de activar mecanismos de transducción de señales de receptores CB₁ (Rodríguez de Fonseca y col., 1994), así como en la disponibilidad de los ligandos endógenos para estos receptores (Di Marzo y col., 2000), en diversas regiones cerebrales, otros autores han puesto de manifiesto, aunque de forma controvertida, que el consumo crónico de cannabinoides podría conllevar la aparición de elementos de dependencia física. Es decir, se podría desarrollar un fenómeno de abstinencia, con respuestas adaptativas, comportamentales y/o moleculares disparadas por la ausencia de la droga (Aceto y col., 1995), que serían parecidas a las que aparecen en la adicción a otras drogas de abuso como los opiáceos o la cocaína (Wise, 1996; Koob, 1996).

No se han observado signos somáticos de abstinencia espontánea tras la administración crónica de THC, incluso con la utilización de dosis muy elevadas en roedor, paloma, perro o mono (Diana y col., 1998; Aceto y col., 2001). Esta abstinencia se caracteriza en roedores por la presencia de varios signos somáticos y la ausencia de signos vegetativos.

Los signos característicos de la abstinencia en roedores son movimientos estereotípicos, temblores en patas, ataxia, temblores generales, postura anormal, masticación, ptosis, arañamiento, frotamiento vigoroso y lameteo (Tsou y col., 1995; Ledent y col., 1999; Tzavara y col., 2000; Aceto y col., 2001). En este síndrome de abstinencia hay que subrayar la incidencia importante de signos asociados a problemas de coordinación motriz, sin aparición de signos vegetativos (Tzavara y col., 2000).

En perros, se han descrito tanto signos somáticos como vegetativos durante el síndrome de abstinencia cannabinoide desencadenado por el SR 141716A. Así, la abstinencia cannabinoide en esta especie animal incluye signos tales como diarrea, vómitos, salivación, temblores e incremento del periodo de vigilia (Lichtman y col., 1998). La administración de SR 141716A es igualmente capaz de interrumpir un comportamiento operante en ratas dependientes del THC, lo que podría ser una manifestación de un estado de malestar y disforia en caso de abstinencia (Beardsley y Martin, 2000).

Los receptores cannabinoides CB₁ son responsables de las manifestaciones somáticas de la abstinencia cannabinoide. En este sentido, la administración de SR141716A en ratones *Knockout* deficientes en receptores cannabinoides CB₁ que recibieron un tratamiento crónico con THC no desencadenó ningún signo de abstinencia (Ledent y col., 1999). La posible capacidad del cannabinoide endógeno anandamida para inducir dependencia física no ha sido aún completamente clarificada y diversos resultados contradictorios han sido publicados sobre este tema (Costa y col., 2000; Aceto y col., 2001).

Diversos estudios clínicos indican que los grandes consumidores de cannabis no padecen un síndrome de abstinencia con sintomatología severa (Abood y Martin, 1992; Haney y col., 1999a, b). Esta observación clínica está en concordancia con los resultados obtenidos en el animal de experimentación, en el cual no se observan manifestaciones somáticas de abstinencia incluso tras la administración de dosis masivas de THC. Algunos autores han descrito la aparición de un síndrome de abstinencia moderado en consumidores habituales de preparaciones de cannabis con elevadas concentraciones de principios activos (Hollister, 1986; Kouri y col., 1999; 2000). El signo más prominente y frecuente en esta abstinencia fue la irritabilidad. Otros signos prominentes fueron anorexia, ansiedad y aumento de la vigilia. Sin embargo, el síndrome de abstinencia no fue lo suficientemente severo como para alterar significativamente la vida cotidiana del individuo (Kouri y col., 2000).

II.3- Utilización nutritiva de la proteína y de los minerales

II.3.1- Utilización nutritiva de la proteína

II.3.1.1- Aspectos generales

Las proteínas son moléculas muy abundantes en los organismos vivos, constituyendo, aproximadamente, el 50% del peso seco de las células. Son los principales elementos estructurales de las células y actúan como catalizadores bioquímicos y reguladores importantes de la expresión de los genes. Por tanto, cualquier exposición sobre la nutrición de las proteínas y los aminoácidos implica prácticamente a toda la bioquímica y fisiología de los mamíferos.

Los aminoácidos también son utilizados para obtener energía, de hecho las proteínas constituyen el segundo almacén más importante de energía del organismo después de la grasa del tejido adiposo. Los aminoácidos pueden convertirse en glucosa y aseguran la disponibilidad constante de ésta cuando los depósitos de glucógeno se han consumido por el ayuno. Sin embargo, los depósitos de proteínas deben conservarse por sus numerosas funciones vitales para el organismo (Sanz ML, 2006).

Existe una clasificación nutricional y metabólica de los aminoácidos. La distinción entre aminoácidos no esenciales (dispensables) y esenciales (indispensables), es estrictamente nutricional, ya que un aminoácido indispensable debe formar parte de la dieta, mientras que uno no esencial no debe necesariamente existir en los alimentos. Sin embargo, los términos nutricionales de esencial y no esencial, pierden nitidez cuando el interés se centra en el nivel metabólico (Womack y Rose 1947; Steele y Harper, 1991; Reeds, 2000). Por definición, el organismo en cuestión no puede sintetizar un aminoácido que sea esencial para él.

Existen además, un tercer grupo de aminoácidos para los que se ha acuñado el término condicionalmente esenciales (Laidlaw y Kopple, 1987), como la glutamina, la arginina, glicina y la prolina porque no parecerían ser sintetizados en la proporción requerida Para satisfacer las necesidades celulares bajo determinadas condiciones fisiológicas o patológicas (Jaksic y col., 1991; Reeds y col., 2000).

Según estudios sobre el recambio proteico de todo el organismo, la alimentación y el aumento de la ingesta de proteínas inhiben la degradación proteica (Waterlow, 1995), aunque no esté claro que órgano y tejidos favorecen más esta declinación, y tampoco este dilucidado el efecto relativo de los aminoácidos respecto de los carbohidratos y otras fuentes energéticas. Por ejemplo, los aminoácidos ingeridos no parecen alterar por sí la tasa de destrucción proteica en el vasto externo (Volpi y col., 1999), mientras que una comida mixta demostró inhibir la degradación proteica muscular en el antebrazo (Tessari y col., 1996). Por

consiguiente, es posible, al menos en el músculo, que los aminoácidos refuercen la inhibición de la proteólisis debido a la mayor disponibilidad de insulina inducida por los carbohidratos. A su vez, la insulina disminuye la proteólisis, posiblemente al limitar la actividad proteosómica mediada por la ubiquitina (Bennet y col., 2000). El intestino podría ser un sitio importante de la disminución de la destrucción proteica en todo el organismo (Tessari, 2000) inducida por la comida.

II.3.1.2- Digestión y absorción

La digestión de las proteínas comienza en el estómago con la acción de pepsina, ya que en la saliva no existen enzimas proteolíticas, y continúa en el intestino delgado con enzimas pancreáticas como tripsina, quimiotripsina, aminopeptidasas y carboxipeptidasas (Gitler, 1964). En su mayoría estas enzimas se encuentran en forma de precursores (zimógeno o proenzima), pasando a la forma activa al perder una pequeña parte de sus cadenas peptídicas gracias a una proteólisis limitada. Las proenzimas pancreáticas se activan al entrar en contacto con el jugo gástrico, que contiene la enterocinasa, una enzima del borde en cepillo, encargada de activar el tripsinógeno (Kwong y col., 1982), liberada de la membrana por la acción de los ácidos biliares.

El tripsinógeno se divide para formar tripsina y ésta se une a las proteínas de la dieta para comenzar la hidrólisis. Cuando ésta termina, aumenta el contenido de tripsina libre en el intestino, lo que constituye una señal para cesar la secreción de tripsinógeno. Posteriormente, las oligopeptidasas y aminopeptidasas del borde epitelial del enterocito completan la digestión, cada una de estas enzimas tiene una acción específica.

La mayoría de los péptidos de más de tres aminoácidos son hidrolizados extracelularmente por las enzimas del borde en cepillo de los enterocitos, mientras que los dipéptidos y los tripéptidos pueden ser absorbidos intactos. La absorción de péptidos y aminoácidos ocurre, principalmente, en el intestino delgado proximal, generalmente por transporte activo, proceso que acumula sustrato contra gradiente de concentración y que por lo tanto, requiere un aporte energético para que pueda llevarse. El proceso requiere una sustancia transportadora específica para los diferentes tipos de aminoácidos que estaría ubicada en la membrana del eritrocito.

Este transporte tiene dos lugares receptores, uno para el aminoácido y otro para el ion Na. En el proceso de absorción se formaría, pues, en la cara externa de la membrana un complejo trímero transportador-Na-aminoácidos, el cual difundirá por la membrana al interior del enterocito. Una vez en la cara interna, el trímero se disocia en sus tres componentes, y posibilita la entrada del aminoácido al interior de la célula intestinal el aminoácido se acumula en el interior de la célula intestinal y a los capilares intestinales, estos confluyen en la vena porta por lo que los aminoácidos van al hígado.

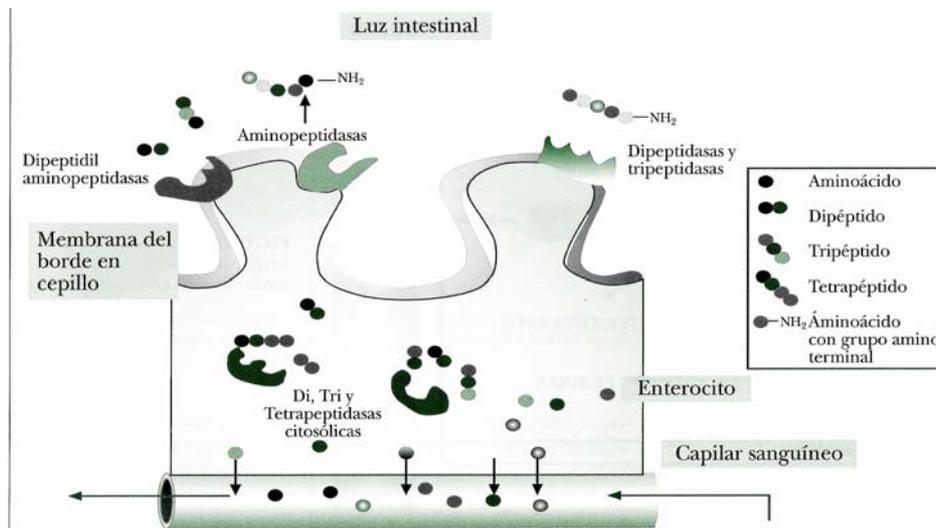


Figura III₁: Mecanismo de hidrólisis de distintos oligopéptidos por enzimas del borde en cepillo (Tomado de Mataix y Sánchez de Medina, 2002).

Tras la digestión de proteínas, los aminoácidos son transportados al hígado, donde se regula el flujo de aminoácidos de la dieta que entra en la circulación sistémica. El hígado transamina y oxida los aminoácidos sobrantes. El exceso de proteínas en la dieta de un sujeto sano da lugar a un aumento de la eliminación urinaria de nitrógeno. El hígado es el lugar principal de metabolización de aminoácidos esenciales, con excepción de los aminoácidos ramificados, que apenas se degradan en el eje enterohepático y son más bien metabolizados por otros tejidos periféricos, por ejemplo solo 2% de la leucina de la dieta es oxidada en el hígado.

II.3.1.3- Factores que afectan la absorción de la proteína

Los factores que afectan la utilización nutritiva de la proteína se pueden clasificar en: dietarios y no dietarios. Entre los factores dependientes de la dieta podemos destacar, su composición en aminoácidos de la proteína dietaria. En este sentido, Harper y Kumpta. 1964 demuestran que para que un animal use una proteína con una eficacia máxima, es necesaria una adecuada proporción de aminoácidos esenciales, una digestión correcta, junto con una relación idónea entre aminoácidos esenciales y no esenciales.

Según Erbersdobler. 1972 la digestibilidad de una proteína depende, en parte, del tipo y secuencia de aminoácidos en la cadena peptídica, de su configuración espacial y de la presencia de enlaces cruzados entre grupos funcionales.

Estudios llevados a cabo por Eggum. 1973 con dietas de distintos contenido proteico, ponen de manifiesto que la concentración de proteína no afecta la excreción de nitrógeno, por la que digestibilidad verdadera de la proteína no depende del contenido de ésta en la dieta, aunque si se afecta la digestibilidad aparente de la misma. Por otra parte, Hove y col. 1974 no encuentran diferencias en la digestibilidad aparente de la proteína utilizando dietas con distintos niveles proteicos.

Numerosos autores han demostrado que el incremento en la ingesta de fibra dietaria está asociado con una elevación en los niveles de nitrógeno fecal (McCance y walsham, 1984). Este efecto tiene más posibilidad de ser reflejo de los procesos que tienen lugar en el colon, que de los del intestino delgado (Stephen y Cummings, 1979).

Ciertas fibras dietarias pueden contener inhibidores de las enzimas proteolíticas, que pueden alterar la utilización de la proteína. El análisis de los efectos de varios derivados de fibras en la actividad de las enzimas proteolíticas *in vitro* (Schneeman, 1982; Gagne y Acton, 1983) sugiere la posibilidad de que la fibra dietaria también puede ejercer efectos en la biodisponibilidad de la proteína *in vitro*.

Es importante tener en cuenta el papel que ejerce la proteína en la utilización mineral. En un principio conviene recordar que la absorción de la mayor parte de los minerales tiene lugar a nivel duodeno, donde todavía el pH ácido favorece su solubilidad, ya que a medida que descienden hacia el yeyuno e íleon el incremento de pH los puede hacer precipitar, evitando su absorción. El papel de la proteína reside en que algunos productos resultantes de la digestión proteica, pequeños péptidos y aminoácidos, se unen y estabilizan los iones metálicos, evitando la ulterior precipitación al aumentar el pH, así como la posibilidad de que reaccione con otros compuestos que pueden impedir su absorción. La quelación tiene lugar cuando el catión se une por enlace iónico y covalente a la misma molécula (ligando). Dos aminoácidos pueden quelar a un catión polivalente dando lugar a una estructura bicíclica, similar a un dipéptido que resiste la hidrólisis ácida y la acción de los enzimas intestinales. El metal así quelado es absorbido por transporte activo en el yeyuno, donde radican los lugares de absorción de dipéptidos y mejorar, de esta forma, la absorción de los minerales ingeridos como sales inorgánicas (Ashmead y col., 1985). Ensayos isotópicos *in vivo* comprueban que el quelato pasa intacto al torrente circulatorio produciéndose una mayor retención del elemento que el correspondiente a su sal inorgánica, como se aprecia por los contenidos de diversos metales en distintos órganos (Ashmead, 1989).

II.3.1.4- Metabolismo

La regulación de la homeostasis de la proteína durante la alimentación resulta de una interacción compleja entre factores numerosos, incluyendo las fuentes de energía no proteicas

(Pellet y Young, 1992) y el estado fisiológico o patológico de los individuos (Mansoor y col., 1996; Boirie y col., 1997).

Una vez las proteínas están hidrolizadas los aminoácidos resultantes vía torrente circulatorio, llegan hasta todas las células y una vez dentro de ellas los aminoácidos se utilizan para la síntesis de nuevas moléculas proteicas necesarias para el normal funcionamiento de dichas células. Todos aquellos aminoácidos esenciales o no esenciales no necesarios para la construcción de nuevas proteínas por ninguna célula de la economía son transportados hasta el hígado, en cuyas células experimentan la reacción de:

- **Transaminación:** El grupo amino se cede a un cetoácido que se convierte respectivamente en alanina, aspartato y glutamato. En este momento la mayoría de los grupos NH₂ de los aminoácidos, están en la molécula de glutamatos, y los aminoácidos están como cetoácidos, que seguirán diversas vías glucogénicas, cetogénicas, etc.
- **Desaminación oxidativa:** el glutamato por acción de la enzima glutamato deshidrogenasa, y utilizando como coenzima al NAD, se convierte en alfa-cetoglutarato y se produce amoniaco libre que es altamente tóxico y se elimina de las células (Krebs, 1964; Kaplan y Pitot, 1970).

Una característica muy especial del metabolismo proteico es la existencia conjunta de procesos de síntesis y degradación de proteínas. Se produce así un recambio o turnover. Este recambio es más rápido para las proteínas de la mucosa intestinal, hígado, páncreas y eritrocitos, y mucho menos para las proteínas del tejido conjuntivo o del encéfalo, por ejemplo. En cualquier caso, se puede considerar que el recambio proteico alcanza diariamente hasta un dos por ciento del total de las proteínas del organismo, lo que se llama proteína corporal lábil (Mataix y Sánchez de Medina F, 2002).

Los lugares principales del catabolismo de los aminoácidos son: intestino delgado, hígado, músculo y riñón. Se cree que la mayor parte de los aminoácidos que el hígado extrae de la sangre portal son catabolizados, y que sólo una pequeña proporción se destina a la síntesis proteica hepática. Sin embargo, los estudios isotópicos realizados en el hombre y en el cerdo indican que los aminoácidos extracelulares aportan alrededor del 70% de los precursores de la síntesis proteica hepática, y que 50% de ellos proceden de los aminoácidos de la sangre portal (Reeds y col., 1992; Berthold y col., 1995).

El hígado desempeña un papel primordial en el metabolismo, modificando las cantidades y proporciones de aminoácidos de la sangre portal que son distribuidos al resto del organismo. Es el único órgano capaz de catabolizar todos los aminoácidos, aunque el metabolismo hepático de los que tienen cadenas ramificadas es más lento que el de otros

aminoácidos no esenciales (Harper y col., 1984). Parece que solo 25% de los aminoácidos que penetran en el hígado con la sangre portal salen nuevamente de él, y que una porción nutricionalmente significativa de los aminoácidos portales son extraídos por el hígado y dirigidos directamente hacia el catabolismo (Elwynn, 1970).

El músculo esquelético metaboliza gran parte de los aminoácidos ramificados, cuyo nitrógeno es exportado en forma de glutamina y alanina. Junto al hígado, el riñón es el encargado de mantener el equilibrio ácido-base mediante la conversión de glutamina en glutamato o mediante la conversión de glicina en serina (Curthoys y Watford, 1995).

La mayor parte del nitrógeno se excreta bien por la orina o por heces. El nitrógeno urinario puede dividirse en endógeno, reflejado por la excreción de creatinina y exógeno, reflejado por la excreción de urea. También una pequeña parte del nitrógeno corporal se pierde en la respiración, descamación de células epiteliales, cabello, uñas etc, pero estas cantidades son tan pequeñas en comparación con el nitrógeno urinario que se puede afirmar que, en situaciones normales no afectan a la validez de los resultados obtenidos en los estudios de balance de nitrógeno.

El hígado dispone de dos mecanismos para deshacerse del nitrógeno (iones amonio): formar urea o glutamina y glutamato. En este órgano, los dos sistemas están separados:

- Génesis de urea: se da en los hepatocitos periportales.
- Génesis de glutamina: en compartimento perivenoso (Haussinger y col., 1992).

Esta separación permite al hígado transformar la mayoría de amonio en urea, pero conservando la posibilidad de sintetizar glutamina si la velocidad de síntesis de una urea resulta insuficiente para eliminar el amonio hepático. Kato y Saito. 1980 al trabajar con ratas a las que se les restringe la comida encuentran que los mayores niveles de urea en sangre se producen después de ingerir el alimento y que en periodos de ayuno la uremia permanece baja.

II.3.2- Utilización nutritiva de calcio

II.3.2.1- Aspectos generales

El calcio es el quinto elemento más abundante en la tierra después del hierro, aluminio, silice y oxígeno (Weaver y Heaney, 1999), es un mineral necesario para el ser humano, especialmente en etapas de crecimiento para su depósito a nivel óseo, siendo a nivel bioquímico necesario para la regulación de diversas respuestas celulares donde actúa principalmente como un segundo mensajero. Es importante suplir las necesidades fisiológicas

del mineral sobre todo en la gestación y la adolescencia donde sus requerimientos están aumentados y en los ancianos con estados carenciales y riesgo de osteoporosis.

Alrededor del 99% del calcio corporal se encuentra en el esqueleto, el 1% restante está en la sangre y en el tejido graso (adiposo) (Weaver, 2001). El calcio en sangre y líquidos corporales puede encontrarse de 3 formas: calcio unido a proteínas, calcio ionizado y calcio difusible formando complejos con ácidos orgánicos como citratos, o con inorgánicos como sulfato o fosfato.

El calcio participa en numerosos procesos biológicos de tal importancia que se ha desarrollado un complejo sistema de regulación homeostática para mantener sus concentraciones séricas en unos límites muy estrechos. Interviene en la conducción nerviosa, la contractilidad muscular, el mecanismo de secreción y acción de diversas hormonas y enzimas citosólicas, la permeabilidad de membranas, el proceso de coagulación de la sangre y la mineralización de hueso (Wasserman., 1988).

El calcio es uno de los minerales investigados, numerosos estudios han demostrado la importancia del calcio en el desarrollo y el mantenimiento de la integridad del hueso (Ali y Siktberg, 2001; Weaver, 2001), así como en casi el resto de los procesos del organismo.

Según Rassmussen (1986), el calcio tiene cuatro propiedades principales de segundo mensajero:

- 1- Es un mensajero universal en las células animales
- 2- Es tóxico en alta concentración en el citoplasma y provoca la muerte celular
- 3- Transmite un mensaje breve. El aumento de calcio en el citoplasma después de una estimulación no perdura.
- 4- Actúa en forma armónica con otro segundo mensajero: AMP cíclico.

Los datos epidemiológicos y experimentales limitados apoyan la posibilidad de que la ingesta dietética del calcio desempeña un papel en la regulación del peso del cuerpo humano (Parikh y Yanovski, 2003). Zemel y col. (2001,2002), describieron la evidencia de un efecto de la ingesta del calcio sobre el peso corporal de los animales obesos, resaltan los efectos de la suplementación del calcio en la absorción de la grasa dietética (Shahkhalili y col., 2001), y presentan evidencia de un papel del calcio intracelular en la regulación de la lipogénesis y lipólisis (Zemel, 1998; Xue y col., 2001).

El calcio desempeña un papel importante en la regulación del metabolismo energético porque las dietas altas en calcio atenúan la ganancia de peso y la captación de lípidos por los adipocitos durante el consumo excesivo de una dieta alta en energía, mientras aumentan la lipólisis y preservan la termogénesis durante la restricción calórica, lo que acelera de modo marcado la pérdida del peso (Causey y Zemel 2003; Zemel, 2004).

II.3.2.2- Absorción y transporte

Las células epiteliales del intestino tienen numerosas estructuras especializadas en la absorción de Ca y otros nutrientes. La superficie luminal externa está cubierta de microvellosidades y las células epiteliales adyacentes tienen uniones compactas que obstaculizan el movimiento de Ca entre células.

El calcio se absorbe por el epitelio intestinal bien a través de la célula (vía transcelular) o bien entre las células (vía paracelular) (Bronner y col., 1986).

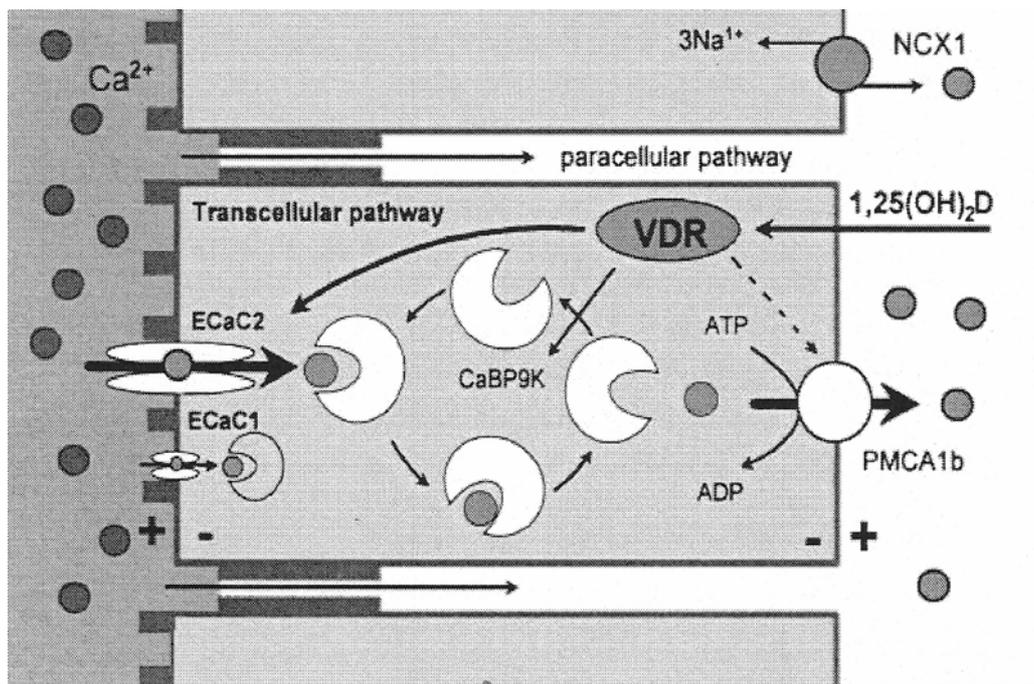


Figura III₂: Modelo molecular de la absorción intestinal del calcio
(Tomado de Bouillon y col., 2003)

II.3.2.2.1- Transporte transcelular

El transporte transcelular es un proceso activo saturable, tiene lugar en su mayor parte, en el intestino proximal, duodeno y parte superior de yeyuno y requiere energía y una proteína obligatoria llamada calbindina (Groff y Gropper, 2000). Este proceso está regulado por calcitriol y vitamina D (Weaver y Heaney, 1999).

En presencia de vitamina D, el calcio se transporta desde la mucosa a la serosa contra un gradiente de concentración. Como todo transporte activo requiere proteínas transportadoras y energía metabólica, en relación a las proteínas transportadoras en el borde

en cepillo intestinal se han descubierto 3 proteínas relacionadas con la absorción (Aranda y Llopis., 1993).

El movimiento transcelular de calcio implica tres pasos importantes: la entrada a través el borde en cepillo, mediada por una estructura molecular CaT1, la difusión intracelular, mediado por la calbindina D_{9k} (CaBP), y la salida de la célula (Bronner, 2003a, b), por medio de transporte activo contra el gradiente electroquímico procesado principalmente por una bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP e del intercambio de Na^+/Ca^{2+} (Hoendrerop y col., 2005).

La entrada del calcio a la interior del enterocito implica dos procesos: un transporte facilitado que se satura en la concentración luminal del calcio interior a 5mM, y un movimiento tipo canal que presenta la mayoría de calcio que entra y atraviesa la célula en mayores concentraciones lumbales (Slepchenko y Bronner, 2001). Se ha descrito que el 90% de la entrada de calcio depende de la vitamina D (Van Cromphaut y col., 2001; Word y col., 2001).

Existen dos canales ECaC1 (TRPV5) y ECaC2 (TRPV6) en el duodeno que facilitan la entrada de calcio al interior del enterocito a través el borde del cepillo (Bouillon y col. 2003; Parekh y Putney, 2005). Los experimentos han demostrado que TRPV6 se expresa en la línea de la célula Caco-2 así como en el aparato gastrointestinal humano, incluyendo el yeyuno, exhibiendo una expresión inducida por la vitamina D (Song y col., 2003; Peng y col., 2003).

Este transporte está en proporción directa a la cantidad de la CaBP, y es particularmente importante en bajas ingestas de calcio y durante periodos de altas necesidades de calcio como son el crecimiento, embarazo y lactación. Sin embargo, la absorción de calcio es una función exponencial de la ingesta, cuando disminuye la ingesta de calcio de la dieta la absorción activa es alta, y cuando la ingesta es alta, la absorción activa es baja (Kaup y col, 1990).

Cuando los niveles de calcio en el suero disminuyen, aumentan la PTH, causando la liberación del calcitriol. La absorción del calcio inducida por el calcitriol implica unos cambios en los lípidos de la membrana del enterocito e inicia la síntesis de la calbindina, una proteína que transporta el calcio a través del citoplasma del enterocito hasta la membrana basolateral. Al llegar a esa membrana, el calcio debe pasar del entericito hacia el líquido extracelular. Este proceso requiere energía en la forma de ATP y enzima regulada por la vitamina D ($Ca^{2+}Mg^{2+}$ ATPasa) (Kass-Wolff, 2004).

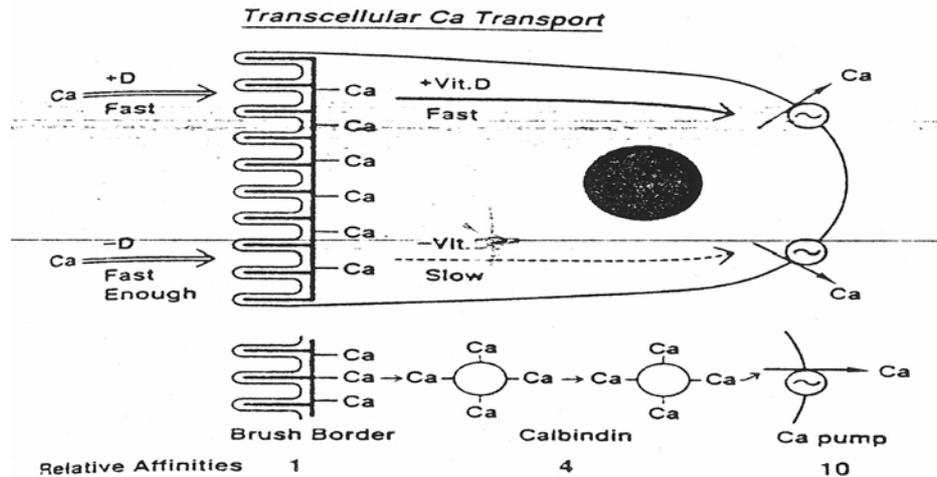


Figura III₃: Transporte transcelular
(Tomado de Wasserman y col., 1992)

II.3.2.2.2- Transporte paracelular

El transporte pasivo no es saturable (Wasserman y Taylor; 1969), está basado en la difusión del mineral y se relaciona con la concentración de éste en el lumen intestinal. Este proceso parece ser independiente de la vitamina D y no está relacionado con el contenido intestinal de Ca BP. El transporte paracelular tiene lugar a lo largo del intestino (Bhear y Kerstein, 1976), dominando este tipo de transporte en altas ingestas de calcio.

La absorción del calcio que se efectúa a través de este proceso, tiene lugar por un sistema de intercambio entre el calcio y el sodio de tal manera que tres moléculas de Na^+ se intercambien para una de Ca^{2+} . A bajas ingestas de calcio, el transporte activo es el que actúa promoviendo la absorción del catión, pero cuando la ingesta aumenta y el citado mecanismo está saturado, el sistema utilizado es el paracelular. Algunas sustancias que incrementan la absorción de calcio como lactosa y aminoácidos, actúan a través de esta vía paracelular.

II.3.2.3- Factores que afectan la absorción de calcio

La biodisponibilidad de calcio depende de muchos factores, incluyendo factores fisiológicos, medicaciones, etapa de vida del individuo (Need y col., 2002), género (Anderson y col., 2001), y condiciones patológicas coexistente (Krebs, 2001).

El efecto de los componentes del alimento sobre la biodisponibilidad mineral puede producirse en el lugar de absorción, a nivel de la célula intestinal o membrana celular, así como también en algún lugar postabsortivo como el riñón. En el intestino delgado la ingesta mineral total es el elemento contribuidor más importante a la biodisponibilidad mineral, pero algunos componentes (macromoléculas, aniones, otros minerales) de la dieta pueden formar complejos solubles o insolubles con los minerales, aumentando o disminuyendo su

disponibilidad para la absorción. La solubilidad de los suplementos minerales, el pH del lumen intestinal determinado por secreciones gástricas, pancreáticas e intestinales, así como el tiempo de presencia en el lugar de absorción, puede también puede producir un potente efecto sobre la eficacia de la absorción.

El principal regulador de la absorción de calcio es la vitamina D. Está claramente demostrado que el metabolito activo de la vitamina D (1,25-(OH)₂-D₃) regula el transporte activo de calcio en el intestino delgado del lumen hacia el enterocito (Zerwekh y col; Bikle y col., 1979). La unión entre la proteína CaBP y 1,25-(OH)₂-D₃ se deriva de su participación en la regulación del transporte activo de calcio. Sin embargo, en condiciones en las que la síntesis de 1,25-(OH)₂-D₃ disminuye mucho, no hay evidencia de que la transferencia de calcio esté suprimida por completo (Martin y col., 1969; Bronner, 1986). 1,25(OH)₂D₃ esta influido por los almacenes intercelulares de calcio (Forsell y col., 2006).

Asimismo algunos componentes dietéticos (fitatos, oxalatos, fracciones dietéticas de la fibra, ácidos grasos saturados con cadena larga) pueden formar complejos insolubles en el lumen intestinal que hacen el calcio indisponible para la absorción. Muchos autores afirman que la fibra dietética interviene de forma negativa en los procesos de absorción y digestión de minerales debido a la propiedad de actuar como resina de intercambio iónico, reduciendo la biodisponibilidad de los minerales (Weaver y Heaney, 1999). Otras han descrito que la ingesta de diferentes fructanos aumenta la absorción intestinal del calcio en humanos y animales (Ohta y col., 1995; Younes y col., 2001).

Por otra parte, otros componentes dietéticos pueden estimular la absorción intestinal pasiva de calcio aumentando la solubilidad en el íleo; la lactosa incrementa la absorción y retención de calcio (Koo y Tsang., 1993), inulina (oligosacarido no digestible) y fructooligosacarido aumentan también la absorción de calcio (van den Heuvel y col., 1999; Mann, 2001; Kevin y Cashman, 2006).

II.3.2.4- Metabolismo

El adulto tiene de 1000-1500 gramos de calcio, del cual un 99% se encuentra en el esqueleto. Una parte del calcio plasmático (40%), se encuentra unido a proteínas (fundamentalmente albúmina), un 10% a bicarbonato, citrato ó fosfatos y el 50% restante como calcio libre iónico, que es el único fisiológicamente activo y puede sufrir variaciones importantes con cambios en el pH: en situaciones de acidosis disminuye su unión a proteínas y en alcalosis aumenta. Los cambios en la concentración de proteínas pueden inducir a errores en la valoración del calcio plasmático, siendo necesario corregir su concentración en función de los valores de proteínas o albúmina (restar 0.8 mg/dl por cada gramo de albúmina que exceda de 4 g/dl y sumar la misma cantidad por cada gramo de albúmina por debajo de dicho nivel) (Gomez y col., 2004).

La concentración de calcio plasmático se mantiene dentro de unos límites estrechos (aproximada de 2.5 mM (9-10 mg/dl)) por la compleja e integrada regulación hormonal de la absorción intestinal de calcio, excreción urinaria de calcio y turnover del hueso (formación y resorción). Esta homeostasis está controlada principalmente por la parathormona (PTH), vitamina D y calcitonina (Guyton y Hall, 2000), aunque también contribuyen a estas funciones la insulina, la hormona del crecimiento, la tiroxina, los estrógenos, los corticoides suprarrenales y el fosfato inorgánico (Avioli, 1980).

El cortisol afecta la homeostasis de calcio reduciendo su absorción, aumentando la resorción y la desmineralización del hueso y también inhibiendo la formación de colágeno. Los estrógenos circulantes aumentan los niveles de transcalfiferina (proteína transportadora de la vitamina D) con una subida paralela del nivel total de calcitriol pero sin un cambio en la fracción libre biológicamente activa (Hartwell y col., 1990; van Hoof y col., 2001).

El calcio sérico regula la secreción de PTH a través de un mecanismo de retroalimentación: la hipocalcemia estimula la liberación de PTH mientras que la hipercalcemia la suprime. La vitamina D se absorbe a través de los alimentos y se sintetiza en la piel tras la exposición solar; su metabolito activo es el Calcitriol que aumenta el calcio sérico y además aumenta la absorción de fosfato por el intestino (García y col., 2004).

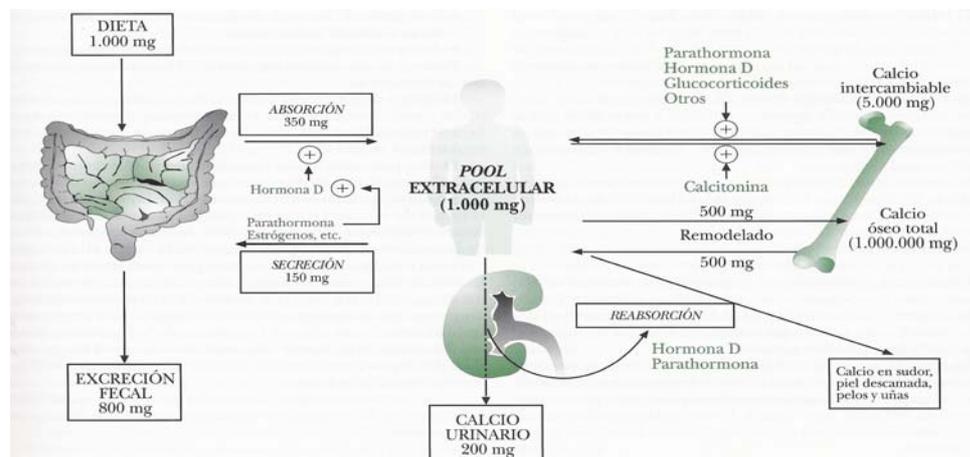


Figura III₄: Balance diario corporal del calcio
(Tomado de Mataix y col., 2002)

Dado que la mayor parte de calcio esquelético se encuentra en una forma no rápidamente difusible, para evitar la hipocalcemia y mantener la homeostasis, es necesario que el calcio sea movilizado por procesos de resorción activa. La respuesta osteocítica y osteoclastica a la PTH es el mejor mecanismo de control que facilita la resorción ósea. La acción reguladora de la hormona se efectúa a través de su continua secreción inversamente

proporcional a la concentración de ión calcio en el líquido extracelular (Aranda y Llopis., 1993). Los osteoclastos son responsables de la resorción del hueso y juegan un papel importante en el desarrollo esquelético, en la mantención de su integridad durante la vida y también en el metabolismo de calcio (Li y col., 2006).

La PTH y el calcitriol previenen de la hipocalcemia. La PTH moviliza rápidamente el calcio del hueso, mientras que el calcitriol tiende para aumentar su absorción. En caso de la ingesta baja de calcio, el calcitriol lo moviliza del hueso y así aumenta la desmineralización iniciada por el PTH (Kurbel y col., 2003).

La calcitonina produce una inhibición de la actividad del osteoclasto maduro y del reclutamiento de sus precursores, lo que lleva a una disminución de la resorción ósea. La calcitonina causa también una rápida pérdida del borde en cepillo del osteoclasto, reduciendo también el número de células. A muy pequeñas concentraciones paraliza la movilidad citoplásmica y produce una retracción gradual del aparato citoesquelético de la célula, disminuyendo su área de contacto con la superficie ósea y, consecuentemente, la resorción ósea. Aunque tradicionalmente se ha considerado que los osteoblastos carecen de receptores para la CT, en algunos experimentos se ha comprobado cierta acción de la misma sobre estas células, consiste en un efecto anabólico, con estimulación de la formación ósea y de la producción de factores de crecimiento (Zaidi et al., 2002).

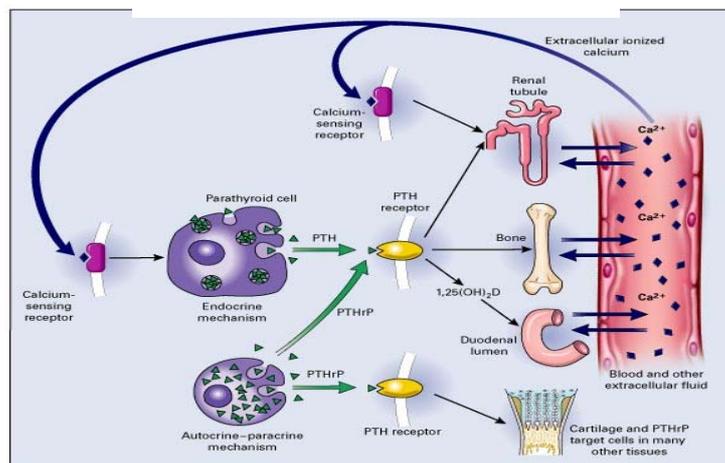


Figura III₅: Homeostasis cálcica
(Tomado de Marx, 2000)

II.3.3- Utilización nutritiva de fósforo

II.3.3.1- Aspectos generales

Después del calcio, el fósforo es el segundo mineral que abunda en nuestro cuerpo y en la mayoría de los alimentos. Es esencial para la formación del hueso y el metabolismo energético celular. En todo momento, existe en el organismo humano adulto un máximo de alrededor de 850g de fósforo elemental, un 85% se encuentra en el esqueleto, 14% en los tejidos blandos, y solo un 1% está en el líquido extracelular, las estructuras intracelulares y las membranas celulares. De la lactancia a la edad adulta, el porcentaje del contenido de fósforo corporal total aumenta desde 0.5% hasta 0.65-1.1%. Se encuentra dentro del organismo en forma de fosfato en una cantidad de 700-800 gr. Su concentración sérica se expresa como masa de fósforo, las cifras normales son entre 3 a 4,5 mg/ml, apreciándose cifras mayores en niños y posmenopáusicas.

En el cuerpo humano, el fósforo sólo se encuentra en forma de sales de fosfato, tanto en forma inorgánica como combinada con otros minerales o compuestos orgánicos. Los fosfatos son muy importantes para el metabolismo humano. Aproximadamente, el 80-90 % de fósforo se combina para formar fosfato cálcico utilizado para el desarrollo de los huesos y los dientes.

Al igual que con el calcio, los huesos son la mayor reserva de sales de fosfato del organismo. Otras sales de fosfato, como el fosfato sódico, intervienen en el equilibrio ácido-base. Los fosfatos restantes del organismo se encuentran en diversas formas orgánicas, entre ellas los fosfolípidos, que intervienen en la formación de las membranas celulares y el ADN. Otros fosfatos orgánicos son de primordial importancia para los individuos activos, por ejemplo, los fosfatos orgánicos son esenciales para el funcionamiento normal de la mayor parte de las vitaminas B del cuerpo implicadas en los procesos energéticos en el interior de la célula. También forman parte de las células musculares necesarias para la contracción muscular. La glucosa también necesita ser fosforilada para entrar en el proceso de la glucólisis.

Su principal papel junto con el calcio es en el mantenimiento de los huesos y dientes. Además de su alta distribución en el tejido óseo, participa en casi todas las reacciones metabólicas y está relacionado con los aspectos del metabolismo y utilización de carbohidratos, lípidos y proteínas. Asimismo, el fósforo es un mineral que tiene un rol importante en el aumento de la masa muscular, síntesis de los componentes de la leche, formación de huevos y crecimiento de la lana (Arnaud and Sanchez, 1990).

Además de ser unos de los componentes fundamentales del hueso, los fosfatos son una parte esencial de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y son un constituyente de numerosos compuestos intracelulares activos, ayuda a mantener el pH de la sangre ligeramente alcalino,

forma parte de todas las membranas celulares sobre todo en los tejidos cerebrales. Es substrato necesario para la formación de enlaces de alto nivel energético, del ATP y fosfocreatina, que mantiene la integridad celular, posibilitando la contracción muscular, las funciones neurológicas, la secreción hormonal y la división celular.

II.3.3.2- Absorción y transporte

Los iones de fósforo inorgánico (Pi), provenientes de formas inorgánicas de los alimentos o de la liberación digestiva de moléculas orgánicas, son absorbidos por las células epiteliales del intestino delgado, sobre todo mediante la difusión facilitada más que por un proceso activo (Breslau, 1996). La absorción es sumamente eficaz, del orden de 60 a 70% en los adultos y para una amplia variedad de ingestas (Anderson, 1991). La relación lineal entre la absorción y la ingesta se mantiene en toda la amplia gama de ingestas y, dentro de la hora que sigue a la ingestión, aumentan las concentraciones sanguíneas de fosfato inorgánico, como se ha observado en un modelo animal con el fosfato radiactivo (Breslau, 1996).

El fosfato es absorbido a lo largo del tracto intestinal siendo el yeyuno el lugar más activo. Se ha sugerido la existencia de dos mecanismos para la absorción intestinal de fosfatos. Estudios realizados *in vitro* han puesto de manifiesto la existencia de un transporte activo de fósforo dependiente de sodio, así como la regulación de este mecanismo por la vitamina D y sus metabolitos (Rizzoli y col., 1977; Peterlik y Wasserman, 1978). Este mecanismo se da principalmente en el intestino proximal.

La capacidad del intestino para absorber iones de fosfato inorgánico mediante un proceso de transporte activo solo se pone en marcha cuando la ingesta de fósforo es baja o la demanda se halla enormemente aumentada (Peterlik y Wasserman., 1978). El segundo mecanismo pasivo opera principalmente en el yeyuno e íleon y se encuentra directamente relacionado con la concentración de fosfato en el lumen intestinal.

Los distintos estudios coinciden en que el flujo paracelular de fósforo representa un proceso de difusión pasivo que es conducido por un gradiente químico y físico transepitelial, mientras que el flujo de fósforo transcelular representa un proceso de transporte activo dependiente de energía.

Borowitz y Grishan (1989) describieron una captación de fosfato mediada por un transportador dependiente de sodio a través del borde en cepillo de la membrana del yeyuno humano. Este transporte es sensible al pH. Sin embargo, se ha comprobado que con una ingesta normal de fósforo, la absorción de este mineral está en función de la concentración de fósforo luminal, mientras que la absorción fraccional permanece constante.

II.3.3.3- Factores que afectan la absorción de fósforo

Una gran proporción de fósforo en la dieta es absorbido, aproximadamente del 60 al 70%; en general su biodisponibilidad es buena, tanto el procedente de fuentes orgánicas como el de fuentes inorgánicas.

Se acepta por regla general que el fósforo procedente del ácido fítico es menos biodisponible (Jarivalla y col., 1990), es también poco biodisponible el fósforo de algunos aditivos que se añaden a los alimentos tales como polifosfatos y pirofosfatos usados en la industria alimentaria. Sin embargo, en adultos la contribución de estas fuentes a la ingesta total de fósforo es escasa y el impacto en su biodisponibilidad puede ser considerado pequeño. Por otra parte, la baja biodisponibilidad del fósforo del fitato puede ser una cuestión importante en niños que consumen fórmulas infantiles basadas en la soja o poblaciones con una alta ingesta de fósforo en forma de ácido fítico.

El calcio tiene un efecto directo mediante la formación de compuestos insolubles con el fosfato en el intestino y, así un incremento de la concentración de calcio en el intestino con una relación Ca/P superiores a dos disminuye la absorción de fósforo a la mitad y por tanto su concentración en plasma (Clark, 1969). Por otra parte, el calcio presenta un efecto indirecto, debido a la acción del mismo sobre el metabolismo de la vitamina D; en este sentido la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ disminuye al elevarse los niveles de calcio sérico.

Hardwick y col. (1990) señalan que una alta ingesta de magnesio disminuye la absorción de fósforo en mayor grado que una ingesta elevada del mismo, aunque no se afectaría significativamente el balance de fósforo inorgánico.

En los alimentos vegetales el fósforo se encuentra fundamentalmente como ácido fítico y su absorción requiere de la presencia de una enzima, la fitasa. El fósforo de alimentos de origen animal tiene mayor biodisponibilidad.

II.3.3.4- Metabolismo

La concentración circulante de fósforo es dependiente de la ingesta dietética de dicho mineral inorgánico, absorción intestinal, filtración y reabsorción renal, y el intercambio entre depósitos intracelulares y del hueso.

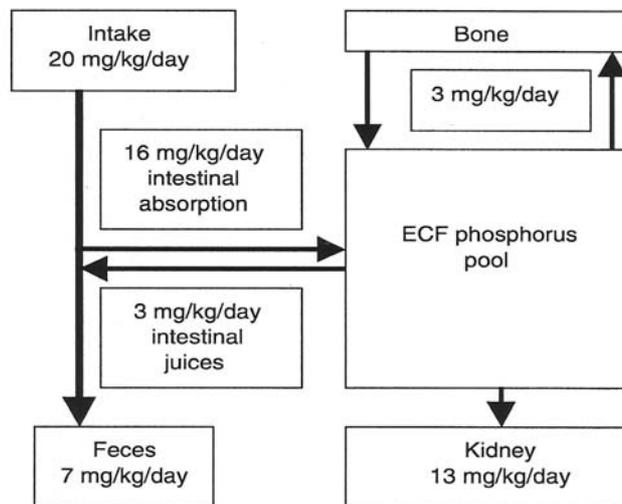


Figura III.6: Metabolismo del fósforo
(Tomado de Schiavi Y Kumar, 2004)

La figura explica el metabolismo de fósforo en humanos. Un ser humano normal ingiere aproximadamente 1.5 a 2 gramos del fósforo por día (20 mg/kg/día). De este 1 a 1.2 gramos (16 mg/kg/día) se absorben en el intestino proximal y aproximadamente 200mg (3 mg/kg/día) se secretan al lumen intestinal, lo que da una absorción neta de aproximadamente 1gramo (13 mg/kg/día). El fósforo absorbido entra en el compartimento extracelular y se transporta dentro y fuera del hueso en respuesta a las distintas necesidades (3mg/kg/día). Aproximadamente 1gramo es excretado por los riñones de manera que se absorben y excretan cantidades equivalentes de fósforo (Schiavi y Kumar, 2004).

El intestino, hueso y riñón constituyen los principales órganos involucrados en el mantenimiento del balance de fósforo. El equilibrio corporal general de fósforo se mantiene merced a la actividad de dos componentes principales de entrada y salida –el intestino delgado y los riñones- en tanto el hueso se comporta como reservorio del fósforo total. Además de dos componentes principales y el hueso, los niveles de Pi plasmáticos se hallan en equilibrio con los tejidos blandos. Ambos minerales están en equilibrio cuando la salida (pérdidas urinarias, sudorales y fecales endógenas) es igual al ingreso absorbido (absorción intestinal neta).

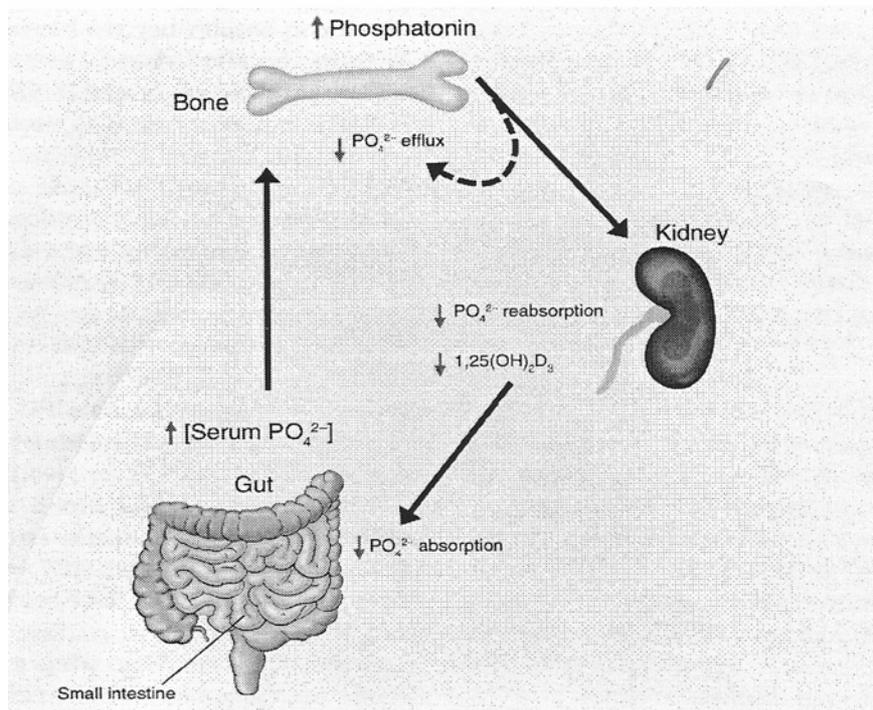


Figura III.7: Metabolismo del fósforo
(Tomado de Quarles, 2003)

La regulación de la homeostasis del fosfato en el riñón ocurre sobre todo en el tubulo proximal y es controlada por una variedad de factores que aumentan o disminuyen la reabsorción de Pi (Biber y col., 1998; Kumar, 2002a y b). Aproximadamente 80% del fosfato filtrado se reabsorbe junto con el sodio a través del cotransportador específico, NaPi IIa, situado en el tubulo proximal. NaPi IIa es un miembro de una de las tres familias distintas de cotransportadores de fosfato y sodio (Segowa y col., 2002; Tenenhouse y Murer, 2003)

El sistema homeostático, que evolucionó para mantener las concentraciones sanguíneas de calcio y Pi dentro de sus respectivos límites, es un clásico sistema endocrino con circuito de retroalimentación que fundamentalmente incluye dos hormonas, la PTH y la $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$. Ambas hormonas modulan los procesos de la absorción gastrointestinal, la reabsorción tubular renal y la resorción y acrementación óseas cuando las concentraciones sanguíneas de calcio y Pi salen de los límites normales (Garner, 1996).

La $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$ aumenta la absorción intestinal y la reabsorción del Pi (Kumar, 1990). La formación del metabolito activo de vitamina D, $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$, está regulado por el Pi dietético, la concentración del Pi circulante y la parathormona PTH. El Pi extracelular regula la actividad y la síntesis de la enzima $25(\text{OH})\text{D}_3$ 1α -hidroxilasa de manera que las concentraciones bajas de Pi aumentan mientras que las concentraciones altas la inhiben

(Kumar, 1990; 1991; 1997; Zhang y col., 2002). Esta regulación ocurre por un mecanismo independiente de PTH así como del transportador del fosfato del sodio, NaPi IIa (Tenenhouse y col., 2001).

La administración crónica de $1,25(\text{OH})_2$ y PTH modulan los niveles de mRNA y proteína de NaPi IIa. Los niveles de PTH elevados reducen rápidamente el número de los transportadores de NaPi IIa induciendo la endocitosis de la superficie de la membrana y la degradación lisosomal (Biber y col., 2000; Murer, 2002). El mecanismo del endocitosis inducida por el PTH implica el estímulo por lo menos de dos señales de transducción que convergen en la proteína quinasa (MAP), y (ERK) (Lederer y col., 2000; Bacic y col., 2003).

Además de la PTH y la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$, la insulina, la hormona del crecimiento y las hormonas esteroideas regulan los iones Pi en los líquidos corporales. Todas ellas obran sobre el riñón, el principal órgano regulador de la homeostasis del Pi extracelular, para aumentar o disminuir la capacidad renal para reabsorber el Pi filtrado (Tenenhouse, 1997). El riñón recupera alrededor de 80% de la carga filtrada de Pi, con 60% reabsorbido en el túbulo contorneado proximal, de 15 a 20% en el túbulo recto proximal y <10% en los segmentos más distales de la nefrona (Tenenhouse, 1997).

Además, se ha postulado la existencia de un nuevo factor que influirá sobre la homeostasis del Pi. La fosfatonina parece ser responsable de modular la excreción urinaria del fosfato en una serie de desórdenes que cursan con hipofosfatemia (Drezner, 2000; Schiavi y Moe, 2002; Tenenhouse y Murer, 2003). Existe un grupo de patologías en las que los niveles del fosfato se alteran sin cambios netos significativos de la concentraciones en suero de calcio, PTH y $1,25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$. Estas enfermedades son caracterizadas por hipofosfatemia, hiperfosfatemia, y la mineralización defectuosa del hueso (Kumar, 2000; Rowe, 2000; Yamamoto, 2001; Collins, 2001; De Beur, 2002).

El FGF-23 (factor 23 del crecimiento del fibroblasto), parece tener todas las características biológicas mencionadas para la fosfatonina. Los estudios *in vivo* establecen que FGF-23 integral es una hormona fosfatúrica (Yamashita y col., 2002; Saito y col, 2003) y puede tener un papel en la modulación de la reabsorción renal del fósforo y también en la producción de $1,25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$.

Los estudios *in vivo* demostraron que la proteína NaPi IIa se reduce tras la administración crónica de FGF23, apoyando la posibilidad, de formar similar a la PTH, de que el FGF23 pueda inducir la internalización y la degradación de NaPi IIa (Shimada y col., 2001; Saito y col., 2003).

II.3.4- Utilización nutritiva de magnesio

II.3.4.1- Aspectos generales

El magnesio es el cuarto catión más abundante en el cuerpo humano y, tras el K^+ , es el segundo en el espacio intracelular. El hueso sirve como depósito de este elemento, donde se encuentra aproximadamente el 50-60% del total, de manera que en situaciones de déficit es liberado a la sangre para conservar su concentración. Del resto, aproximadamente un 35% se distribuye en el músculo y los tejidos blandos y un 1% en el líquido extracelular (Cashman y Flynn, 1999).

El magnesio corporal total es de aproximadamente de 21 a 28 gramos, su concentración en plasma está en torno a 0.85% mmol/L y el nivel se mantiene de forma bastante constante en individuos sanos a través de homeostasis. Se puede encontrar libre ionizado (55%), forma de complejos (15%) o unido a proteínas (30%) principalmente a albumina (Saris y col., 2000).

La investigación actual ilustra la importancia del magnesio en la salud humana y las enfermedades (Saris y col., 2000; Rayssiguier y col., 2001). El magnesio es un mineral esencial que juega un papel fundamental en los principales procesos biológicos (Coudray y col., 2002). Actúa como cofactor de más de 300 enzimas, entre los que destacan los involucrados en reacciones en las que se forma o utiliza ATP y forma parte de la bomba de membrana que mantiene la excitabilidad eléctrica de las células musculares y nerviosas. Juega un papel significativo en la permeabilidad celular y en la función neuromuscular con su participación en la actividad de la creatin quinasa (Shils; Bengoa y Woord., 1984). Es esencial para muchos procesos biosintéticos, glucólisis, formación de AMP cíclico, transporte de membrana con consumo de energía y transmisión del código genético (Rude, 1998).

La estabilización de las membranas celulares mediante la formación de complejos con los fosfolípidos, constituye una de las funciones más importantes del magnesio. El déficit del ión incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática aumentando los niveles intracelulares de Ca^{2+} y Na^+ , y disminuyendo los de K^+ y fosfatos (Baehler y col., 1980; Planells y col., 1993) ya que además de los cambios estructurales que ocasiona (Aranda y col., 1989; Lerma y col., 1995), el magnesio es esencial para la actividad de la bomba de Na^+ y Ca^{2+} . Recientemente se ha puesto de manifiesto que regula el cotransporte de Na^+ , K^+ , Cl^- y KCl e influye en el tráfico de iones a través de los canales de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ (Flatman, 1991).

A nivel mitocondrial, Mg mantiene la permeabilidad de la membrana y el acoplamiento de la fosforilación y producción de ATP. Juega también un papel importante en la regulación de la síntesis de proteínas y por lo tanto del inicio de la síntesis de la DNA (Rubin, 2005).

II.3.4.2- Absorción y transporte

La mayoría de los autores (Chutkow, 1964; Brink, 1992) aceptan que el magnesio se absorbe más en el intestino distal (íleon y colon) y en menor proporción en el intestino grueso. Diversos estudios metabólicos ponen de manifiesto que, en condiciones normales, el magnesio se absorbe en una proporción que oscila entre el 45 y 70 %. Actualmente se admite la existencia de dos sistemas de transporte intestinal para el catión:

Difusión pasiva: La fuerza motriz es el gradiente químico de un lado a otro del epitelio intestinal, por tanto la absorción variará en función de la concentración existente de Mg (Fine y col., 1991). Normalmente se da a altas concentraciones de mineral.

Transporte activo: Transporte saturable. Este tipo de transporte ocurre, fundamentalmente, en el intestino delgado y el colon descendente, puede ser estimulado por la vitamina D y es importante en ingestas bajas de magnesio.

Todavía hay una gran incertidumbre referente a los mecanismos exactos de la absorción intestinal del magnesio y si hay una subida adaptativa compensatoria en la fracción del magnesio absorbida en caso en que la ingesta de este mineral se disminuya (Schweigel y Martnes, 2000).

Sin embargo, otros datos sugieren que la absorción de Mg ocurre principalmente por difusión pasiva y por un mecanismo de arrastre de solvente bajo ingestas habituales de este mineral (Kayne y Lee, 1993).

La fracción absorbida del magnesio ingerido está influenciada por su concentración en la dieta, por su solubilidad en los líquidos intestinales y por la presencia de componentes inhibidores o sus precursores. En estudios realizados con ^{28}Mg en la sangre después de la ingesta oral, en humanos, se ha comprobado que la absorción se inicia antes de una hora, se estabiliza a una tasa de 4 a 6% desde la segunda hasta la octava hora y, luego, disminuye con rapidez y cesa en la décima hora (Graham y col., 1960).

II.3.4.3- Factores que afectan la absorción de magnesio:

La ingesta es un factor fisiológico que tiene mucha importancia en la buena absorción de magnesio, está disminuyendo fraccionalmente a medida que aumenta la ingesta del mineral debido al aumento de la excreción urinaria del mismo. En caso contrario de un bajo aporte dietético de magnesio, se produce un aumento de la absorción, que irá acompañada de una menor eliminación urinaria (Brink y col., 1991).

En dietas de alto contenido proteico se ha comprobado el incremento de la absorción aparente de Mg, seguida del incremento de la excreción urinaria, no sólo debida al exceso de absorción sino también al efecto de los aminoácidos asufurados (Brink y Beynen, 1992).

El aumento de la ingesta lipídica favorece la absorción del Mg, aunque inicialmente podría pensarse lo contrario como consecuencia de la formación de jabones. El efecto depende de las concentraciones dietéticas de calcio y magnesio (Kaup y col., 1990).

Yonekura y col. (2004) observaron que tras la introducción de fructooligosacáridos (inulina) o de almidón resistente en una dieta que contenía ácido fítico, se producía un incremento en la absorción de Mg así como un mejor estatus esquelético de Mg.

Pallauf y col (1998) observaron un importante efecto inhibitor del ácido fítico sobre la absorción y retención de Mg, siendo esta reducción más significativa conforme se incrementan los niveles de fítico que se adiciona a una dieta de caseína-metionina en ratas en crecimiento. Ekholm y col. (2003) observaron que el magnesio presenta una baja afinidad por el ácido fítico.

II.3.4.4- Metabolismo

A nivel intracelular, el magnesio se encuentra en todos los compartimos y el contenido celular total varía entre 5 y 20 mmol/l. Se asocia principalmente con aniones y se liga al ATP en porcentajes que oscilan entre 80 y 90% (Frausto y Williams., 1991). Por esta razón, el contenido de magnesio celular total se asocia positivamente con la actividad metabólica de las células, por ejemplo, los eritrocitos contienen 75% menos magnesio que los hepatocitos. La proporción del magnesio intracelular libre es de 1 a 5% del magnesio celular total (0.3-0.6 mmol/l) y puede constituir un importante regulador metabólico.

Una vez absorbido, el magnesio es transportado a los distintos tejidos, siendo en el tejido óseo donde se encuentra en mayor proporción. El magnesio óseo se encuentra localizado en los cristales de hidroxapatita, al menos en dos formas químicas, siendo el hidróxido la porción soluble. De un 20-30% en la superficie de los cristales, es fácilmente intercambiable y se encuentra afectado por los niveles séricos. El resto se encuentra íntimamente incorporado y no es intercambiable, da un índice más real de la cantidad del catión que existe en el organismo ya que es más fácilmente modificable a efectos homeostáticos (Aranda y col., 1989; Planells y col., 1993).

El tracto gastrointestinal y el riñón juegan un papel muy importante en el metabolismo y en la regulación de la homeostasis del magnesio (Rude, 1998). El balance se regula primariamente a través de cambios en la excreción renal y principalmente esta influenciada por la concentración del magnesio sérico. Parece no existir un mecanismo homeostático hormonal eficaz para la regulación del magnesio sérico. Los valores normales resultan de un

equilibrio entre la absorción gastrointestinal y la excreción urinaria. Varios estudios han mostrado que cuando se inyecta magnesio existe un aumento lineal en la excreción urinaria, paralela al aumento de los niveles séricos en individuos sanos. Quamme y de Rouffignac (2000) describieron la existencia de un umbral de filtración de magnesio en el riñón por debajo del cual el Mg es ávidamente conservado y que cuando el umbral es superado el magnesio es excretado completamente.

La reabsorción de magnesio ocurre en los riñones, los cuales proporcionan un mecanismo muy sensible para mantener la homeostasis en la sangre (Quamme, 1993). Normalmente, los riñones filtran aproximadamente 2500 mg/día y excretan 100 miligramos en la orina diariamente, reabsorbiendo 2400 miligramos o el 95% del magnesio filtrado. La reabsorción y excreción urinaria son perfectamente balanceadas bajo condiciones de almacenamientos normales. Sin embargo, bajo condiciones de deficiencia, los riñones son capaces de conservar magnesio, y la eliminación urinaria puede disminuir a menos de 12 mg/día.

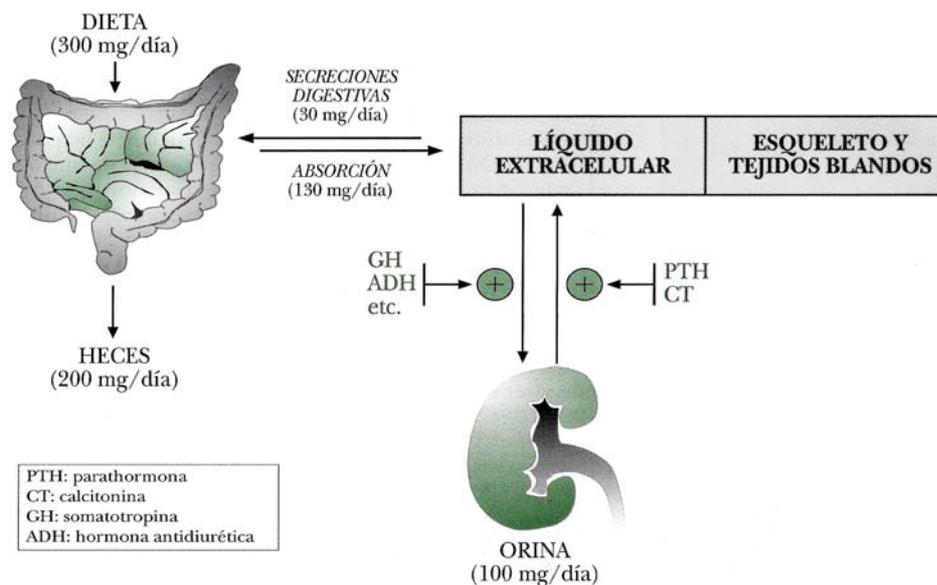


Figura III₈: Metabolismo del magnesio
(Tomado de Mataix y Llopis, 2002)

En los riñones, el magnesio primariamente se reabsorbe en 2 sitios a lo largo del nefrón, aproximadamente 30% se reabsorbe en el túbulo contorneado proximal a través de un sistema de transporte pasivo dependiente de la reabsorción del sodio y del líquido del fluido tubular. Aproximadamente 50% a 60% de la reabsorción ocurre en la rama ascendente del Asa de Henle, la cual está en contraste con la reabsorción de otros electrolitos cuya reabsorción ocurre en la porción proximal del Asa de Henle. Aproximadamente 5% se reabsorbe en el tubo contorneado distal.

Respecto a la excreción, el riñón es la mayor vía de eliminación de magnesio y el proceso de reabsorción tubular controla la homeostasis del Mg (Rude, 1998). Del 95-97% del Mg filtrado es reabsorbido y sólo de un 3-5% es excretado.

Se ha demostrado que sin influencias hormonales, el transporte de magnesio es un proceso pasivo que ocurre en el espacio paracelular y está controlado por el transporte de ClNa y la diferencia de potencial a través de la célula. Cuando se añaden arginina, vasopresina, glucagón, calcitonina, PTH e insulina a un baño con los segmentos separados de la rama ascendente gruesa cortical del asa de Henle del riñón de un ratón, aumenta de manera significativa la absorción de magnesio (Kayne y Lee, 1993). Otras hormonas que influyen de un modo directo o indirecto sobre la excreción renal son: La hormona del crecimiento, la antidiurética, las suprarrenales, andrógenos y estrógenos, todas ellas aumentan la excreción urinaria. Igualmente la eliminación renal está aumentada por otras sustancias como la glucosa, galactosa, etanol, etc (Shils, 1988).

II.3.5- Utilización nutritiva de cinc

II.3.5.1- Aspectos generales

El cinc es el elemento traza intracelular más importante, más del 95% del cinc presente en el cuerpo se encuentra en las células, de un 60-80% se encuentra en el citosol. El cinc esta presente en todos los órganos, tejidos y fluidos corporales, participando en numerosas funciones catalíticas, estructurales y reguladoras indispensables para muchos sistemas biológicos (Aranda y Llopis., 1993).

El contenido total de este mineral en el individuo adulto oscila entre 1.4 y 2.5g y la mayor parte esta repartida entre el hueso y el esquelético. Entre los tejidos con un mayor contenido destacan los fluidos prostáticos (650 mg/g), el hueso (100-250 mg/g), el hígado (199 mg/g) y el riñón (163 mg/g). En el plasma acumula sólo del 0.1 al 0.5%, lo que permite afirmar que es un catión intracelular (Cousins y Hempe., 1991; Shrimpton, 1994).

La mayoría de las funciones bioquímicas del cinc, evidencian su participación como elemento estructural de numerosas enzimas o su condición de estabilizador de estructuras moleculares a nivel de los constituyentes subcelulares y sus membranas (Bettger y col., 1981; Cunningham y col., 1990). Es parte fundamental de numerosas metaloenzimas y activador de otras, como la fosfatasa alcalina, el alcohol deshidrogenasa, la anhidrasa carbónica, la deshidrogenasa glutámica, la carboxipeptidasa, la ARN y ADN polimerasas y otras (Amador y col., 1996; Moya, 1998).

El cinc es un antioxidante (Zalewski y col., 2005). Algunos de los efectos antioxidantes de este mineral son debidos a la estabilización de grupos sulfhidrilos y de lípidos de la membrana (Powell, 2000; Carter y col., 2002), y al supresión de la producción del óxido

nítrico (Cui y col., 1999). Taylor y col. (1997) han demostrado que *in vivo* la deficiencia del cinc causa un aumento del stress oxidativo en los pulmones. Sin olvidar el papel antiinflamatorio y inmunoregulador del cinc (Zalewski y col., 2005). En primer lugar, las mastocitos, que son componentes dominantes en las reacciones alérgicas y antiinflamatorias, son extremadamente ricas en el Zn, la mayor parte esta contenido dentro de sus gránulos (Ho y col., 2004).

Una diana importante del cinc puede ser NF-KB, un factor de la transcripción citoplásmica que en células activadas se desplaza al núcleo y es crítico para la expresión de muchas citokinas pro-inflamatorias (Aggarwal y col., 2004).

Aunque todavía se sabe relativamente poco sobre su influencia sobre el sistema respiratorio, este mineral tiene una serie de características que potencialmente le permiten modular la función no solamente del epitelio de la vía aérea pero también de las células que median la producción del colágeno y de otras proteínas extracelulares de la matriz (Sacco et al., 2004), células inmunoreguladoras (macrófagos, linfocitos B, T, células dendríticas) (Stumbles, 1999), y células inflamatorias tales como eosinofilos, neutrofilos y células del mástil.

II.3.5.2- Absorción y transporte

La homeostasis del cinc se mantiene mediante la regulación de la absorción digestiva de este mineral y el control de la secreción endógena de cinc dentro del tracto intestinal (Sandstrom, 1995). El intestino es el órgano clave para mantener este balance. Si se aísla de las influencias sistémicas y de las secreciones pancreáticas, el intestino conserva signos de adaptación de la absorción programada por la ingesta alimentaria previa (Smith y Cousins, 1980), lo que sugiere que el control de la adaptación de la absorción a la ingesta alimentaria de cinc se encuentra en el propio intestino.

El contenido de cinc del cuerpo humano de 1.5 a 2.5g es parecido a de hierro (Hambidge, 1986) y se mantiene gracias a la absorción de unos 5mg/día. El cinc se absorbe en el intestino delgado en una cantidad aproximada del 35%, el lugar de máxima absorción es para unos investigadores el duodeno (Foster y col., 1979) y para otros el yeyuno (Lee y col., 1989), aunque también en ileon se puede absorber (Antonson y col., 1979). Tras la ingestión de los alimentos, las cantidades intraluminales de cinc aumentan de 1.5 a 3 veces el valor de la ingesta en el duodeno distal, probablemente debido a las secreciones de jugos digestivos que contienen cinc. El contenido intraluminal de cinc disminuye sustancialmente en el yeyuno (Matseshe y col., 1980).

La absorción de cinc a través de la superficie en cepillo ocurre por medio de un mecanismo de transporte y uno de difusión (Cousins y Hempe., 1991). Cuando la ingesta de

cinc es alta se establece un mecanismo de transporte no saturable, este mecanismo puede darse por medio de difusión pasiva o movimiento entre las células mucosales. A bajas concentraciones lumbales de cinc predomina el mecanismo mediado por un transportador, el cual no requiere energía.

La absorción de cinc por medio de transportador se estimula cuando la concentración de cinc en la dieta es baja (Hoadley y col., 1988). La afinidad del transportador por el cinc no varía en una ingesta reducida del mineral, pero la capacidad de transporte mediada por receptor sí lo hace, lo cual sugiere un aumento en el número de receptores.

El cinc intercelular puede ser utilizado por la célula para procesos propios, puede unirse fuertemente a la metalotionina y conservarse dentro de la célula, o puede transportarse fuera de la célula unida a la CRIP (proteína intestinal rica en cisteína). El transporte transcelular del cinc da como resultado una liberación de este al lumen intestinal o a la circulación sanguínea. El cinc que queda atrapado en la célula por su unión a la metalotioneína (una pequeña proteína con grupos azufrados que se une al cinc y puede representar una forma intracelular de almacenamiento), se perderá eventualmente en las heces en el transcurso normal del turnover intestinal. El papel de la metalotioneína en el metabolismo del cinc es similar al de la ferritina en el metabolismo del hierro. La citada metalotioneína regula la homeostasis del cinc y previene su absorción excesiva (Hoadley y col., 1988). El transporte de cinc a través de la membrana serosa está mediado por un transportador y ocurre por un mecanismo dependiente de energía (Cousins, 1986).

Se han caracterizado recientemente nuevos transportadores involucrados en la absorción y transporte de cinc. Un grupo es la proteína hZIP: 14 genes que codifican ZIP se han identificado en el genoma humano, tiene 8 dominios transmembrana, también una región citoplasmática rica en histidina y región anfipática entre el dominio III y V que puede formar la pared del canal iónica del Zn (Kambe y col., 2004).

Fue demostrado que las proteínas del hZIP funcionan para importar el Zn en las células a través de la membrana del plasma. La desregulación del funcionamiento del transportador del Zn puede provocar el desarrollo de ciertas enfermedades. Por ejemplo, la expresión de LIV1 (hZIP6) aumenta en caso de cáncer de mama y se regula por los estrógenos (Taylor et al., 2003). Otro ejemplo es hZIP4, que se localiza en la membrana apical de enterocitos y contiene una estructura en forma de lazo rico en histidina y que sobresale hacia el lumen del intestino. Su expresión está regulada al alza en caso de deficiencia del Zn (Wang et al., 2002).

Otro grupo de transportadores de Zn es la familia de los facilitadores de la difusión del catión (CDF, también conocido como ZnT y recientemente como SLC30A) (Seve et al., 2004). Este grupo de transportadores de cinc (ZnT1, ZnT2....) guardan ciertas características

comunes, como la presencia de 6 regiones transmembrana y la presencia de los grupos amino y carboxilo terminales dentro del espacio intracelular. También tienen un dominio rico en histidina conservado entre los segmentos transmembrana IV y V, que ata el zn y los segmentos anfipáticos de la transmembrana que pueden alinear el canal iónico del Zn (Kambe et al., 2004).

El ZnT1 se encuentra implicado principalmente en la salida del cinc a través de la membrana y también regula la salida del Zn al plasma por la membrana basolateral de los enterocitos que cubran el duodeno y el yeyuno (Cousins y McMahon, 2002).

El transportador ZnT3 es una proteína específica del cerebro y secuestra el cinc en gránulos presinápticos secretorios que contienen glutamato bajo la influencia del canal clorhídrico dependiente de voltaje CIC-3 (Salazar et al., 2004).

El ZnT5 se localiza en la membrana de los gránulos de las células pancreáticas secretorias de insulina ricas en Zn (Kambe et al., 2002), y también en otros tejidos (Cragg et al., 2002).

El ZnT6 y ZnT7 se localizan en el aparato de Golgi pero poco se sabe sobre sus funciones y sus distribuciones en los tejidos (Huang et al., 2002; Kirschke y Huang, 2003).

El ZnT8 es específico de páncreas endocrino (Seve et al., 2004) y el ZnT10 está restringido en el hígado y el cerebro fetales (Seve et al., 2004).

Recientemente, diversos autores Hara y col. (2000) han hecho énfasis en la capacidad del ciego y colon para absorber limitadas concentraciones de cinc en experimentos *in vivo e in vitro*, sugieren que el ciego y colon pueden tener un papel importante en la absorción de cinc cuando se dan condiciones de malabsorción de este mineral. Condamina y col. (2002) indican que el transporte de cinc en el intestino grueso se basa en la difusión pasiva y por tanto tienen especial importancia los factores que tienden a mejorar la solubilidad de este cation, tal es el caso de la fibra soluble que al ser fermentada en el intestino grueso causa un descenso del pH y un aumento de la solubilidad y por tanto de la absorción de cinc (lópez y col., 1998; Yonekura y col., 2004).

II.3.5.3- Factores que afectan la absorción de cinc

Bajo condiciones fisiológicas y dietéticas normales, los factores que afectan a la cantidad de cinc disponible para su absorción por parte del tracto digestivo determinan la biodisponibilidad de este mineral. La solubilidad del cinc en los lugares preferentes de absorción intestinal tiene un impacto más que probable sobre su disponibilidad. El cinc de los alimentos se extrae con relativa facilidad en el pH ácido presente en el estómago, uniéndose posteriormente a diversos componentes orgánicos en el pH más básico presente en el intestino

delgado. Esto se refleja en una menor utilización digestiva de cinc presente en un alimento cuando se compara con la misma dosis en una solución acuosa (Sandstrom, 1997).

Entre los factores dietéticos más importantes para la absorción de cinc cabe destacar:

El contenido de cinc de la dieta es un factor importante para la cantidad de cinc absorbida, una mayor cantidad en valores absolutos se absorberá tras una ingesta alta de cinc, pero al aumentar la ingesta disminuirá la absorción fraccional.

Existen indicios de una relación significativa entre los niveles de proteína de la dieta y la absorción de cinc en el tracto digestivo, niveles bajos de proteína provocan una menor absorción de cinc en el intestino delgado y una mayor excreción de cinc endógeno (Van campen y House. 1974). La utilización digestiva de cinc aumenta ligeramente con los niveles de proteína en la dieta (Lonnerdal, 2000) y algunos autores encuentran absorciones muy reducidas de este mineral o incluso nulas con niveles proteicos del 4 o 5% (Urbano y col., comunicación personal).

Uno de los agentes más importantes en la disminución de la absorción de cinc es el ácido fítico presente en leguminosas y cereales. La absorción de cinc en una dieta rica en ácido fítico puede ser mejorada al aumentar el contenido proteico de la dieta (Sandstrom y col., 1989).

Coudray y col. (2005) demostraron claramente que el producto de la inulina aumentó la eficacia de la absorción y de la retención intestinal del Zn.

Los mecanismos de transporte de cationes al interior de la célula están determinados en parte por su configuración y propiedades de coordinación. Por tanto, elementos con características fisicoquímicas similares compiten por vías comunes. La afinidad por una proteína transportadora mutua también puede provocar competencia con distintos metales como el calcio, hierro, cobre...

Hay otros factores: La edad del individuo tiene influencia sobre su capacidad de absorber cinc. Los animales recién nacidos absorben cinc en una proporción mayor que los animales de más edad, quizás porque su sistema de transporte tiene más afinidad por el catión (Lönnerdal, 1989). La absorción de cinc disminuye con la edad.

Las influencias hormonales asociadas al stress (corticosteroides y citokinas relacionadas) pueden aumentar la eficacia de absorción de cinc (Cousins, 1985), así mismo, aumentan significativamente la absorción de cinc en la rata la endotoxemia y la infección bacteriana aguda.

El pH intestinal no parece influir en la absorción de cinc, sin embargo, una acidez reducida por baja secreción de HCL en el estómago, sí puede dar lugar a un descenso en la absorción del mineral (Hara y col., 2000). Las prostaglandinas intraluminales sí parecen tener influencia en la absorción, la PGE2 aumenta la absorción y la PGF2 la inhibe (Hoadley y col., 1988).

II.3.5.4- Metabolismo

La homeostasis del cinc esta regulada en parte por cambios en la absorción y excreción en respuesta a cambios en la ingesta dietética. Durante los periodos de bajas ingestas el mantenimiento de la homeostasis se debe tanto al incremento de la absorción como de la retención, mientras que, frente a altas ingestas, en la regulación de la homeostasis juega un papel primordial el aumento de la excreción (Cousins y Hempe, 1991).

El control homeostático del metabolismo de cinc se mantiene sobre todo a través de la excreción fecal de cinc endógeno (King y Tunlund, 1989). Con ingestas de cinc de 7, 15 y 30mg/día, las pérdidas fecales humanas son de 6.8, 14.4 y 30.1mg/día, respectivamente (Jackson y col., 1984). Las pérdidas endógenas proceden de la mezcla de las secreciones pancreática e intestinal. Las comidas estimulan la secreción de cinc endógeno, y más de la mitad del que existe en la luz intestinal puede proceder de esta fuente (Matseshe y col., 1980). La pérdida renal de cinc es escasa y la ingesta alimentaria del elemento ni influye de forma significativa sobre ella (Jackson y col., 1984). El cinc urinario responde a los cambios del catabolismo muscular (Fell y col., 1973) y el glucagón podría regular la reabsorción de cinc en el túbulo distal renal (Victery y col., 1981).

El estado fisiológico del organismo tiene asimismo una fuerte influencia en la regulación de la homeostasis del cinc. Las citocinas, sobre todo las interleucinas 1 y 6, influyen en el metabolismo del cinc. Se cree que un estrés, por ejemplo, una infección aguda en la que se producen exotoxinas, determina la secreción de citocinas que tienen efectos múltiples, entre ellos la activación de las células inmunitarias. La interleucina 1 aumenta la captación de Zn_{65} en el hígado, la médula ósea y el timo, siendo menor la cantidad llegada al hueso, a la piel y al intestino mientras la interleucina 6 aumenta directamente la captación de zinc por los hepatocitos (Schroeder y cousins, 1990).

El cinc en hueso que normalmente tiene una velocidad de turnover baja, puede movilizarse en casos extremos como una deficiencia de cinc durante el embarazo (Hurley y Tao, 1972). Altas ingestas de cinc inducen la síntesis de metalotioninas (Richards y Cousins, 1976). Se ha sugerido que la metalotionina está involucrada en el “control fino” de los niveles intracelulares de cinc activo.

Respeto a la excreción, en circunstancias dietéticas normales, las heces son la vía principal de excreción de cinc (Hambidge y col., 1986), mientras que la urinaria es una vía secundaria de eliminación. Otras vías de excreción son pelo, sudor, descamación de la piel, menstruación, semen, fluido prostático y, en situaciones de embarazo y lactancia, cantidades importantes se transfieren diariamente de la madre al feto o al lactante.

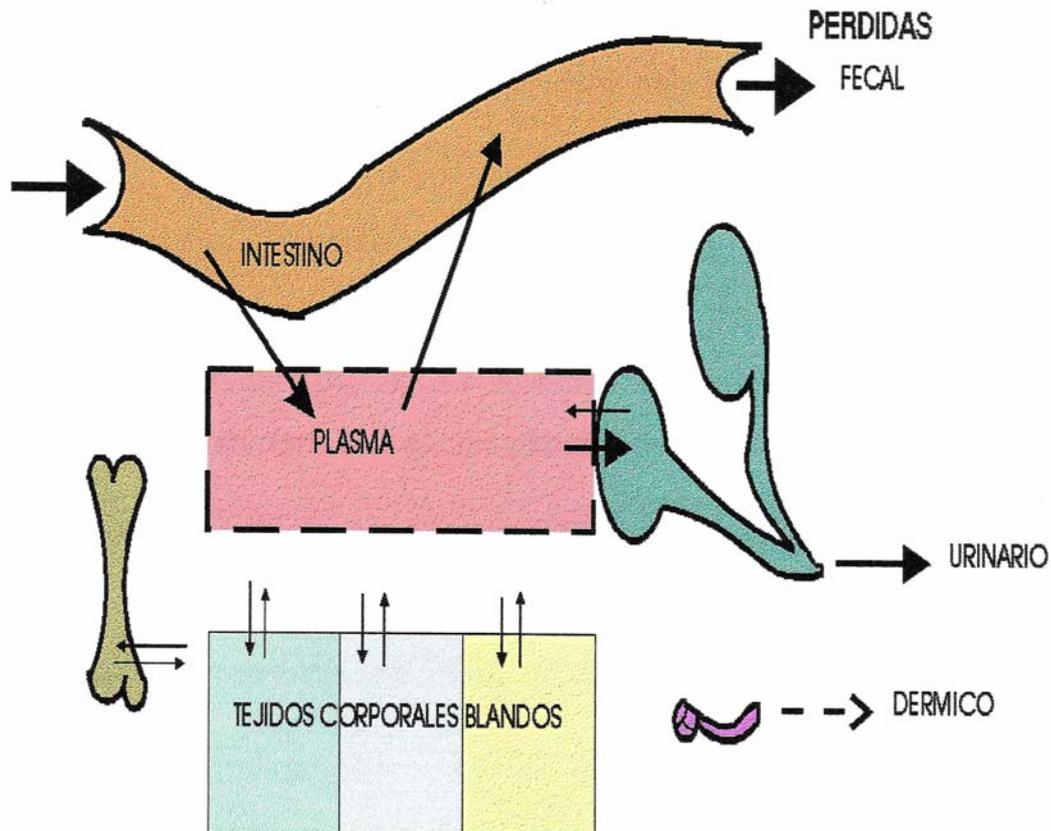


Figura III₉: Homeostasis y metabolismo del cinc corporal
(Tomado de King y Keen, 1994)

La cantidad de cinc en orina se origina principalmente de la proporción ultrafiltrable de cinc en el plasma. En condiciones normales hasta el 95% del cinc filtrado es reabsorbido en la porción distal del túbulo renal (King y Keen, 1994). La cantidad de cinc que se excreta en orina se correlaciona con la tasa de producción de orina y excreción de creatinina. El catabolismo del músculo, como en caso de quemaduras graves, cirugía mayor, otros traumatismos, e inanición, causan un aumento clínico en la pérdida urinaria de cinc. Una marcada disminución o aumento en la ingesta de cinc causará el consiguiente cambio en las pérdidas de superficie (Milne y col., 1984).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1- Animales:

Todos los animales fueron alojados en jaulas individuales de metabolismo que permiten el control de la ingesta de alimento y la recogida separada de heces y orina. Los animales tuvieron acceso a la comida y al agua ad libitum excepto en los periodos en que eran sometidos a ayunas. Las jaulas están colocadas en una habitación termo regulada y aireada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) con fotoperíodo controlado (21h a 9h luz, 9h a 21h oscuridad). El fotoperíodo se invirtió con objeto de facilitar el control de la ingesta debido a que la rata es un animal nocturno que realiza la ingesta de alimento preferentemente en la oscuridad.

Todos los procedimientos experimentales se han desarrollado cumpliendo estrictamente la normativa europea de experimentación animal (Directiva del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC)).



Figura 1: Jaulas individuales de metabolismo diseñadas para el control de la ingesta y de la bebida

III.2- Dieta:

Todos los estudios se realizaron en ratas Wistar macho de 200-220g de peso, alimentadas con pienso estándar de laboratorio que cubre las ingestas recomendadas para estos animales (NRC, 1995) y que procedían del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada.

Energía (kj/ kg)	12.99
Nitrógeno (g/kg)	26.1
Proteína (N x 6.25) (g/kg)	163.1
Grasa(g/kg)	41.0
Hidratos de C (g/kg)	690.0
Fibra(g/kg)	45.1
Cenizas (g/kg)	60.8
Magnesio (mg/100g SS)	167
Fósforo (mg/100g SS)	674
Cinc (mg/100g SS)	16.6
Calcio (mg/100g SS)	1350

Tabla 1: Composición química de la dieta en sustancia seca

III.3-Fármacos ensayados:

Los fármacos utilizados son: WIN 55,212-2 y AM251, se adquirieron en Tocris Cookson (Bristol UK). El vehículo utilizado para diluir los fármacos fue dimetilsulfóxido (DMSO) y se administró en proporción 60%DMSO: 40% NaCl 9%.

Compuesto	AM251	WIN 55,212-2
Nombre químico	N-(piperidin-1-yl)-5-(4-idophenyl)-1-(2 dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide.	(R)-(+)-(2.3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl) pyrrolo (1.2.3-de)-1.4-benzoxazin-6-yl)-1-naphthalenylmethanone mesylate.
Formula molecular	$C_{22}H_{21}Cl_2IN_4O$	$C_{27}H_{26}N_2O_3 \cdot CH_3SO_3H \cdot 1/2H_2O$
Solubilidad	DMSO a 100 mM	DMSO a 100 mM
Acción Biológica	Agonista inverso de los receptores CB1	Agonista de los receptores CB_1 y CB_2

Tabla 2: características químicas del AM251 y del WIN 55,212-2.

III.4- Administración de los fármacos

III.4.1- Administración intraperitoneal: Los fármacos se administraron intraperitonealmente a dosis de 0.5, 1, 2 y 5 mg/kg peso. Los resultados obtenidos se compararon con un grupo control inyectado con el vehículo (60%DMSO: 40% NaCl 9%).

III.4.2- Administración intracerebroventricular. Cirugía

Se pesaron a las ratas luego se anestesiaron con hidrato de cloral (400 mg/kg; i.p). A continuación se fijó la cabeza del animal en un aparato estereotáxico para roedores (David Kopf Instrumentos, EE.UU) (fig 2). Se realizó una incisión longitudinal de 2 cm sobre la piel del cráneo y se descartó la piel para descubrir el hueso parietal. Después de haber retirado cuidadosamente todo rastro de sangre, se practicaron orificios en el hueso parietal con ayuda de una taladradora fina. Estos orificios sirvieron para la implantación de la cánula guía de la sonda, del inyector y para la instauración de minitornillos de acero inoxidable.



Figura 2: El aparato estereotáxico adaptado a los roedores
(David Kopf Instruments, USA)

Se estableció un inyector en el tercer ventrículo (3V) según los siguientes datos estereotáxicos (Atlas Paxinos et Watson, 1986):

- Eje anteroposterior (AP) : - 0.28cm
- Eje medio lateral (ML) : 0 cm
- Eje dorsoventral (DV) : - 0.94 cm

La cánula guía se estableció en el hipotálamo ventromedial VMN (Fig.3) en el punto de intersección de los datos estereotáxicos siguientes:

- Eje anteroposterior (AP) : - 0.28 cm
- Eje medio lateral (ML) : - 0.06 cm
- Eje dorsoventral (DV) : - 0.76 cm

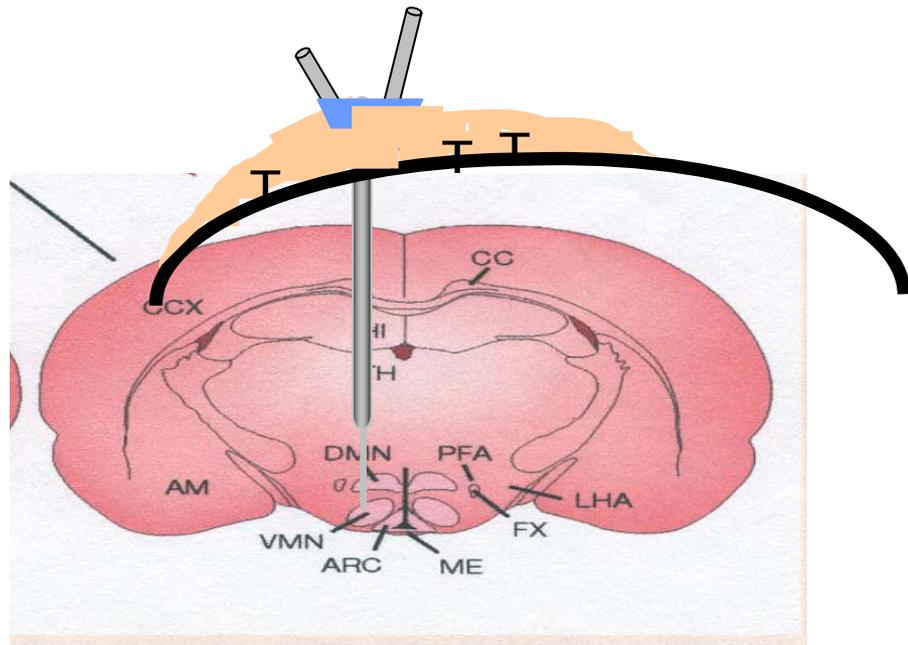


Figura 3: Localización de la sonda en el hipotálamo ventromedial VMN

Estos datos se determinaron refiriéndose al punto bregma (fig 4). Se pega el cemento dental a continuación cuidadosamente sobre la unión de estos elementos con el fin de obtener una buena fijación.

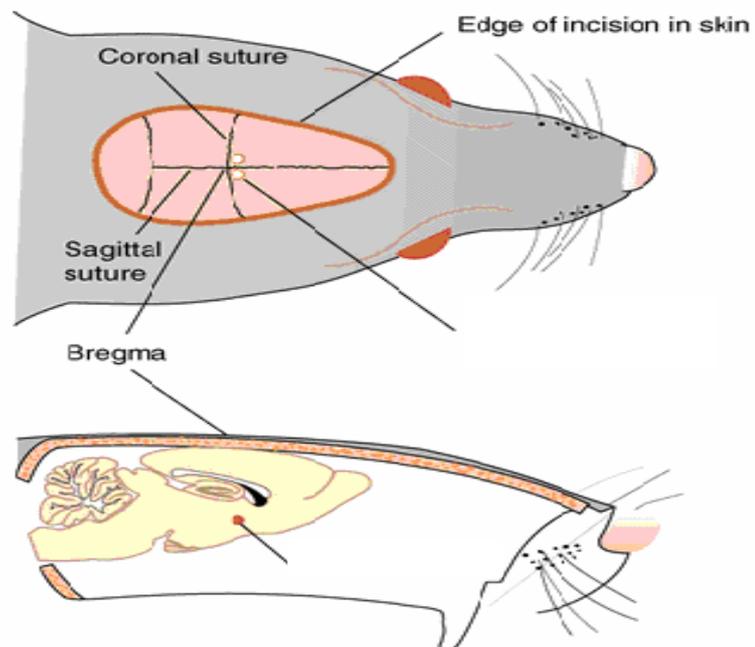


Figura 4: Localización del punto Bregma

Estas dos implantaciones se efectuaron con una gran precaución y con el fin de evitar posibles daños de los tejidos orgánicos. Se volvió a poner al animal en su jaula una vez que se solidificó el cemento dental. El animal recibió exactamente después de la operación una inyección de una solución glucosa (1mg/ml) y se sometió a una vigilancia post operativa continua.

La intervención quirúrgica duró alrededor de 1 hora. La microdiálisis se realizó una semana después de la operación quirúrgica, esta duración permite al animal recuperarse del traumatismo potencial que podría haberse producido por la operación.

III.5- Microdiálisis intracerebral

La microdiálisis cerebral es una técnica de extracción neuroquímica potente por la cual diferentes compuestos del fluido extracelular, incluidos los neurotransmisores y sus metabolitos, pueden controlarse continuamente. Esta técnica se utiliza generalmente para evaluar los efectos de tratamientos farmacológicos sobre la liberación de los neurotransmisores y ofrece así índices importantes que se refieren al funcionamiento sináptico. El principio de la diálisis se basa en la difusión molecular entre dos compartimentos separados por una membrana semipermeable. Es un fenómeno pasivo que obedece a la ley de Fick.

La diálisis cerebral utiliza un sistema cerrado y consiste en implantar estereotáxicamente una sonda de diálisis con membrana semipermeable de Cuprophane en una superficie precisa del cerebro. Las sondas utilizadas presentan las siguientes características: diámetro exterior: 0,24 mm., longitud de la membrana: 2mm y diámetro de poro 6.000 DA. Esta implantación esta bien descrita en la pagina (50). El protocolo utilizado es el que fue publicado por El ayadi y col., 2001.

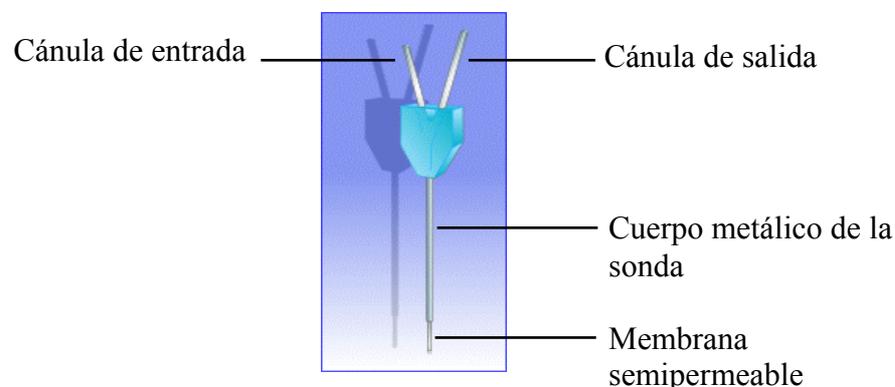


Figura 5: Imagen de una sonda concéntrica CMA/11

III.5.1- Preparación de soluciones

Las perfusiones se efectúan con el líquido cefalorraquídeo sintético LCRs cuya composición es la siguiente:

- NaCl 140 mM
- KCl 3,0 mM
- CaCl₂ 1,2 mM
- MgCl₂ 1,0 mM

El pH se ajusta a 7,4 con el NaOH a 0.1 N; el LCRs se filtra a continuación sobre un filtro estéril de una porosidad de 0,22 µm.

III.5.2 - Realización de la microdiálisis

El día de la experiencia, la sonda de microdiálisis se introduce delicadamente dentro de la cánula guía. La posición de la cánula guía permite la localización de la extremidad de la sonda en el VMH.

La entrada de la sonda se conecta mediante un catéter de polietileno a un selector de jeringuillas o switcher de tipo CMA 11 (CMA Microdialysis, Suecia). Este último se conecta a su vez a una bomba de microinyecciones CMA/100 (CMA Microdialysis, Suecia) donde se colocan algunas jeringuillas Hamilton llenadas por el LCRs (Fig. 6). Un catéter fijado en la salida de la sonda permite recoger el dializado. Cuando los protocolos experimentales incluyen la administración local de un agente farmacológico, el selector permite controlar el momento de esta perfusión.

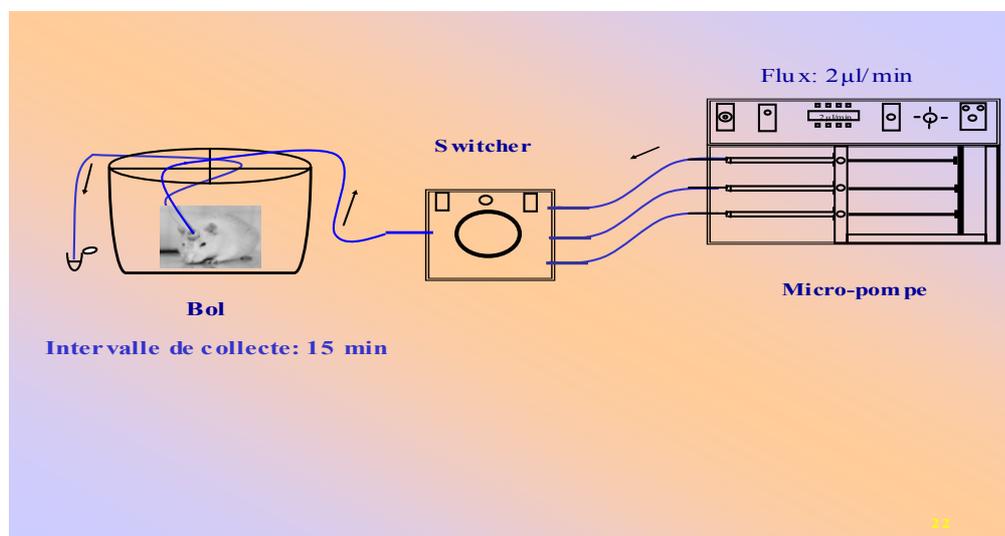


Figura 6: Sistema de microdiálisis

A lo largo de la experiencia, el LCRs circula a un flujo de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Experiencias preliminares nos permitieron comprobar que un equilibrio dinámico entre el líquido del espacio extracelular y el líquido que circula al interior de la sonda se instala 90 minutos después del inicio de la perfusión. Fracciones de 30 μl , se recogen cada 15 minutos y se inyectan directamente en el sistema cromatográfico o inmediatamente se congelan hasta su análisis.

Las cuatro primeras fracciones recogidas exactamente después del período para alcanzar el equilibrio corresponden a las fracciones control y nos permiten determinar el nivel extracelular básico medio del neurotransmisor o su metabolito.

III.5.3- Protocolo experimental

8 ratas se repartieron en dos grupos, el primer grupo sirvió de control y recibió una inyección intraventricular del LCRs; El segundo grupo se perfundió con el fármaco. Hay que señalar que los animales estaban en ayunas 24 horas antes de empezar el experimento, pero tenían libre acceso al agua.

Después del período de equilibrio y estabilización, se recuperan 4 dializados (30 μl en intervalos de 15 minutos) en el animal todavía en ayuno. La media de los cuatro primeros dializados representa el nivel básico de serotonina (5HT) y de su metabolito (5HIAA).

Después, el animal tiene libre acceso a la comida durante una hora en la que se recogen cuatro nuevos dializados, se retira a continuación la comida durante 30 minutos y se recoge otros dos dializados. Los efectos de la ingestión de alimentos y la infusión de las drogas se calculan con relación a este nivel básico.

La comida de nuevo se presenta al animal durante 180 minutos. Hay que subrayar que a principios de esta última fase, cada rata recibe una inyección central de 5 μl de LCRs (1 $\mu\text{l}/\text{min}$) (animales controles), de AM 251 o de WIN 55 (1 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ DMSO/NaCl 9%). La comida consumida se pesa al cabo de una hora, las dos horas y las tres horas después de las inyecciones centrales de la droga o del LCR en paralelo a la recuperación de los dializados. Así pues, la perfusión del animal dura las 8 horas. Al final de cada experimento, el número total de dializados recuperados por animal es de 22 que son directamente inyectados en el sistema cromatográfico o inmediatamente se congelan a -18°C hasta su análisis.

Para la estimación de la eficacia de diálisis de las sondas, se calcula el rendimiento de la sonda antes y al final del experimento, que corresponde al porcentaje de la concentración de una sustancia en el dializado y su concentración en el medio que rodea la sonda, así se

sumergen las sondas en una mezcla de soluciones normales de 5-HT y 5HIAA a concentraciones conocidas, y son perfundidas con el LCRs a un flujo de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ y a temperatura ambiente.

III.6- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

III.6.1- Sistema cromatográfico utilizado

El sistema cromatográfico utilizado en el presente estudio implica principalmente seis componentes: una bomba, un inyector, una precolumna, una columna cromatográfica, un detector electroquímico y finalmente un registrador o integrador que permite procesar y guardar los cromatogramas.

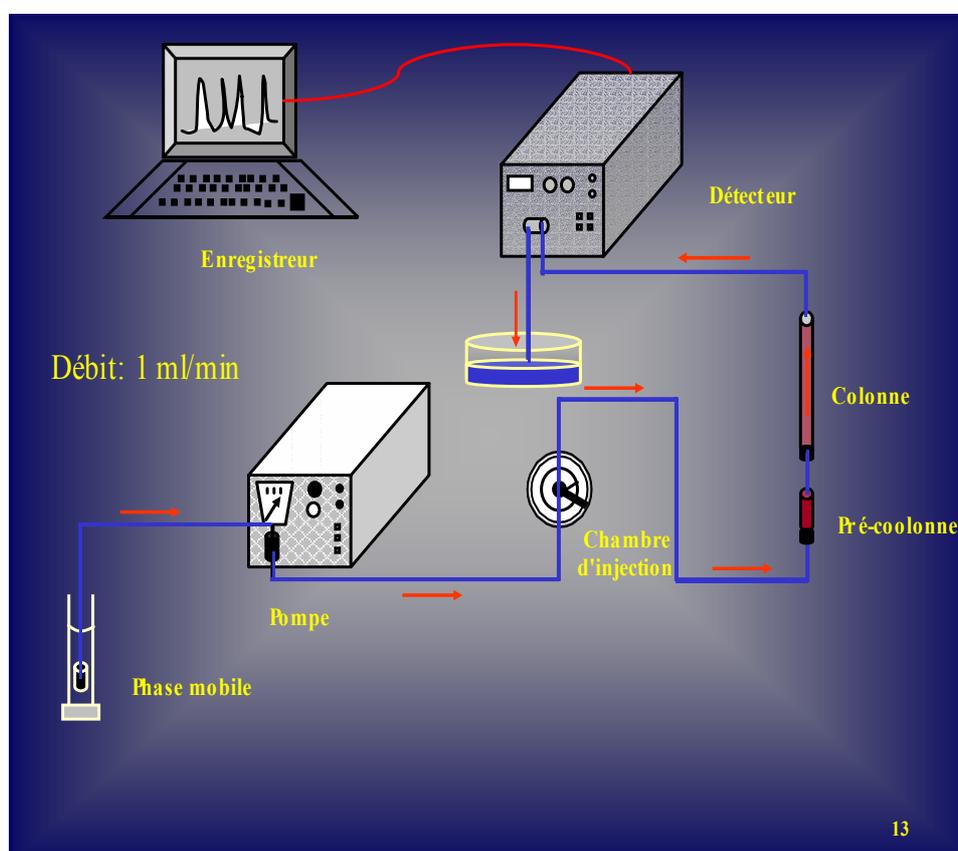


Figura 7: Sistema cromatográfico

a- Bomba

La bomba (**SHIMADZU LC-6A**) permite distribuir el solvente en modo isocrático con un flujo de pulsación mínimo. Esta bomba permite trabajar en método de flujo o presión constante. En nuestras experiencias la bomba se ajustó a un flujo de 1 ml/min.

b- Inyector

El inyector de muestras utilizado es manual, es una válvula **RHEODYNE 7125** con un cierre de 20 µl que utiliza jeringuillas modelo Hamilton con un ángulo derecho.

c- Precolumna

Se trata de una columna de guardia de pequeño tamaño (4 mm. de diámetro por 10 mm. de longitud) con las mismas características que la columna. Se sitúa antes de la columna y sirve de protección a ésta.

d- Columna

Es una columna analítica de tipo **C18 VARIAN** de fase invertida. Esta columna está formada por granos de sílice recubiertas por cadenas alifáticas de 18 carbonos, de ahí la denominación de columnas C18.

e- Detector electroquímico

Se trata de un detector amperométrico (**L-ECD-6A; SHIMADZU**, Japan) equipado de una célula de 4 µl vinculado a un electrodo en carbono vítreo mantenido a un potencial de 0.7 V con relación a un electrodo de referencia en Ag/AgCl. La corriente generada es producida por las reacciones de oxidación-reducción que se efectúan en la célula.

f- Integrador

El integrador utilizado es de tipo **SHIMADZU CR4A**; es un sistema de tratamiento de datos que incluyen una impresora gráfica que permite, previa petición, el trazado continuo de los cromatogramas sobre papel térmico.

III.6.2- Fase móvil

La fase móvil polar, contiene el contra ion (octil sulfato NH_3^+) que permite la separación de las aminas, al formar un par iónico con su función ionizada NH_3^+ .

En el detector las aminas se exponen a un campo eléctrico. Se oxidan las moléculas que contienen una agrupación hidróxilo móvil y los electrones perdidos por la molécula generan

una corriente eléctrica. La integración del pico de corriente registrado nos da la cantidad de amina.

La composición de la fase móvil que utilizamos en el presente trabajo es la siguiente:

- 0,05 M acetato sódico anhidro
- 0,05 M ácido cítrico
- 0,15 mM EDTA
- 0,4 mM octil sulfato
- 1,1 mM n-dibutilamina
- 8 % metanol

El pH de la fase móvil se lleva a 3.5 con ácido acético, se filtra la fase móvil al vacío a través de filtros de 0,22 μm (millipore) luego es desgasificada en un baño de ultrasonidos (Branson 2200, UK). Los productos utilizados son de calidad analítica o especial para HPLC. El agua utilizada es un agua bidestilada y desmineralizada.

III.6.3- Soluciones estándar

Las soluciones de referencia de 5HT y 5HIAA se preparan en la fase móvil o bien LCRs que contiene un antioxidante (el ácido ascórbico a una concentración de $5.6 \cdot 10^{-4}\text{M}$) y se almacenan a -18C° .

Algunos estándares externos de 25, 50, 100, y 500 $\text{pg}/20\mu\text{l}$ son preparados cada día por diluciones de las soluciones de referencia en la fase móvil e inyectados bien separadamente, lo que nos permite obtener curvas de calibración para cada compuesto, o inyectados en forma de una mezcla permitiendo comprobar diariamente el rendimiento del detector y la columna antes de la inyección de un dializado.

III.7- Técnica de inmunohistoquímica

a- Principio

Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular. La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares permite la localización microanatómica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio y proporcionando información adicional esencial en muchos casos.

La inmunohistoquímica se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una sustancia que se puede transformar

en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno. El complejo antígeno anticuerpo, mediante la utilización de alguna de las técnicas específicas (peroxidasa antiperoxidas, fluoresceína, etc) permite ser localizado e identificado dentro de la muestra a estudiar.

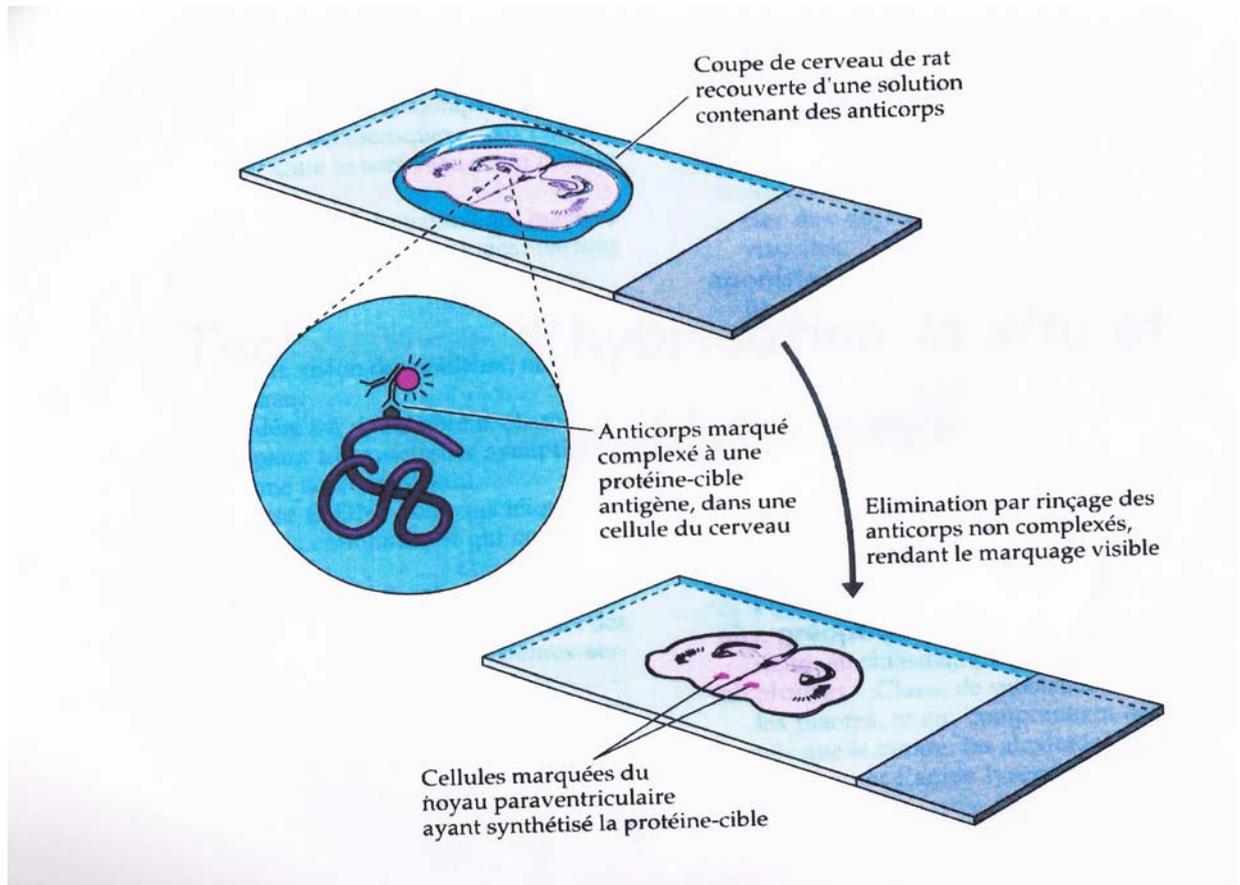


Figura 8: Técnica de inmunohistoquímica

b- Inyección estereotaxica de los animales

Todos los estudios se han realizado sobre ratones hembras de tipo C57BI/6, de peso de 25 gramos. Los ratones se anestesiaron con inyección intraperitoneal (i.p) de avertina (250mg/kg) luego se colocaron en un aparato estereotáxico. Después de la incisión de la piel, el hueso del cráneo se perfora y 2.5 μ l de los fármacos disueltos en el vehículo se inyectaron al nivel del tercer ventrículo según los datos estereotáxicos siguientes: AP: -0,94 mm, ML: 0,20 mm, DV: 1,80 mm. Estos datos se determinaron refiriéndose al punto Bregma.

c- Preparación del material histológico

90 minutos tras la inyección intracerebroventricular de los fármacos, los animales se sacrificaron por inyección de una dosis de hidrato de cloral 6%. Un catéter se colocó en el ventrículo izquierdo del corazón con el fin de perfundir los tejidos por vía intraaórtica. Se efectuó inicialmente un lavado por perfusión de 150 ml de cloruro de sodio (NaCl 9‰) con el fin de eliminar los eritrocitos de los vasos sanguíneos. Posteriormente, 200 ml de una solución de paraformaldehído al 1% se perfundió para garantizar la fijación de los tejidos. A continuación se sacrificaron los animales y se les extrajeron el cerebro.

Los cerebros se meten en una solución crioprotectora de sacarosa 30% a 4°C durante una noche. El día siguiente, los cerebros se colocan sobre la platina del microtomo, congelados en nieve carbónica y cortes frontales de un espesor de 40 µm se recogieron en una solución salina de tampón Tris (TBS 0.05M, pH 7.6) en 3 series para los distintos tratamientos inmunohistoquímicos.

d- Protocolo inmunohistoquímico

Todas las reacciones inmunohistoquímicas se efectuaron sobre cortes flotantes en una solución de TBS. Primero los cortes se lavaron en una solución de TBS (3×15min), luego la saturación de los sitios antigénicos no específicos se realizó con una solución de bloqueo (Bovine Serum Albumin 3%, Triton 0.3%, TBS) durante 1h30 a temperatura ambiente. Los cortes se pusieron en presencia del anticuerpo primario diluido en el suero de saturación (Bovine Serum Albumin 3%, Triton 0.3%, TBS) (1/3000^e; 2µl de anticuerpo en 6µl de BSA) durante una noche a 4°C. La identificación de las neuronas que expresan el NPY se revela con la ayuda del anticuerpo anti-NPY (fabricado en el conejo). El día siguiente, se efectuaron 3 nuevos lavados de 15 minutos antes de poner los cortes a incubar, durante 1h30 en temperatura ambiente, en presencia del anticuerpo secundario anti-conejo (anti-rabbit) acoplado a la biotina y diluido en el TBS (1/250^e). Los cortes se lavan 3 veces durante 15 minutos para eliminar el exceso del anticuerpo secundario antes de ponerse en presencia del complejo ABC acoplado al HRP (Avidin Biotin Complex, Horse Radish Peroxydase, 1/100^e, TBS). El principio es ampliar la señal utilizando la especificidad de la avidina para la biotina acoplada al anticuerpo secundario. Tras 3 lavados de 15 minutos, los cortes se pusieron en presencia de una solución de diaminobenzidina tetrahidroclorida 0,05 % (DAB) y agua oxigenada 0.01%.

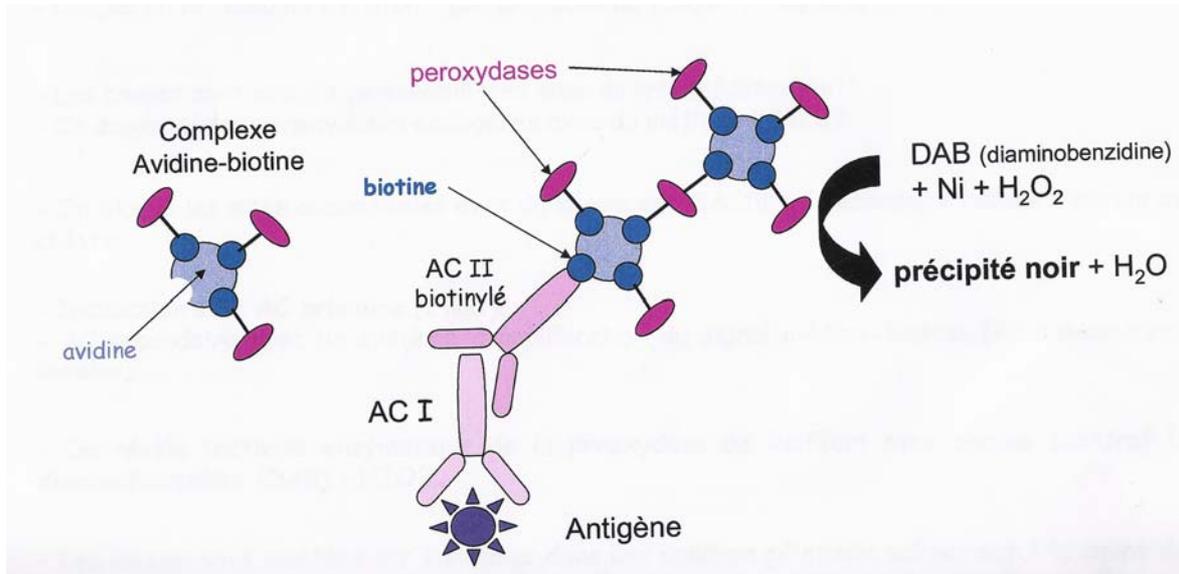


Figura 9: Protocolo inmunohistoquímico

e- Montaje de los cortes

Los cortes se situaron sobre cuchillas gelatinizadas según el orden rostro-caudal o medio lateral, y fueron cubiertas a continuación por una placa con ayuda del medio de montaje DePex. Las cuchillas se observaron por microscopio fotónico (Olympus BX60) y se cuantificaron las neuronas.

III.8- Diseño experimental para el estudio de la ingesta

III.8.1- Experimentos a corto plazo

III.8.1.1- Estudio de la ingesta en 24 horas

Para valorar los efectos de los fármacos cannabinoides sobre la conducta alimentaria se utilizó el modelo experimental siguiente:

Los estudios sobre control de ingesta se realizaron en animales presaciados (24h de ayunas, una hora con acceso libre a la comida antes de administrar el fármaco) (Williams et al., 1998).

Los animales se alojaron en jaulas individuales de metabolismo durante un periodo de adaptación, al fotoperíodo y condiciones experimentales, de 10 días o más, posteriormente se registró el peso de las ratas (peso inicial) al principio del experimento, iniciándose el periodo de 24h de ayunas con acceso *ad libitum* al agua, tras este periodo de ayuno se registró de nuevo el peso de los animales (peso tras ayuno 24h). En este momento se les permitió comer y beber durante una hora y se registró la cantidad de bebida y de comida ingerida. Se inyectó a los animales el fármaco objeto de estudio y de nuevo se les dejó acceso libre a la comida,

registrándose las cantidades consumidas después de 1 hora, 2, 4, 6 y 24 horas. Al final del experimento se registró de nuevo el peso de los animales (peso final).

a- Diseño experimental

DIA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
PA	Red												
PE											Green		
AY											Orange		
CP											Yellow		
CI												Blue	

-  **PA: PERIODO DE ADAPTACIÓN.**
-  **PE: PERIODO EXPERIMENTAL**
-  **AY: 24H DE AYUNO**
-  **CP: CONTROL DE PESO DE LAS RATAS.**
-  **CI: CONTROL DE INGESTA**

III.8.1.2- Experimentación sobre el control motor (open field)

Los animales destinados al estudio de la actividad motora, se distribuyeron en dos grupos: uno control y otro que recibió la administración periférica del WIN 55,212 (5mg/kg).

Antes de la inyección, se adaptaron los animales a la habitación donde se realizó la experimentación durante 10 minutos. Exactamente tras la inyección, se colocaron en campo abierto (open field) que consiste en una caja transparente de plástico que tiene las dimensiones siguientes: anchura 45cm, longitud 30 cm., altura 23 cm. La caja se divide por una línea en dos compartimentos iguales.

La actividad locomotora se midió durante 60 minutos. Cada 10 minutos se contabilizaron el número de crossing (el número de veces que el animal cruza la línea que separa los dos compartimentos de la caja) y rearing (el número de veces que el animal se pone de pie para explorar el medio ambiente).

III.8.2 Experimentos a largo plazo en 10 días

III.8.2.1 Estudio de la utilización digestiva y metabólica

Para valorar el aprovechamiento nutritivo de una dieta hay que hacer una serie de grupos experimentales, generalmente ratas, de la misma raza, sexo y peso aproximado.

Un grupo se utiliza como control, sirve de referencia, para comparar frente a el los resultados obtenidos en el resto de los grupos en los que se realiza una intervención dietética y/o farmacológica.

Durante el periodo experimental las ratas se alojaron en jaulas individuales de metabolismo, que permiten un perfecto control y separación de comida, heces y orina. A su vez estas jaulas están situadas en una cámara termostregulada a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, convenientemente ventilada y con fotoperiodo controlado de 12 horas. La dieta fue ingerida por los animales ad libitum, al igual que el agua bidestilada debido al estudio del balance mineral de los animales.

Diagrama 1: Diseño de las experiencias

DIA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
PA	Red																				
PE											Green										
CP											Yellow										
CL											Blue										
C													Orange		Orange		Orange		Orange		

-  PA: PERIODO DE ADAPTACIÓN.
-  PE: PERIODO EXPERIMENTAL
-  CP: CONTROL DE PESO DE LAS RATAS.
-  CI: CONTROL DE INGESTA
-  C: RECOLECCIÓN DE HECES Y ORINA

El periodo experimental es de 20 días de duración. De los cuales los 10 primeros días corresponden al periodo de adaptación a la dieta y a las condiciones experimentales, y los 10 días siguientes constituyen el periodo principal en el que se recogen por separado heces y orina, para su posterior análisis, controlándose durante este período la ingesta de sólidos y líquidos y el peso corporal (Diagrama 1).

Las heces homogeneizadas, se conservaron congeladas a -20°C en bolsas de plástico y la orina, acidificada, ya que se recoge sobre agua bidestilada + ácido clorhídrico al 35%, se llevó a volumen conocido y se almacenó en cámara fría a temperatura de 4°C .

Al final de los mismos se sacrificaron los animales y se extrajo sangre y los órganos que posteriormente iban a ser analizados.

Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las directivas comunitarias concernientes al alojamiento y cuidado de los animales de laboratorio y las recomendaciones sobre idoneidad de procedimientos de experimentación animal del Comité Ético de la Universidad de Granada.

III.9- Técnicas analíticas

Los métodos analíticos utilizados son los siguientes:

III.9.1- Humedad (materia seca)

Se realizó por desecación en estufa a $105 \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante.

Se determinó en dieta y heces

III.9.2- Proteína

Determinación de Nitrógeno: Por el método de Kjeldhal, usando como catalizador aproximadamente 5 gramos de mezcla: Sulfato potásico (100 partes), Sulfato cúprico (6 partes) y Selenio (1 parte). Se utilizó el factor 6.25 para la conversión del nitrógeno en proteína.

Se determinó en dieta, heces y orina.

III.9.3- Minerales totales

Se obtienen por calcinación de una parte de la muestra en horno a 450°C , hasta su perfecta calcinación, el residuo se diluyó con solución de ácido clorhídrico 6N y se enrasó con agua bidestilada a un volumen determinado, para posterior análisis.

Se midieron en dieta, heces y sangre.

III.9.3.1- Calcio, Magnesio y Cinc

Las concentraciones de calcio, magnesio y cinc de la dieta, orina y sangre, se determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica, utilizando un espectrofotómetro PERKIN-ELMER 100B (Perkin-Elmner, Norwalk, CT, USA), con llama de gas acetileno y usando una longitud de onda de 422.8 nm para el calcio, 285 nm para Mg, y 213.9 para Zn. A las muestras de calcio y magnesio se añadió Cloruro de lantano hasta una concentración final de 0.1 a 1%, para prevenir la formación de compuestos entre el fósforo y el calcio o el magnesio. Las muestras de cinc se diluyeron con agua bidestilada. Para la realización de la Curva de calibrado se utilizaron Soluciones Patrón Comerciales (Merck, Panreac Química). Los resultados analíticos de magnesio y cinc se validaron utilizando un estándar de referencia de harina de Trigo (# CRM-189, Community Bureau of Referente. Comisión of the European Communities).

III.9.3.2- Fósforo inorgánico

Las concentraciones de fósforo en la dieta, heces, orina, sangre y plasma, se determinaron por espectrofotometría visible mediante la técnica colorimétrica de Chen y col (1956), realizada a partir de las muestras de dieta, heces y sangre ya calcinadas y disueltas en CIH 6N y orina y plasma que se miden sin previo tratamiento.

III.10- Parámetros e índices biológicos utilizados

- Ganancia de peso
- Ingesta de alimento
- Excreción fecal y urinaria de nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio así como excreción fecal de cinc.
- Determinación de la composición química de plasma, sangre y órganos extraídos al animal de la experimentación.

Para valorar el crecimiento de los animales, se calcularon los siguientes índices biológicos según lo descrito por Urbano y colaboradores (2005):

- **Coefficiente de Eficacia en Crecimiento (C.E.C):** Expresa la ganancia de peso de los animales en gramos, por gramo de proteína ingerida.

$$\text{C.E.C} = \frac{\text{Ganancia de peso}}{\text{g proteína ingeridos}}$$

- **Coefficiente de Digestibilidad Aparente (C.D.A):** Es la relación porcentual entre la cantidad absorbida de la ingerida, sin tener en cuenta las pérdidas endógenas. Se utiliza para valorar el aprovechamiento digestivo de la proteína.

$$\text{C.D.A} = \frac{\text{I-F}}{\text{I}} \times 100$$

- **Balance o Retención:** Se determina por diferencia entre el absorbido y el urinario. Se utiliza para valorar el aprovechamiento metabólico.

$$\text{Balance} = \text{I} - (\text{F} + \text{U})$$

- **R/A (%):** Expresa el tanto por ciento de la cantidad retenida de la absorbida. La cantidad retenida se determina por diferencia entre la cantidad absorbida y la excretada por orina. Se utiliza para valorar el aprovechamiento metabólico.

$$\text{R/A} = \frac{\text{I} - (\text{F} + \text{U})}{\text{I} - \text{F}} \times 100$$

I: Ingerido

F: Excreción fecal

U: Excreción urinaria

III.11- Tratamiento estadístico

Para cada parámetro estudiado se ha calculado el valor medio y el error estándar de la media (EEM). Se aplicó a los datos el Análisis de la Varianza de Una Vía (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics, Statistical Graphics System 2.1 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA). Posteriormente al análisis de la varianza, si este era significativo se estudió el grado de significación de las diferencias entre los parámetros e índices utilizados mediante test de Duncan para $P < 0.05$.

IV. RESULTADOS

En este trabajo, hemos podido caracterizar las acciones de fármacos activos en receptores cannabinoides (WIN 55,212-2 y AM 251), mediante inyecciones central y periférica, sobre la ingesta de sólidos y líquidos, sobre la concentración extracelular en el hipotálamo de la serotonina y de su metabolito y la inmunexpresión de neuropeptido Y. También se ha estudiado la influencia de estos fármacos sobre la utilización digestiva y metabólica de la proteína y de los minerales: calcio, fósforo, magnesio y cinc.

Las tablas (1-15) correspondientes a las gráficas que se incluyen a continuación figuran en las páginas 173-179.

IV.1 Efecto de la administración intracerebroventricular del agonista y del antagonista/agonista inverso de los receptores cannabinoides

La administración del agonista de los receptores cannabinoides, el WIN 55.212-2 (1 μ g/5 μ l), en el tercer ventrículo estimula la ingesta de alimento y provoca una hiperfagia (Figura 1 y Tabla1) con respecto al grupo control de ratas inyectadas con el vehículo (60% DMSO: 40% NaCl 9 %). Este efecto estimulador es máximo 24 horas tras la inyección del WIN 55,212-2 respecto al control (18.98 \pm 3.27 y 7.23 \pm 0.99 g/100g peso rata, respectivamente; p<0.05).

Al contrario la administración central del agonista inverso de los receptores CB₁, el AM 251 (0.1 μ g/5 μ l), en ratas presaciadas provoca una disminución significativa de la ingesta (Tabla 1, Figura 1) con respecto al grupo control (2.99 \pm 0.51 y 7.23 \pm 0.99 g/100g peso rata, respectivamente; p<0.05). La disminución tras 24 horas es de 41%, (p<0.05).

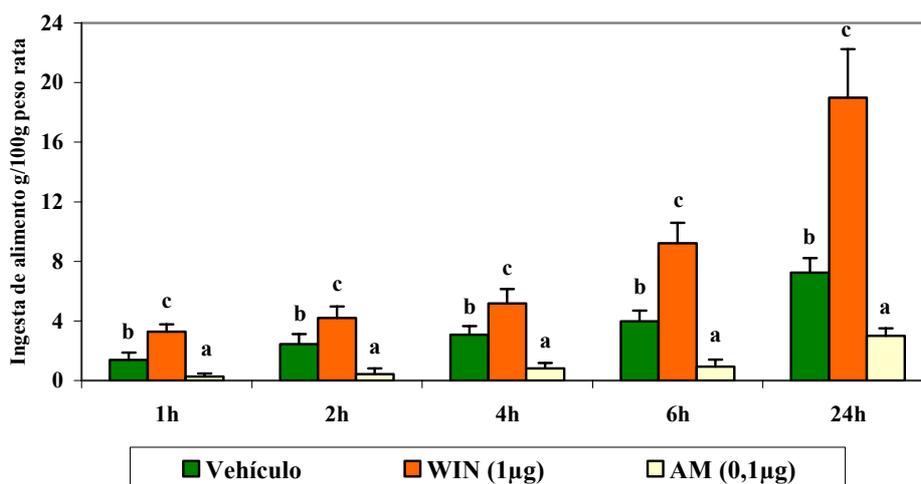


Figura 1: Cambios en la ingesta de alimentos en respuesta a la administración intracerebroventricular de WIN 55,212-2 y AM 251 sobre la ingesta en ratas presaciadas. Los resultados se expresan en gramos de comida ingerida por 100 gramos de peso de rata \pm EEM (n=10). Letras iguales indican que no existen diferencias significativas (p< 0,05).

IV.2 Efecto de la administración periférica a corto plazo (inyección aguda)

IV.2.1 Ingesta de sólidos

En nuestras condiciones experimentales, la administración periférica de WIN 55.212-2 estimula la ingesta de alimento y provoca una hiperfagia con respecto al grupo control (Figura 2 y Tabla 2):

- La inyección de la dosis 0.5 mg/kg tiene un efecto ligero aumentando la ingesta de alimento que es estadísticamente significativo 1 hora tras la inyección en comparación al control (1.03 ± 0.29 y 0.11 ± 0.06 g/100g peso rata, respectivamente; $p < 0.05$), siendo el efecto más atenuado posteriormente (Figura 2).

- La inyección de una dosis de 1 mg/kg y de 2mg/kg aumenta la ingesta de alimento y promueve una hiperfagia significativa desde 1 hora hasta 6 horas tras la inyección (1h tras la inyección, control: 0.11 ± 0.06 ; 1mg/kg: 1.12 ± 0.17 ; 2mg/kg: 1.30 ± 0.15 , mientras tras 6 horas, control: 2.95 ± 0.24 ; 1mg/kg: 4.58 ± 0.33 ; 2mg/kg: 4 ± 0.33 g/100g peso rata). A las 24 horas no se observa ningún efecto significativo con respecto al control (10.57 ± 0.36 ; 9.43 ± 0.36 ; 10.11 ± 0.3 g/100g peso rata), respectivamente.

- A dosis elevadas, 5mg/kg se observa una reacción contraria, una disminución significativa de la ingesta de alimento a partir de 2h tras la inyección y se mantiene hasta 24h tras la inyección, aunque se observa una tendencia a la recuperación de los niveles de la ingesta (2h tras la inyección, control: 0.62 ± 0.11 ; 5mg/kg: 0.18 ± 0.11 ; 6h tras la inyección, control: 2.95 ± 0.24 ; 5mg/kg: 1.63 ± 0.27 g/100g peso rata) (Figura 2).

Se observa que la inyección periférica aguda de AM 251 a diferentes dosis de 1, 2 y 5mg/kg en ratas presaciadas provoca una disminución significativa de la ingesta de alimentos con respecto al grupo control de ratas inyectadas con el vehículo (Figura 3 y Tabla 3):

La inyección de AM 251 a todas las dosis ensayadas disminuye significativamente la ingesta a partir de 2h de la inyección, las ratas inyectadas no ingieren alimento prácticamente en 1h tras la inyección ya que no existen diferencias significativas a ninguna dosis ensayadas (2h tras la inyección, control: 1.2 ± 0.18 ; 0.5mg/kg: 0.28 ± 0.21 ; 1mg/kg: 0.14 ± 0.09 ; 2mg/kg: 0.36 ± 0.15 ; 5mg/kg: 0 g/100g peso rata). No hay relación dosis efecto entre 0.5, 1 y 2mg/kg en la hipofagia observada a partir de las 2h.

El efecto más agudo es el que se consigue a dosis de 5mg y se obtiene desde 2h tras la inyección (24h tras la inyección control: 11.91 ± 0.2 ; 0.5 mg/kg: 10.33 ± 0.46 ; 1 mg/kg: 9.29 ± 0.2 ; 2mg/kg: 9.03 ± 0.29 ; 5 mg/kg: 7.65 ± 0.14 g/100g peso rata). (Figura 3).

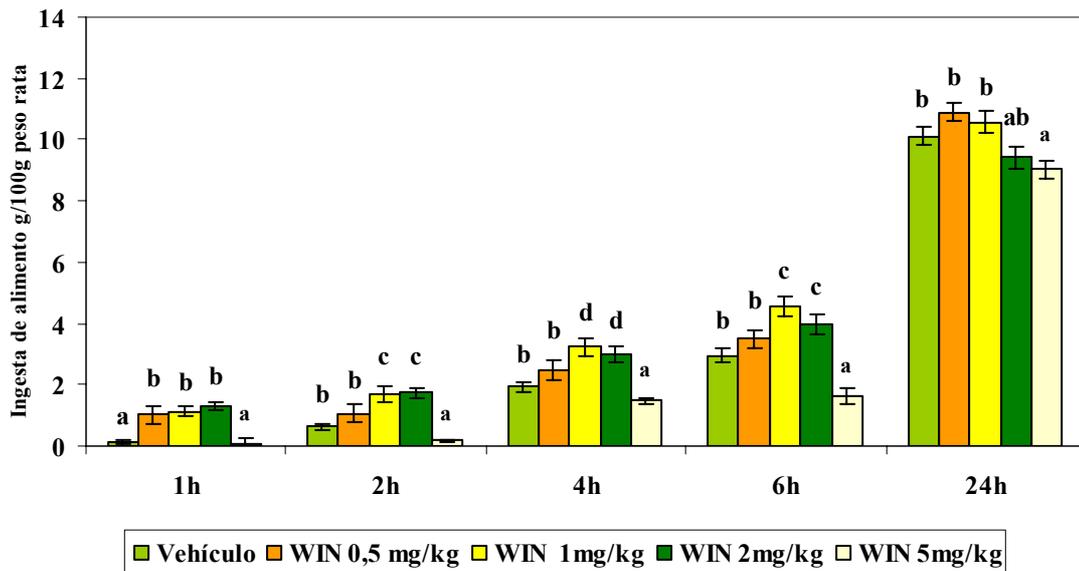


Figura 2: Cambios en la ingesta de alimentos en respuesta a la inyección intraperitoneal aguda de distintas dosis de WIN 55,212-2 en ratas presaciadas. Los resultados se expresan en gramos de comida ingerida por 100 gramos de peso de rata \pm EEM (n=10). Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

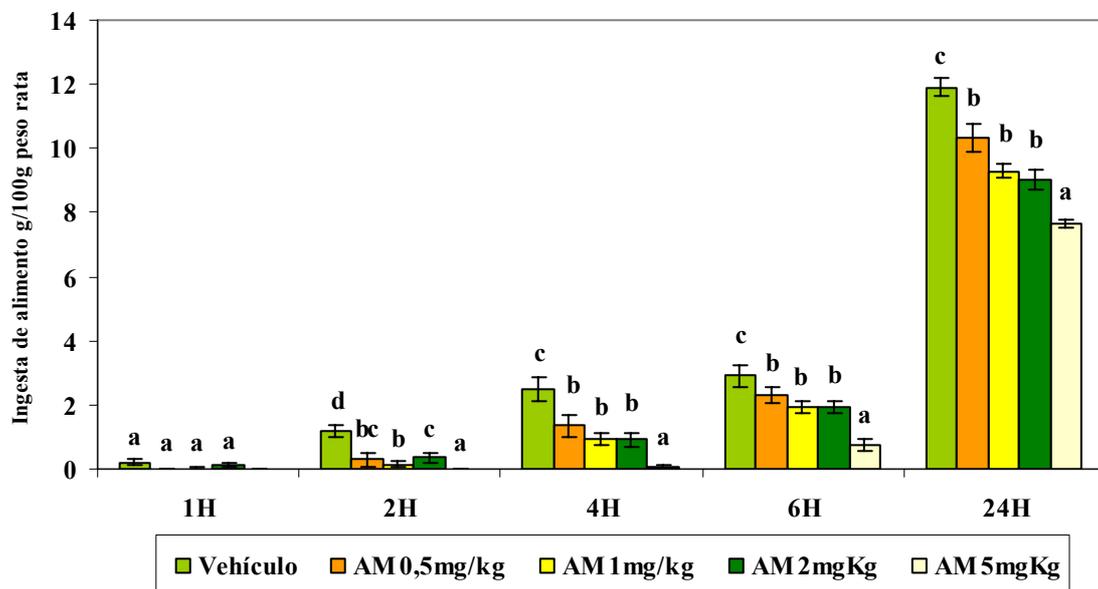


Figura 3: Cambios en la ingesta de alimentos en respuesta a la inyección intraperitoneal aguda de distintas dosis de AM 251 en ratas presaciadas. Los resultados se expresan en gramos de comida ingerida por 100 gramos de peso de la rata \pm EEM (n=10). Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.2.2 Ingesta de líquidos

Con respecto a la ingesta de agua por parte de los animales inyectados con WIN 55,212-2, no parece estar claramente relacionada con la ingesta de alimento excepto la primera hora tras la inyección en la que sí se observa una correlación ($R= 0.59$) entre estos dos parámetros (Figura 4): A dosis de 1 y 2 mg/kg, 1h tras la inyección la ingesta de líquido es significativamente mayor al igual que ocurre con la ingesta de alimentos (control: 1.05 ± 0.11 ; 1mg/kg: 1.94 ± 0.3 ; 2mg/kg: 1.68 ± 0.29 g/100g peso rata), mientras que a dosis de 5mg la ingesta de líquido es menor respecto al control (0.23 ± 0.07 y 1.05 ± 0.11 g/100g peso rata, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 4 y Tabla 4). Después de la primera hora no hay diferencias apreciables.

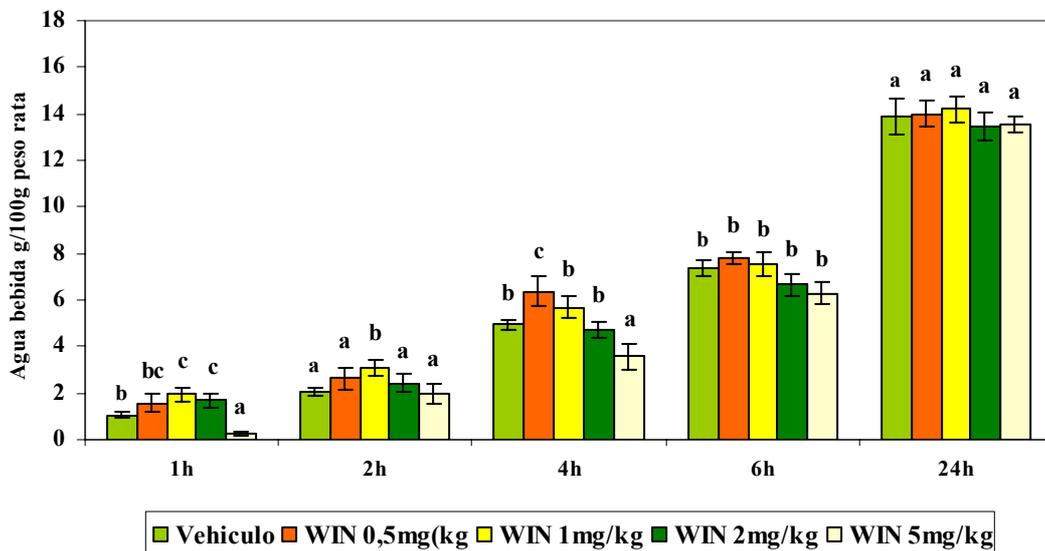


Figura 4: Cambios en la ingesta de agua en respuesta a la inyección intraperitoneal aguda de distintas dosis de WIN 55,212-2 en ratas presaciadas. Los resultados se expresan en gramos de comida ingerida por 100 gramos de peso de la rata \pm EEM (n=10). Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

La administración periférica aguda de las dosis ensayadas de AM 251 provoca también una disminución significativa de la ingesta de agua. Al igual que ocurre con la ingesta de alimento, el efecto más agudo se obtiene también con la dosis 5mg (tras 2h, control: 3.32 ± 0.3 ; 0.5mg/kg: 2.31 ± 0.12 ; 1mg/kg: 1.54 ± 0.3 ; 2mg/kg: 2.73 ± 0.29 ; 5mg/kg: 2.17 ± 0.28 g/100g peso rata). El efecto más agudo es el que se consigue a dosis de 5mg y se obtiene desde la 2h tras la inyección (24h tras la inyección, control: 18.03 ± 0.47 ; 0.5 mg/kg: 16.66 ± 0.24 ; 1 mg/kg: 15.52 ± 0.48 ; 2mg/kg: 16.58 ± 0.52 ; 5 mg/kg: 13.63 ± 0.52 g/100 peso rata) Existe, por lo tanto, una correlación entre la ingesta de alimento y la ingesta de agua en 2h ($R= 0.56$), 4h ($R=0.59$) y en 24h ($R=0.49$) posteriores a la inyección (Figura 5 y Tabla 5).

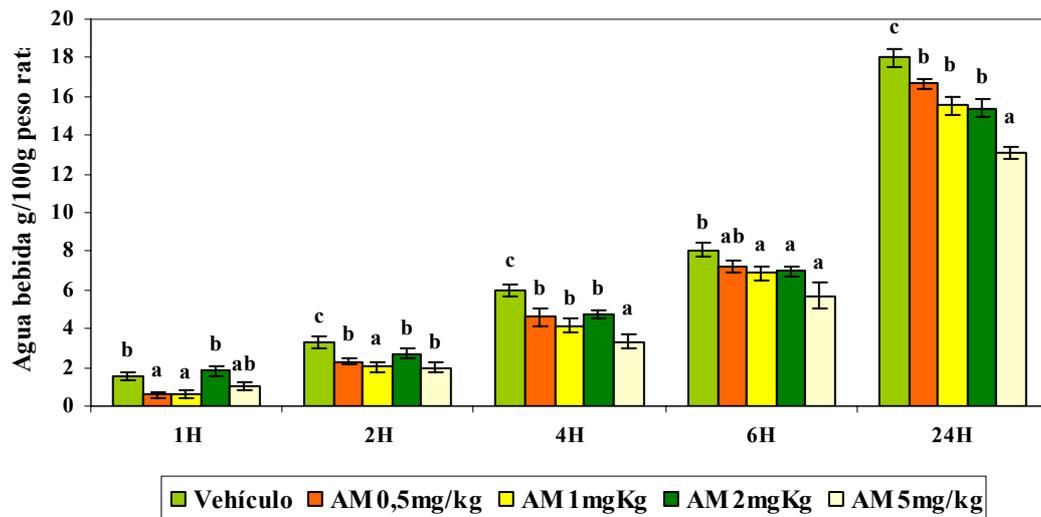


Figura 5: Cambios en la ingesta de agua en respuesta a la inyección intraperitoneal aguda de distintas dosis de AM 251 en ratas presaciadas. Los resultados se expresan en gramo de comida ingerida por 100 gramo de peso de la rata \pm EEM (n=10). Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.2.3 Efecto de la administración periférica de WIN 55,212-2 sobre la actividad locomotora y la exploratoria: Open field

La administración periférica de WIN 55.212-2 a dosis de 5mg/kg produce una reducción significativa de la actividad locomotora y la actividad exploratoria con respecto al grupo control (Tabla 6 y Figura 6).

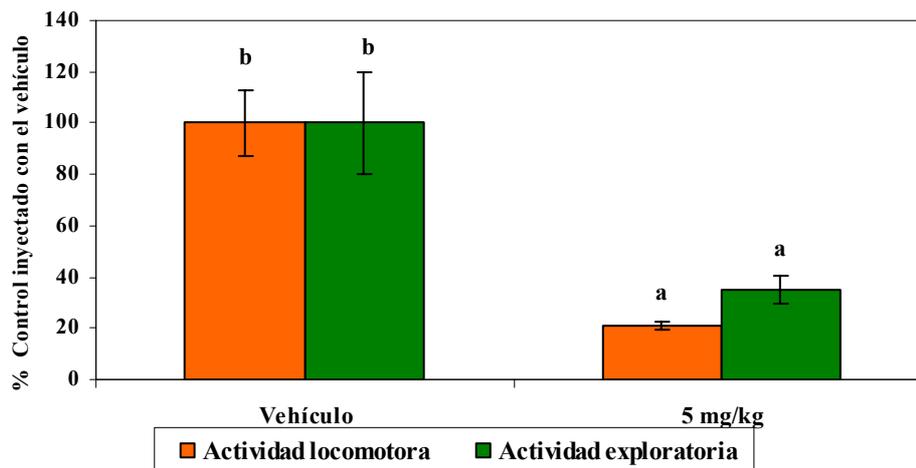


Figura 6: Efecto de la administración periférica de WIN 55,212-2 sobre la actividad locomotora y la actividad exploratoria en ratas. Los datos de las actividades exploratorias y locomotoras fueron recogidos durante 60 minutos cada 5 minutos en un campo abierto (open field) $1m^2$. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.3 Efecto de los cannabinoides sobre la liberación de la serotonina y su metabolito y la inmunexpresion de neuropéptido Y

IV.3.1 Serotonina (5-HT)

El efecto de la administración intracerebroventricular (icv) de WIN 55,212-2 y AM 251 sobre los niveles extracelulares de 5-HT se muestran en la figura 15. Se observa que los niveles de serotonina se encremetan progresivamente después del inicio de la ingesta en animales privados de comida durante 24 horas comparando con los valores basales en los tres grupos experimentales. En el grupo inyectado con el vehículo la serotonina se mantiene elevada hasta 270 min, en que vuelve a los valores basales. Se observó que la administración de WIN 55,212-2 disminuye significativamente los niveles de serotonina hasta 270 min en relación al control. Entre la inyección del fármaco y 270 min la disminución media observada es de 38.1 %.

Mientras La administración de AM 251 produce un incremento significativo de los niveles de 5-HT en relación al control inmediatamente después de la inyección, observándose una tendencia a recuperar los valores basales más lentamente que con el WIN 55,212-2, en el min 330 los valores de serotonina siguen siendo más altos que los basales. Entre la inyección del fármaco y 270 min el aumento medio observado es de 35.9 % (Figura 7; Tabla 7).

IV.3.2 Metabolito de la serotonina (5HIAA)

Resultados similares a los de la serotonina se obtienen tras el estudio del efecto de la administración icv de WIN 55,212-2 y AM 251 sobre los niveles extracelulares de 5HIAA (Figura 8 y Tabla 8): los niveles basales de 5HIAA aumentaron aproximadamente 45 min después de permitir libre acceso a la comida a los animales (105 min) comparando con los valores basales en los tres grupos experimentales. Cuando se inyectó el WIN 55,212-2 hubo una fuerte reducción de los niveles extracelulares del metabolito 5HIAA, que ocurrió rápidamente (min 165) igualándose de nuevo a los basales y persistió a lo largo del tiempo de experimentación. Hasta el minuto 240 los valores fueron menores que en el grupo control. Entre la inyección del fármaco y 270 min la disminución media observada fue del 46.8%. Tras la inyección de AM 251 se produjo un drástico aumento de 5HIAA en comparación con los niveles basales y con el vehículo y a continuación experimenta un fuerte descenso hasta igualarse al vehículo y alcanzar los valores basales. El aumento medio es del 57.6 % (Figura 8; Tabla 8).

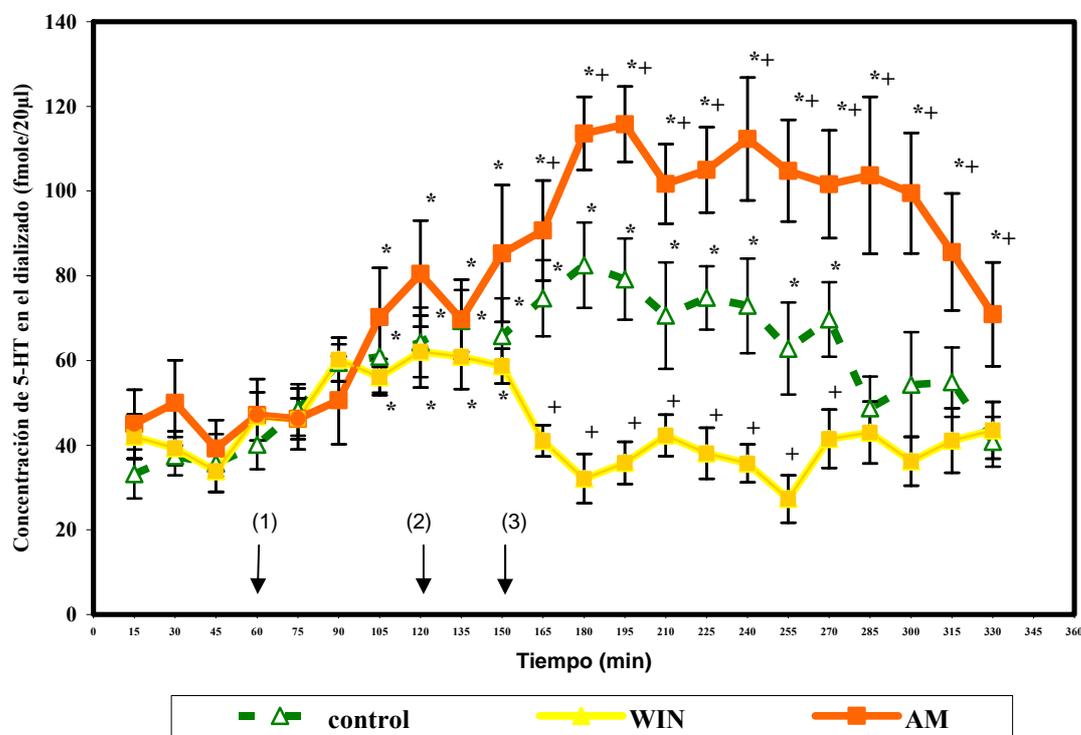


Figura 7: Efecto de la administración cerebroventricular de WIN 55,212 y AM 251 sobre la liberación de la serotonina (5-HT) en el hipotálamo ventromedial de las ratas presaciadas. La flecha vertical (1) indica la hora de la presentación de la comida, (2) la supresión de la comida y (3) la presentación de la comida y de la inyección del fármaco o del vehículo, Cada punto de referencias representa el valor medio \pm SEM de 10-14 ratas.

* Indica diferencias significativas entre los valores basales y cada grupo experimental ($p < 0,05$)

.+ Indica diferencias significativas entre cada grupo inyectado con el fármaco y el vehículo ($p < 0,05$).

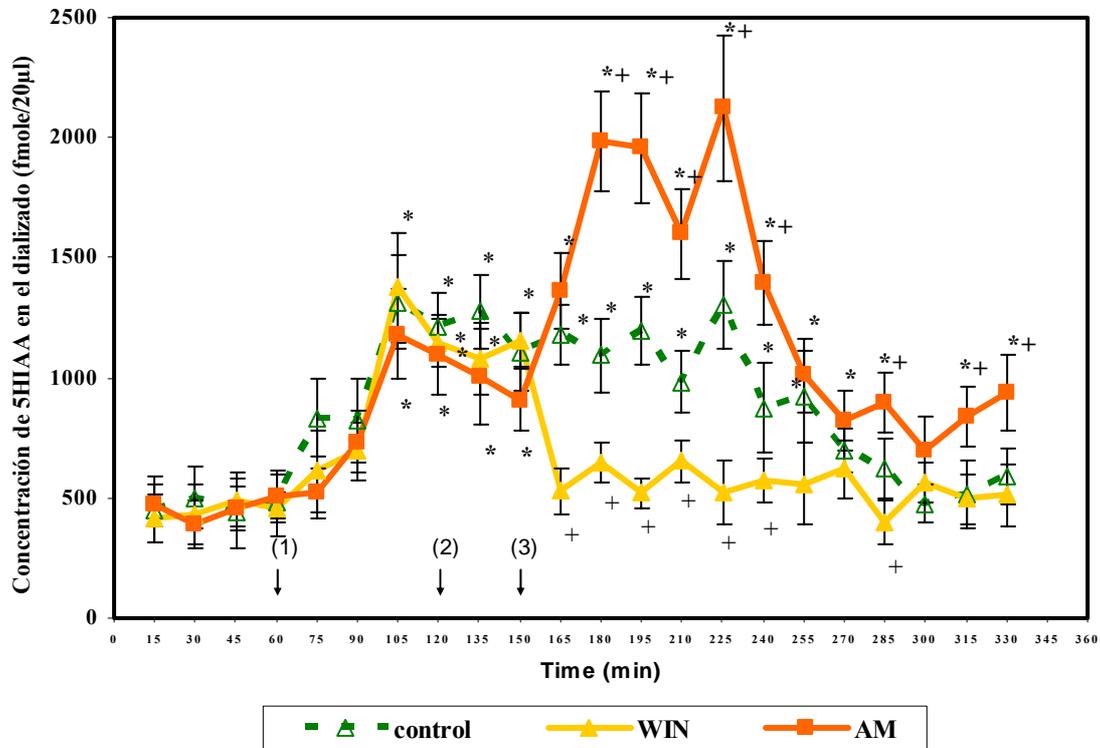


Figura 8: Efecto de la administración cerebroventricular de WIN 55,212 y AM 251 sobre la liberación del metabolito de la serotonina (5HIAA) en el hipotálamo ventromedial de las ratas presaciadas. La flecha vertical **(1)** indica la hora de la presentación de la comida, **(2)** la supresión de la comida y **(3)** la presentación de la comida y de la inyección del fármaco o del vehículo, Cada punto de referencias representa el valor medio \pm SEM de 10-14 ratas.

* indica diferencias significativas entre los valores basales y cada grupo experimental ($p < 0,05$).

+ indica diferencias significativas entre cada grupo inyectado con el fármaco y el vehículo ($p < 0,05$).

IV.3.3 Neuropeptido Y

Para determinar las posibles interacciones entre el sistema cannabinoide y una serie de neuropeptidos hipotalámicos, como el NPY, neuropeptidos conocidos por su implicación en la regulación del apetito y la saciedad, hemos estudiado el efecto de la administración intracerebroventricular del agonista WIN 55,212 y el agonista inverso el AM 251 sobre la inmunoexpresión del NPY mediante la técnica de inmunohistoquímica.

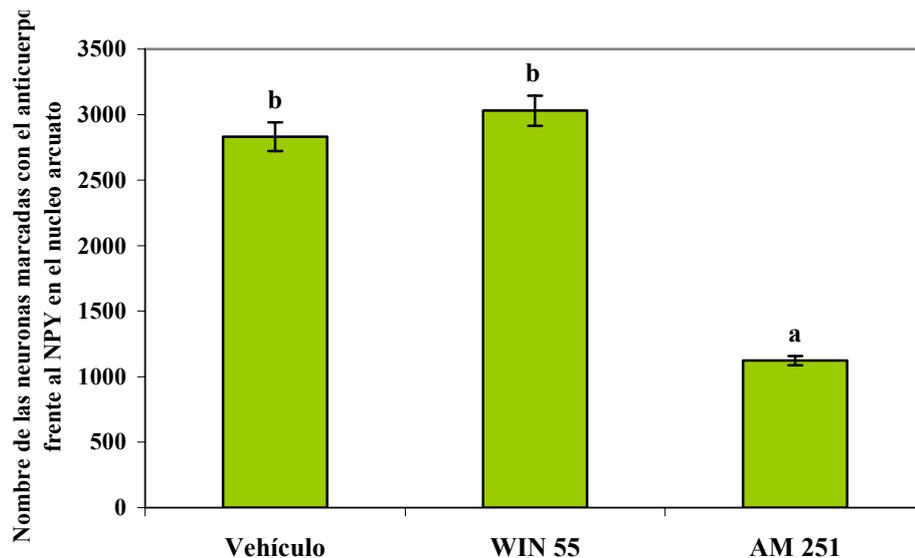
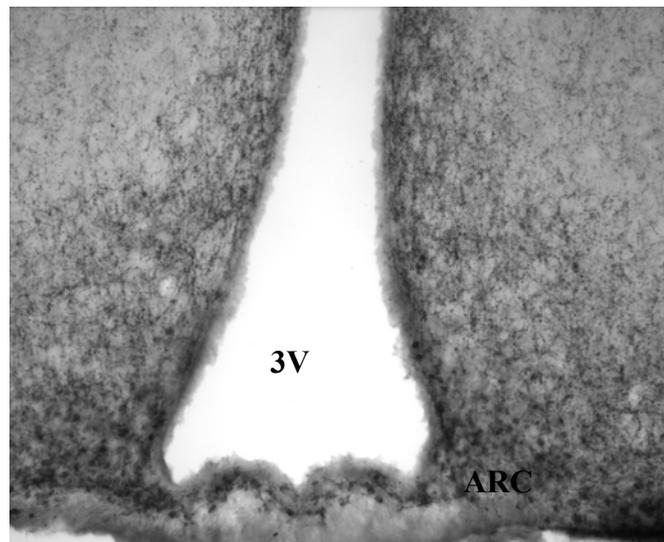


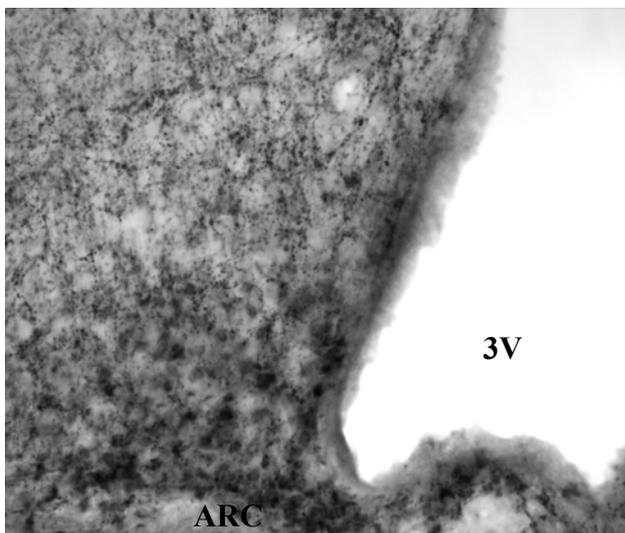
Figura 9: Cambios en el número de las neuronas marcadas con el anticuerpo anti NPY en el núcleo arcuato en respuesta a la inyección intracerebroventricular de AM 251 y WIN 55,212-2. Sumatorio de los valores obtenidos en 4 ratones. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

La cuantificación de las neuronas marcadas con el anticuerpo anti NPY en el núcleo arcuato demostró que la inyección intracerebroventricular de AM 251 produjo una disminución significativa del número de estas neuronas en comparación con el vehículo, mientras se observó un aumento no significativo al inyectar el agonista WIN 55,212-2 (Figura 9; Tabla 9).

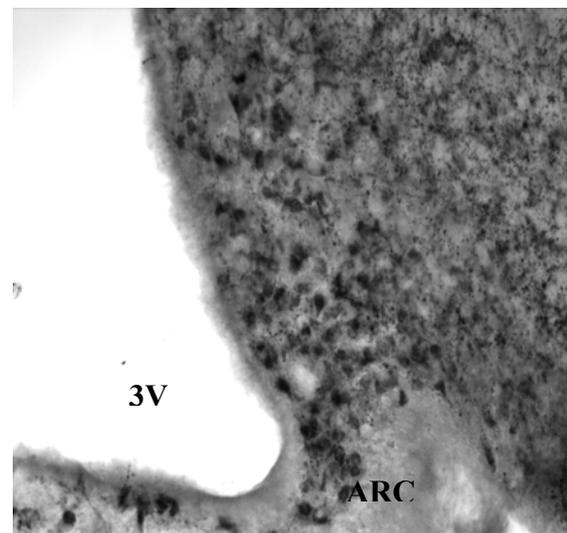
Figura 9 A: Cambios en el número y distribución de las neuronas marcadas con el anticuerpo anti NPY como consecuencia de la inyección icv del agonista de los receptores cannabinoides, el WIN 55,212-2. Las 2 figuras inferiores muestran un mayor grado de amplificación (40×) de la figura superior (20×). Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes. 3V: Tercer ventrículo; ARC: el núcleo arcuato.



(20×)



(40×)



(40×)

Figura 9 B: Cambios en el número y distribución de las neuronas marcadas con el anticuerpo anti NPY como consecuencia de la inyección icv del agonista inverso de los receptores cannabinoides, el AM 251. Las 2 figuras inferiores muestran un mayor grado de amplificación (40×) de la figura superior (20×). Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes.

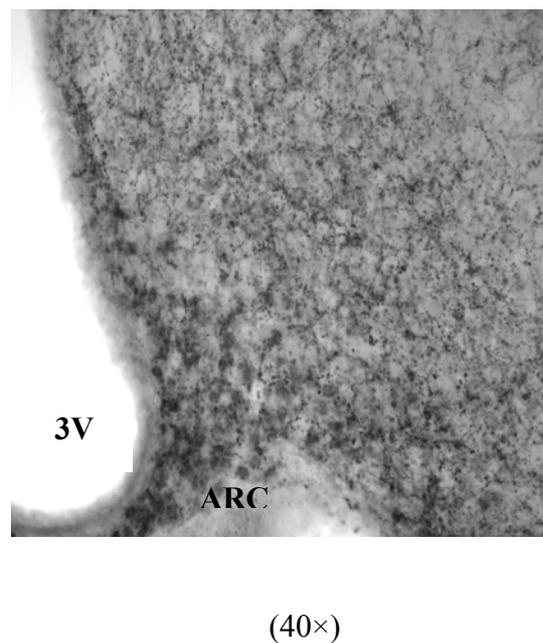
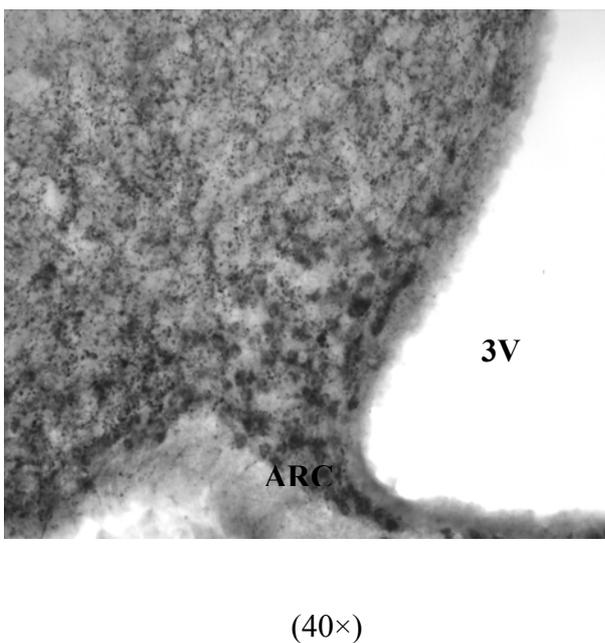
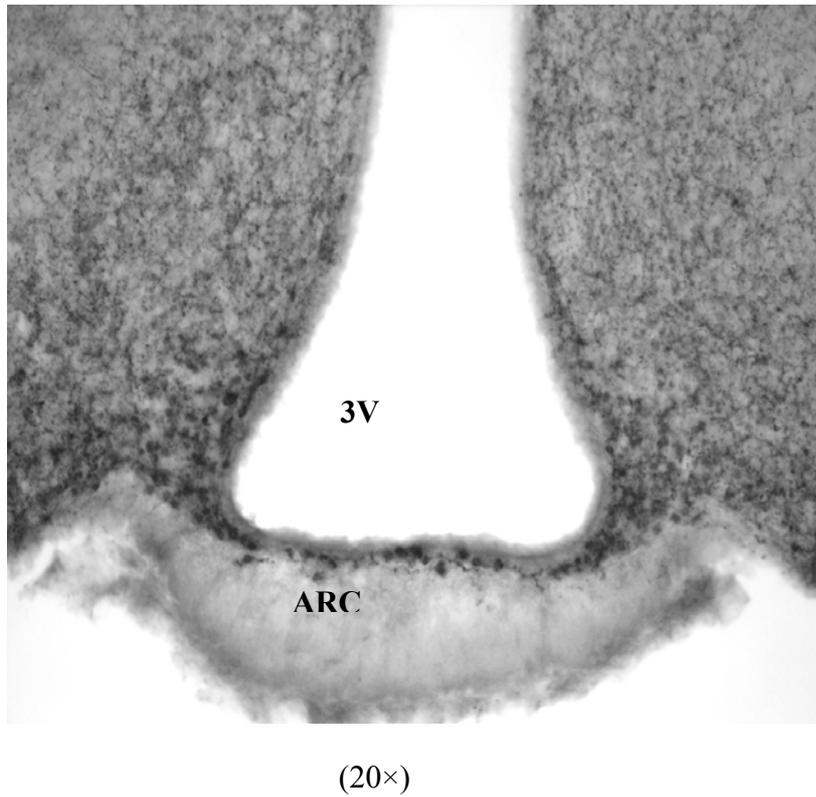
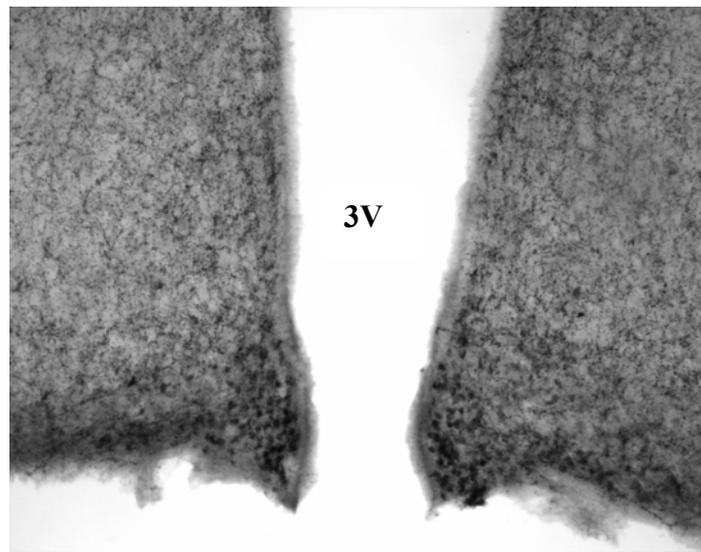
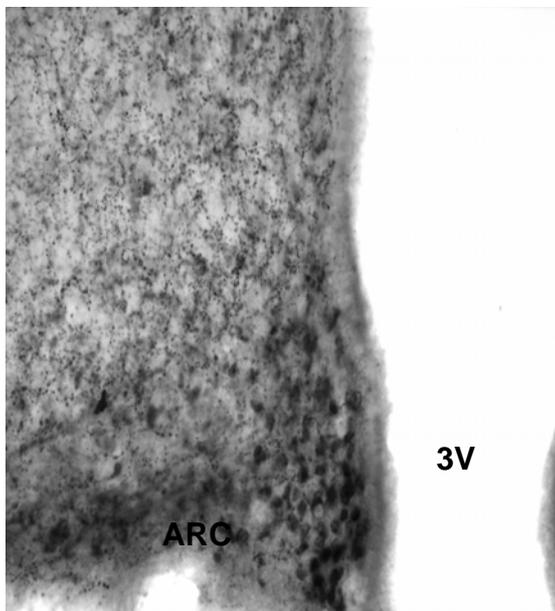


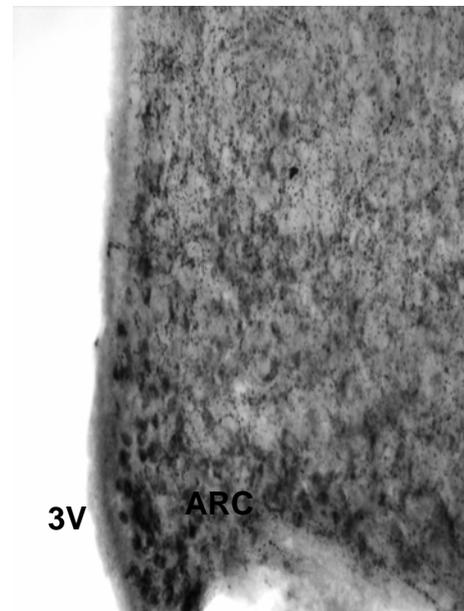
Figura 9 C: Cambios en el número y distribución de las neuronas marcadas con el anticuerpo anti NPY como consecuencia de la inyección icv del vehículo (60% DMSO + 40% NaCl). Las 2 figuras inferiores muestran un mayor grado de amplificación (40×) de la figura superior (20×). Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes.



(20×)



(40×)



(40×)

IV.4 Efecto de la administración periférica a largo plazo (Inyección crónica)

IV.4.1 Ingesta de sólidos y líquidos y cambios ponderales

IV.4.1.1 Ingesta de sólidos

Respecto al efecto a largo plazo de WIN 55,212-2, se observa que su administración periférica a dosis de 0.5 y 2mg/kg, no produce cambios en la ingesta a largo plazo. La inyección de WIN 55,212-2 a dosis de 5mg/kg disminuye significativamente la ingesta y produce una hipofagia a partir del primer día de la inyección. Este efecto es similar al que se observa cuando se estudia la inyección aguda del fármaco (Figura 10 y Tabla 10).

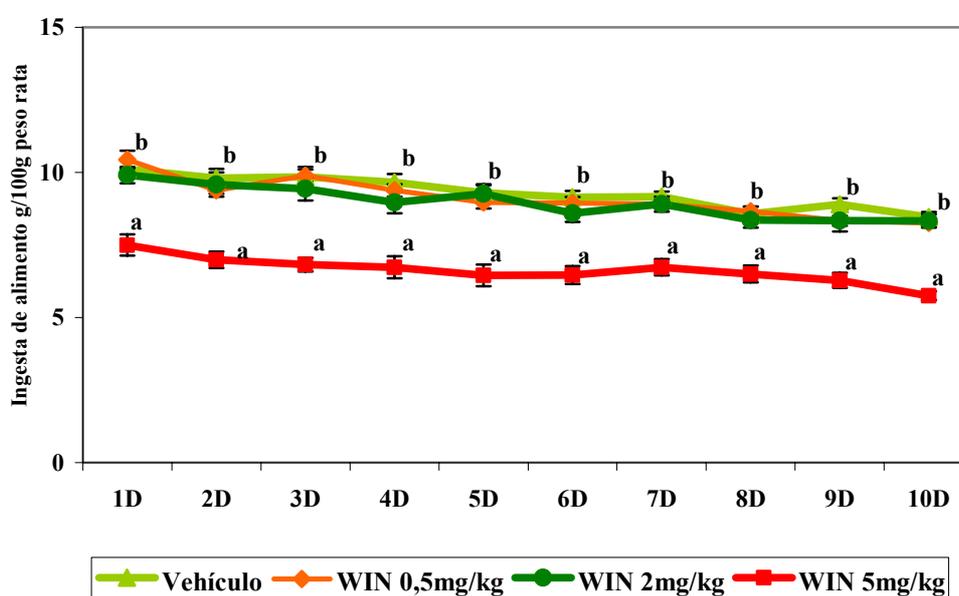


Figura 10: Cambios en la ingesta de alimento en respuesta a la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2 en ratas presaciadas. Los resultados se expresan en gramos de comida ingerida por 100 gramos de peso de la rata \pm EEM (n=10). Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando se estudió el efecto de la inyección de AM 251 a lo largo del periodo experimental se observó una disminución progresiva de la ingesta de alimento de los animales inyectados con el fármaco en comparación con el vehículo a partir del primer día de la inyección (Figura 11 y Tabla 11).

Las diferencias en el efecto sobre la ingesta entre las distintas dosis del fármaco ensayadas desaparecen a partir del cuarto día en el que, sin embargo, sigue existiendo diferencias significativas respecto al grupo inyectado con el vehículo (por ejemplo cinco días tras la inyección, control: 10.04 ± 0.25 ; 1mg/kg: 8.59 ± 0.31 ; 2mg/kg: 8.25 ± 0.36 ; 5mg/kg:

7.97 ± 0.3 g/100g peso rata). En el décimo día en las ratas inyectadas con 2mg/kg se observa la tendencia a recuperar la ingesta ya que desaparece la diferencia significativa frente al control (8.93 ± 0.41 y 9.14 ± 0.17 g/100 peso rata, respectivamente; $p < 0,05$), que se sigue manteniendo para dosis de 1 y 5 mg/kg (8.22 ± 0.16 y 7.72 ± 0.18 g/100 peso rata, respectivamente; $p < 0,05$).

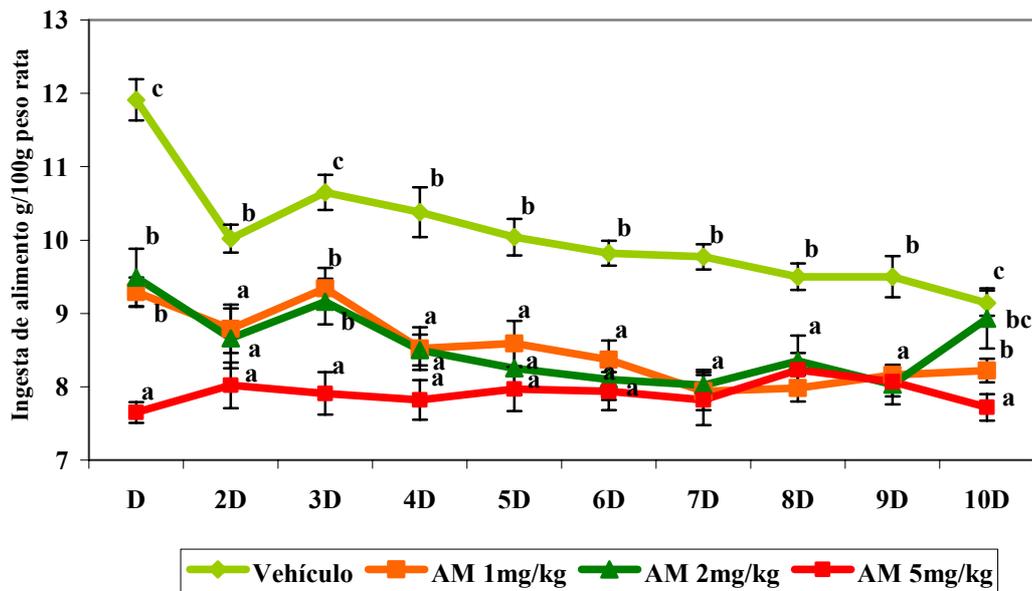


Figura 11: Cambios en la ingesta de alimento en respuesta a la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de AM 251 en ratas presaciadas. Los resultados se expresan en gramos de comida ingerida por 100 gramos de peso de la rata ± EEM (n=10). Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.4.1.2 Ingesta de líquidos

La administración periférica crónica de WIN 55,212-2 a dosis de 0.5 y 2 mg/kg no produce cambios en la ingesta de agua, sin embargo, a dosis de 5mg/kg provoca una disminución significativa de la ingesta de agua con respecto al control (cuatro días tras la inyección, 11.95 ± 0.28, 10.37 ± 0.54 g/100 peso rata, respectivamente; $p < 0,05$), de manera similar a la que se observó en la ingesta de alimento, mientras no se observó diferencias significativas inyectando 0,5 y 2mg/kg (Figura 12 y Tabla 12).

La administración periférica crónica de las dosis ensayadas de AM 251 provoca también una disminución significativa de la ingesta de agua. A partir del segundo día no se observaron diferencias significativas entre las dosis ensayadas (Figura 13 y Tabla 13).

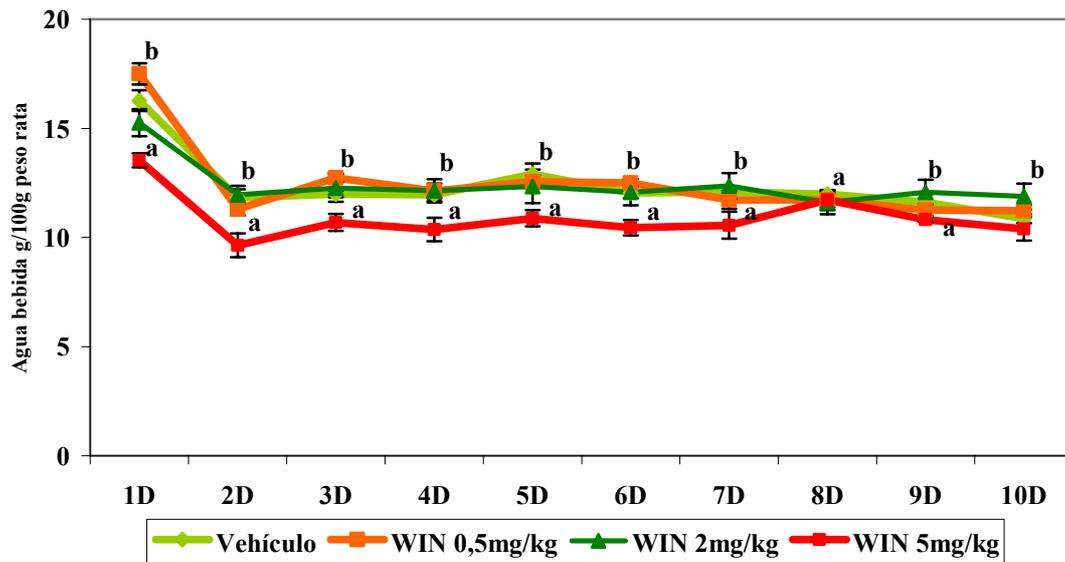


Figura 12: Cambios en la ingesta de agua en respuesta a la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2 en ratas presaciadas. Los resultados se expresan en gramos de comida ingerida por 100 gramos de peso de la rata \pm EEM (n=10). Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

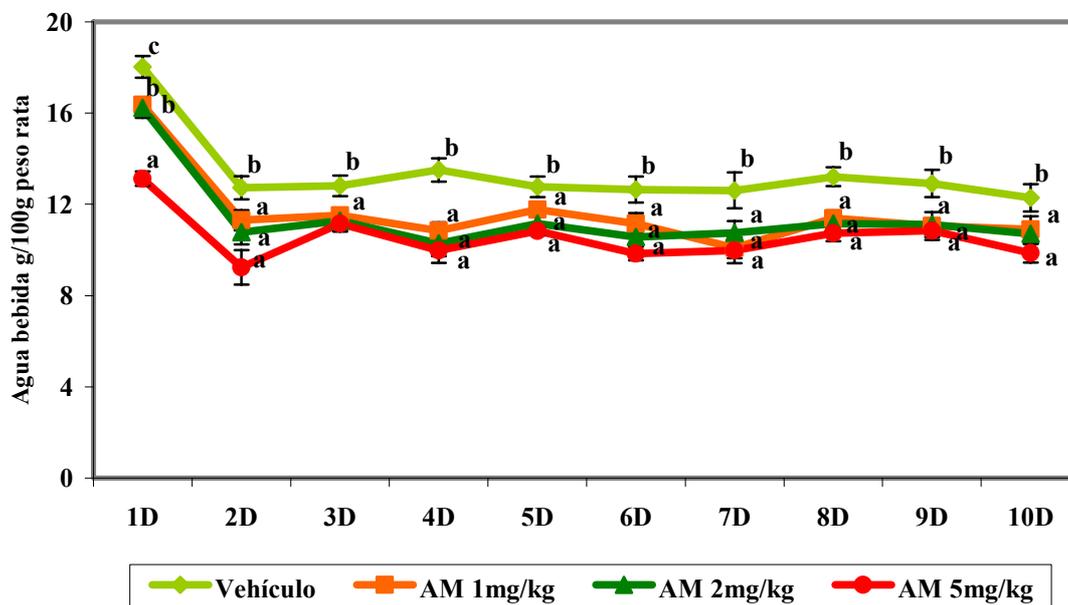


Figura 13: Cambios en la ingesta de agua en respuesta a la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de AM 251 en ratas presaciadas. Los resultados se expresan en gramos de comida ingerida por 100 gramos de peso de la rata \pm EEM (n=10). Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.4.1.3 Cambios ponderales

En nuestras condiciones experimentales en el primer día se produce en todos los grupos un acusado aumento de peso debido a que se registra después de permitir libre acceso a la comida durante 1h tras 24 h de ayuno. Posteriormente se observa que la inyección de WIN 55,212-2 a dosis de 0.5 y 2 mg/kg no produjo diferencias significativas en el peso de los animales respecto al control, mientras que a dosis de 5 mg/kg produjo una disminución significativa del incremento de peso a lo largo de todo el periodo experimental (Figura 14 y Tabla 14).

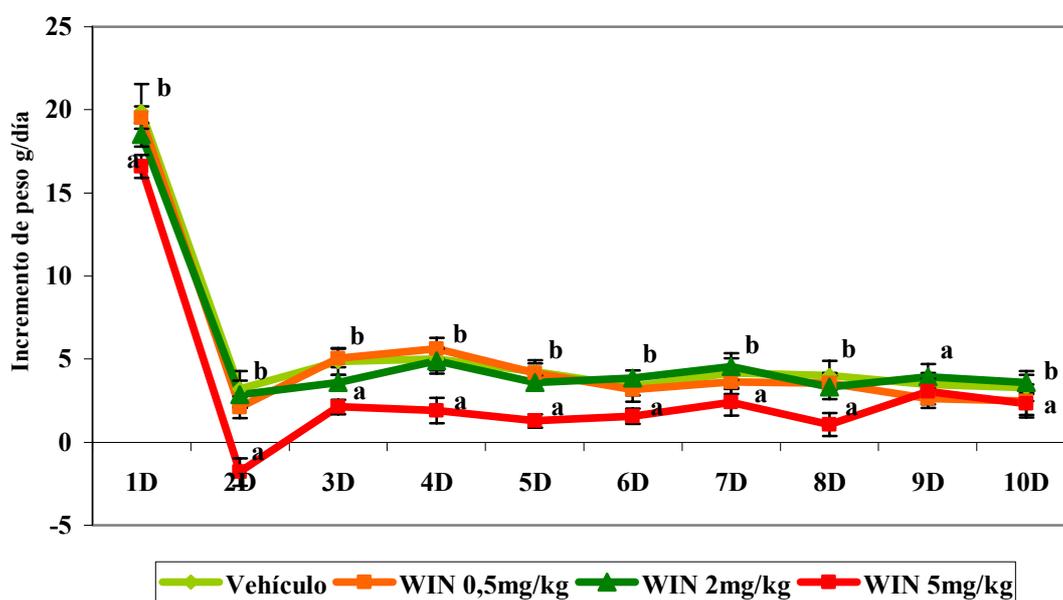


Figura 14: Cambios en el incremento de peso en respuesta a la inyección intraperitoneal de distintas dosis de WIN 55,212-2. \pm EEM (n=10). Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

La disminución de la ingesta inyectando el AM 251 se relaciona con un menor incremento de peso de los animales durante los tres primeros días cuando la diferencia de peso se calcula con respecto al día anterior (por ejemplo tras el segundo día, control: 4.19 ± 0.84 ; 1mg/kg: 2.49 ± 0.82 ; 2mg/kg: 0 ± 0.63 ; 5mg/kg: -1.81 ± 0.73 g/100g peso rata), mientras a partir del cuarto día no había diferencias significativas en el incremento de peso entre los animales inyectados con diferentes dosis del fármaco y el grupo inyectado con el vehículo (cuarto día: control: 3.84 ± 0.98 ; 1mg/kg: 3.76 ± 0.67 ; 2mg/kg: 3.4 ± 0.69 ; 5mg/kg: 3.56 ± 0.56), así el incremento de peso se mantiene constante en todos los grupos experimentales (Figura 15 y Tabla 15).

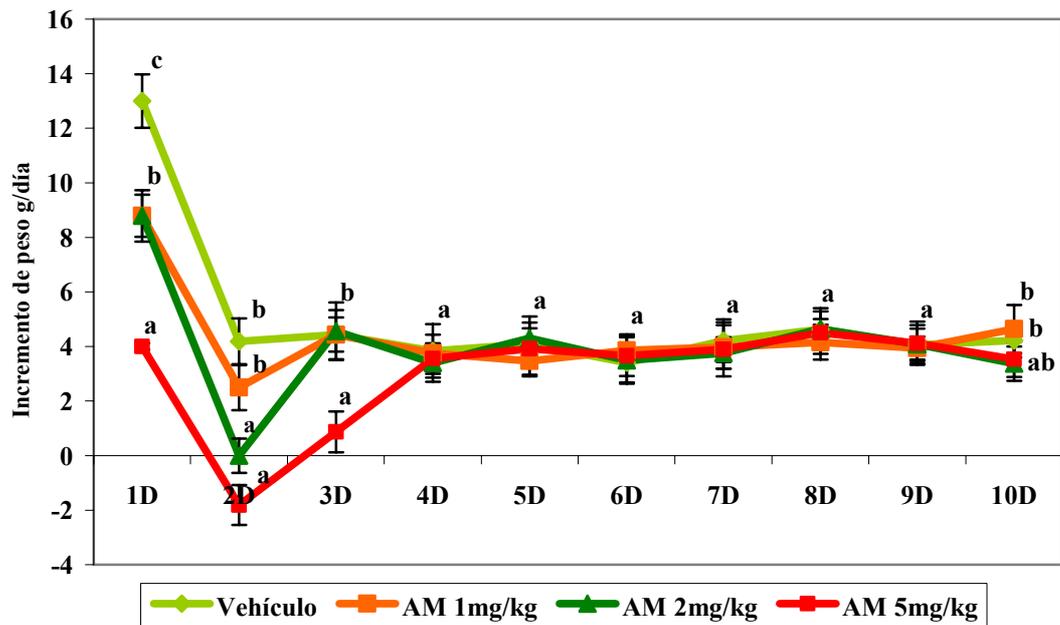


Figura 15: Cambios en el incremento de peso en respuesta a la inyección intraperitoneal de distintas dosis de AM 251. \pm EEM (n=10). Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando se calculó el incremento de peso por rata y por día como promedio de todo el periodo experimental ensayado (10 días) se observó que las ratas inyectadas con WIN 55,212-2 a dosis de 0,5 y 2mg/kg de peso experimentan un incremento de peso similar a las ratas del grupo control, mientras que la inyección de WIN 55,212-2 5mg/kg disminuye significativamente el incremento de peso (Tabla 16).

La cantidad de alimento ingerido expresada en g/100g peso rata, como promedio de 10 días, disminuye significativamente en el grupo inyectado con WIN 55,212-2 a 5mg/kg, mientras no existieron diferencias significativas entre los grupos inyectados con 2 y 0.5 mg/kg y el vehículo (Tabla 16).

El vehículo utilizado DMSO para la inyección de WIN 55,212-2 no produce per se ningún efecto ni sobre la ingesta ni sobre el incremento de peso de los animales cuando se compara con los resultados obtenidos en el grupo control (Tabla 16).

Tabla 16: Ingesta y cambios ponderales en respuesta a la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2

	Vehículo	WIN 0.5 mg	WIN 2mg	WIN 5mg
Ingesta (g/rata/día)	18.90±0.5 ^c	16.49±0.27 ^b	17.72±0.59 ^b	11.54±0.37 ^a
Ingesta (g/100g Peso)	8.50±0.12 ^b	8.29±0.12 ^b	8.03±0.24 ^b	5.97±0.12 ^a
Δ Peso	5.23±0.42 ^b	4.98±0.18 ^b	4.61±0.32 ^b	2.95±0.27 ^a
C.E.C	1.77±0.11 ^{ab}	2±0.11 ^b	1.59±0.08 ^a	1.55±0.11 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$)

Cuando se calculo también el incremento de peso por rata y por día como promedio de todo el periodo experimental ensayado inyectando el AM 251 (10 días) se observó que este fue significativamente menor en distintos grupos inyectados (Tabla 17).

También la cantidad de alimento ingerido expresada en g/100g peso rata, como promedio de 10 días, disminuye significativamente en el grupo inyectado con AM 251 a 1mg/kg, seguida de aquellos inyectados con 2mg, siendo la menor en los inyectados con AM 251 a dosis de 5mg.

El control de la ingesta y los cambios de peso durante el periodo experimental nos ha permitido calcular los gramos de incremento de peso por gramo de proteína ingerida, que corresponde al índice Coeficiente de Eficacia en Crecimiento (CEC).

Este índice se correlaciona bien con la calidad proteica. Observamos que el índice es similar en los grupos inyectados con WIN 55,212-2 a dosis de 2 y 5 mg/kg de peso en comparación con el vehículo, mientras que este índice es significativamente mayor en el grupo inyectado con 0,5 mg/kg en comparación con los dos grupos inyectados con el fármaco (Figura 16 y Tabla 16).

Tabla 17: Ingesta y cambios ponderales en respuesta a la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de AM 251.

	Vehículo	AM 1mg	AM 2mg	AM 5mg
Ingesta (g/rata/día)	20.23±0.43 ^c	18.53±0.64 ^b	17.85±0.67 ^b	16.47±0.58 ^b
Ingesta (g/rata/Peso)	9.19±0.39 ^d	8.29±0.19 ^c	7.71±0.18 ^b	7.16±0.18 ^a
Δ Peso	5.51±0.36 ^b	4.43±0.34 ^a	3.78±0.42 ^a	3.73±0.49 ^a
C.E.C	1.66±0.20 ^b	1.56±0.07 ^b	1.27±0.1 ^a	1.27±0.14 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$)

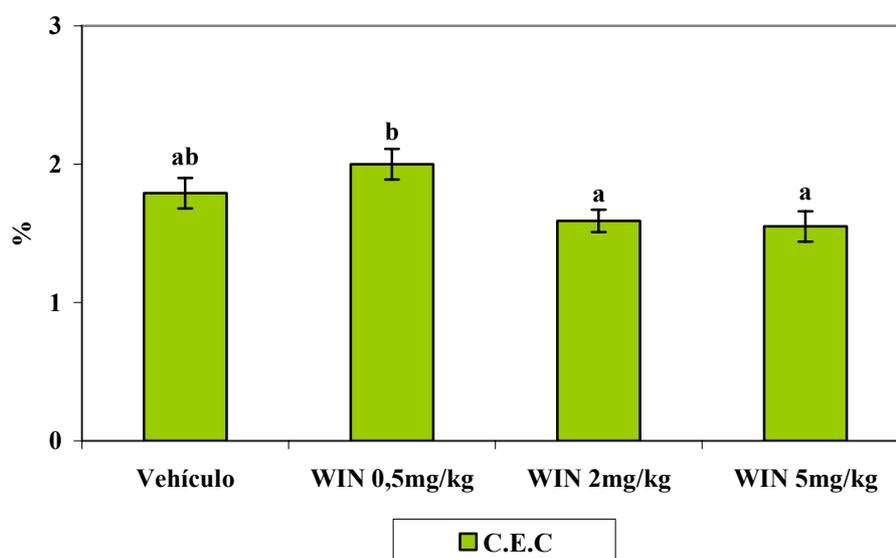


Figura 16: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2 en ratas presaciadas sobre el Coeficiente de Eficacia en Crecimiento (CEC).

Observamos que el coeficiente CEC es significativamente menor en el grupo inyectado con AM 251 a dosis de 2 y 5 mg/kg de peso que en cualquiera de los demás grupos experimentales, sin existir diferencia significativa entre los animales inyectados con AM 251 a 1mg y los del vehículo (Figura 17y Tabla 17).

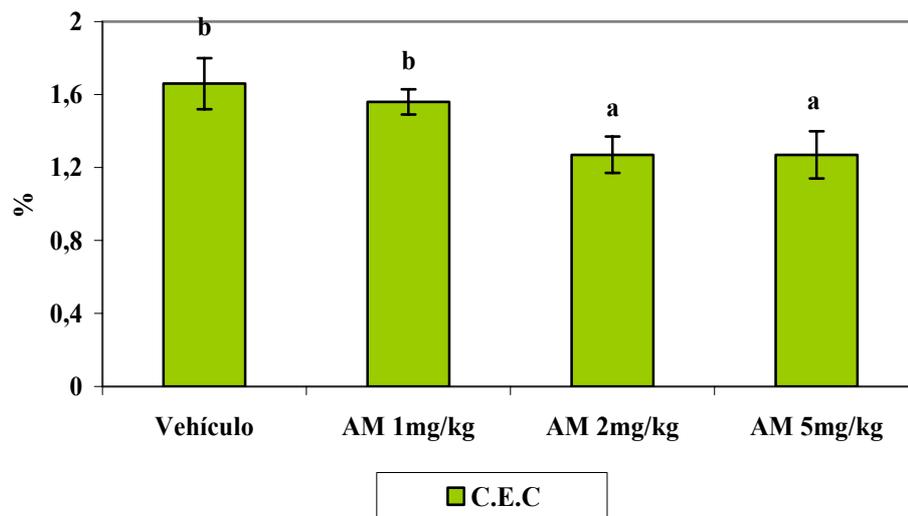


Figura 17: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de AM 251 en ratas presaciadas sobre el Coeficiente de Eficacia en Crecimiento (CEC).

IV.4.2 Efectos de los cannabinoides sobre la utilización digestiva y metabólica de la proteína y de los minerales

IV.4.2.1 Utilización digestiva y metabólica de la Proteína

La utilización digestiva y metabólica de nitrógeno se describe en la Tabla 18. La cantidad de nitrógeno ingerido fue significativamente inferior en los grupos inyectados con WIN 55,212-2 a dosis de 0.5 y 5mg/kg que en el grupo control, mientras no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo inyectado con 2mg/kg. Observamos que en los animales inyectados con diferentes dosis de WIN 55,212-2 hay un aumento significativo de la utilización digestiva de la proteína, expresada como CDA, en comparación al grupo inyectado con el vehículo para una ingesta inferior o similar de nitrógeno, lo cual implica una mejora de la utilización digestiva de la proteína, es decir un buen nivel de absorción de nitrógeno (Tabla 18).

En nuestras condiciones experimentales se produjo una reducción significativa de nitrógeno fecal y de la cantidad de heces excretadas inyectando WIN 55,212-2 a dosis de 0,5, 2 y 5mg/kg. La reducción más acusada es la que se observó a dosis de 5mg/kg.

La utilización metabólica se ha determinado en función de los índices balance de nitrógeno (diferencia entre el nitrógeno ingerido y el excretado en heces y orina) y el porcentaje de nitrógeno retenido en función del nitrógeno absorbido (%R/A).

Observamos que en las ratas inyectadas con WIN 55,212-2 a dosis de 0,5mg/kg la mejora en la utilización digestiva se traduce en una mayor retención de nitrógeno con una eliminación urinaria más baja en relación a los animales del grupo control (Figura 18).

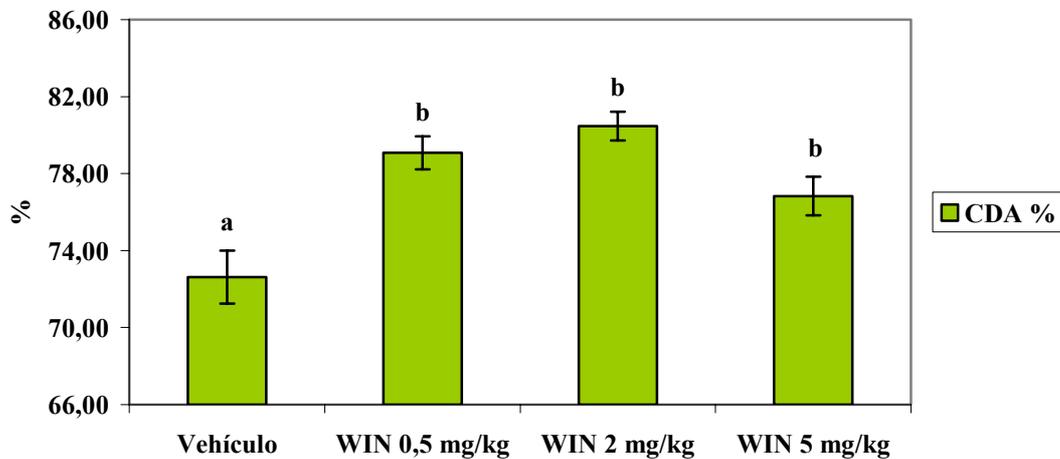


Figura 18: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2 en ratas presaciadas sobre la utilización digestiva de la proteína (CDA).

En las ratas inyectadas con WIN 55,212-2 a dosis de 5mg/kg el balance de nitrógeno es significativamente menor que en el resto de grupos experimentales debido sobre todo a la menor ingesta, pero como se había producido una mejora del CDA y, por otra parte, la excreción urinaria se reduce, el índice %R/A es similar a los demás grupos (Tabla 18).

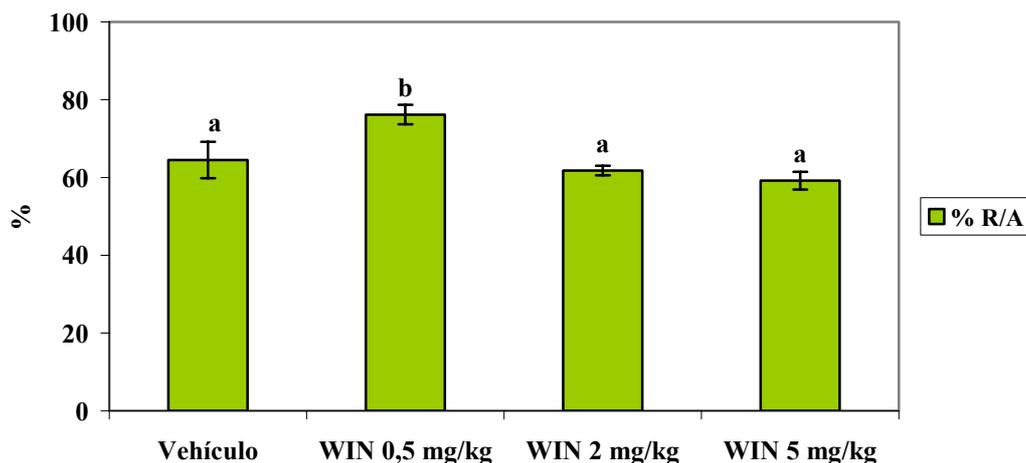


Figura 19: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2 en ratas presaciadas sobre la utilización metabólica de la proteína (% R/A).

Tabla 18: Utilización digestiva y metabólica de nitrógeno en ratas inyectadas con WIN 55,212-2 a diferentes dosis.

	Vehículo	WIN 0.5mg	WIN 2mg	WIN 5mg
N Ingerido (mg/d)	469.6±12.36 ^c	430.45±7.31 ^b	461.2±14.04 ^c	301.2±9.66 ^a
N Ingeri (g/100g Peso)	210.90±2.94 ^b	205.69±9.28 ^b	199.06±19.0 ^b	148.10±3.92 ^a
N fecal (mg/d)	128.62±7.27 ^c	89.92±3.69 ^b	90.49±5.42 ^b	69.78±3.69 ^a
N urinario (mg/d)	119.41±14.2 ^b	81.90±9.5 ^a	141.6±5.97 ^b	94.96±6.5 ^a
N absorbido (mg/d)	340.98±10.9 ^b	340.53±7.62 ^b	370.7±10.20 ^b	231.42±8.19 ^a
CDA (%)	72.62±1.37 ^a	79.08±0.86 ^b	80.47±0.75 ^b	76.83±1.01 ^b
Balance (mg/d)	221.66±18.6 ^b	258.63±7.7 ^c	229.1±7.59 ^b	136.46±5.76 ^a
R/A (%)	64.5±4.65 ^a	76.18±2.5 ^b	61.83±1.24 ^a	59.21±2.29 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Observamos que al inyectar los animales con las dosis de 1 y 2 mg/kg de AM 251 hay un descenso significativo de la ingesta y de utilización digestiva de la proteína, expresada como CDA, en comparación al grupo inyectado con el vehículo. Por otra parte se observó un aumento significativo del CDA en respuesta al incremento de las dosis de AM 251 inyectadas 1, 2 y 5 mg/kg, de modo que en las ratas inyectadas con 5mg/kg el CDA alcanza valores similares respecto al grupo vehículo (Figura 20).

En nuestras condiciones experimentales se observó un aumento del nitrógeno fecal y la cantidad de heces excretadas inyectando 1mg/kg mientras que se produjo una reducción significativa del nitrógeno fecal y de la cantidad de heces excretadas inyectando 5mg/kg (Tabla 19).

La disminución del CDA podría ser el resultado de la menor ingesta o consecuencia de la inyección del fármaco, por ello se planteó una experiencia de pair fed dando a los animales la misma cantidad de comida que han ingerido el grupo inyectado anteriormente con AM 251

a dosis de 2mg/kg, así hemos quitado el efecto de la menor ingesta y podemos ver si la disminución del CDA % se debe al efecto del fármaco.

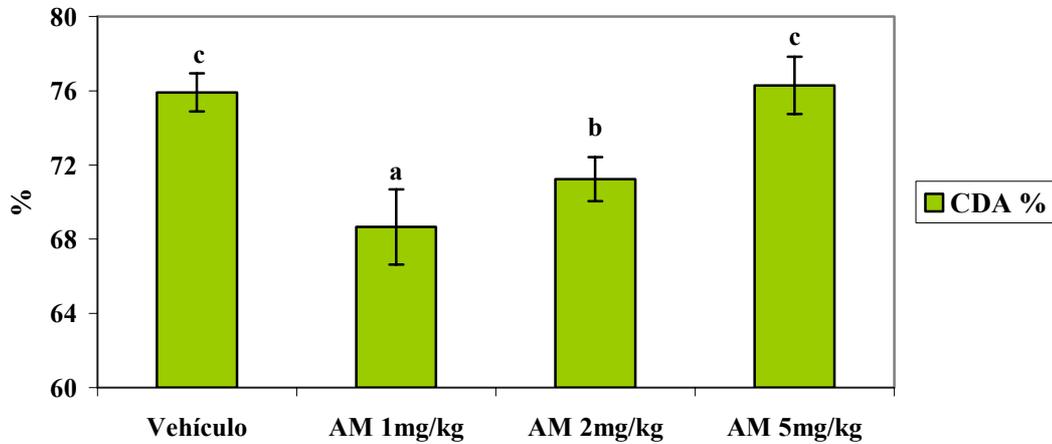


Figura 20: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de AM 251 en ratas presaciadas sobre la utilización metabólica de la proteína (CDA).

Aunque la cantidad de nitrógeno ingerido fue similar en los dos grupos experimentales, se observó una disminución significativa de la utilización digestiva de la proteína en comparación con DMSO pair fed (Figura 21).

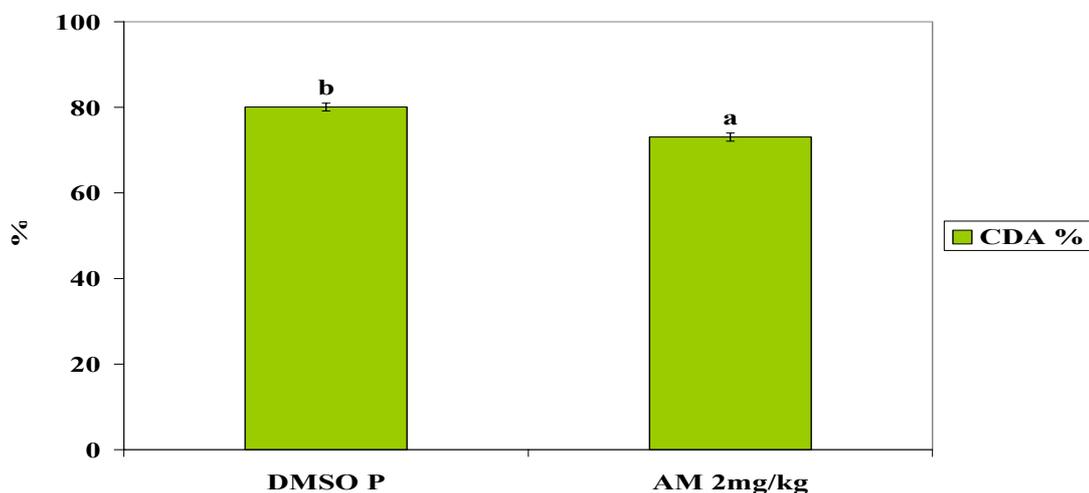


Figura 21: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de AM 251 2mg/kg en ratas presaciadas sobre la utilización digestiva de la proteína (CDA).

Se produjo un aumento significativo en el nitrógeno fecal del grupo inyectado con 2mg/kg de AM 251.

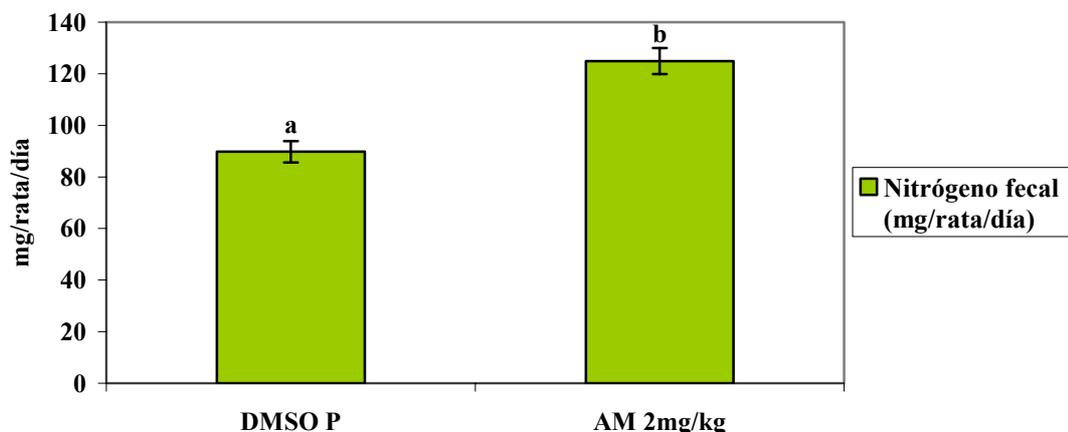


Figura 22: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de AM 251 2mg/kg en ratas presacriadas sobre la excreción fecal del nitrógeno.

Tabla 19: Utilización digestiva y metabólica de nitrógeno en ratas inyectadas con AM 251 a diferentes dosis.

	Vehículo	AM 1mg	AM 2mg	AM 5mg
N Ingerido (mg/d)	513.33±17.9 ^b	450.53±5.87 ^a	465.94±17.4 ^a	430.01±15.1 ^a
N fecal (mg/d)	124.42±7.92 ^b	140.8±9.86 ^c	124.94±5.08 ^b	100.84±6.05 ^a
N urinario (mg/d)	150.42±10.1 ^b	121 ± 9.26 ^a	111.91±9.34 ^a	105.91±12.0 ^a
N absorbido (mg/d)	388.91±12.8 ^b	309.73±15.0 ^a	341.01±14.7 ^a	329.17±16.0 ^a
CDA (%)	75.91±1.03 ^c	68.66±2.02 ^a	71.24±1.18 ^b	76.29±1.54 ^c
Balance (mg/d)	238.49±13.0 ^b	188.73±17.6 ^a	229.09±17.7 ^b	223.26±20.3 ^b
R/A (%)	61.19± 2.43 ^b	60.07± 3.61 ^b	66.44±3.21 ^b	67.11±4.04 ^b

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

La utilización metabólica se ha determinado en función de los índices balance de nitrógeno (diferencia entre el nitrógeno ingerido y el excretado en heces y orina) y el porcentaje de nitrógeno retenido en función del nitrógeno absorbido (%R/A).

Al inyectar diferentes dosis del agonista inverso/antagonista de los receptores CB₁, el AM 251, no existieron diferencias significativas en el R/A %, este índice fue similar en todos los grupos ensayados, tanto en los experimentos ad libitum como pair fed.

En los experimentos ad libitum El nitrógeno urinario fue significativamente menor en todos los animales inyectados con AM 251 en comparación con el vehículo, mientras no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos inyectados con AM 251.

En las ratas inyectadas con AM 251 a dosis de 1 mg/kg el balance de nitrógeno es significativamente menor que en el grupo inyectado con el vehículo. Este efecto no se observó en los otros grupos aumentando la dosis inyectada, en los que el balance prácticamente se iguala al grupo control, probablemente debido a que al inyectar AM 251 a dosis de 1mg hay un aumento significativo de la excreción fecal (Tabla 19).

Tabla 20: Utilización digestiva y metabólica de nitrógeno en ratas inyectadas con AM 251 2mg/kg y DMSO pair fed.

	DMSO Pair fed	AM 2mg
N Ingerido (mg/d)	450.47 ^a	465.94±17.4 ^a
N fecal (mg/d)	89.81±4.16 ^a	124.94±5.08 ^b
N urinario (mg/d)	120.40±8.50 ^a	111.91±9.34 ^a
N absorbido (mg/d)	360.66±4.16 ^a	341.01±14.7 ^a
CDA (%)	80.06±0.92 ^a	71.24±1.18 ^a
Balance (mg/d)	240.26±8.02 ^a	229.09±17.7 ^a
R/A (%)	66.68± 2.33 ^a	66.44±3.21 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (p< 0,05).

En el experimento pair fed no existieron diferencias significativas en el balance ni en el nitrógeno urinario (Tabla 20).

IV.4.2.2 Utilización digestiva y metabólica de Calcio

Al inyectar el agonista de los receptores cannabinoides, WIN 55,212-2 a dosis de 0,5 y 2mg/kg, se observó un aumento significativo de la utilización digestiva de calcio, y una disminución significativa inyectando WIN 55,212-2 a dosis de 5mg/kg en comparación con el grupo vehículo (Figura 23).

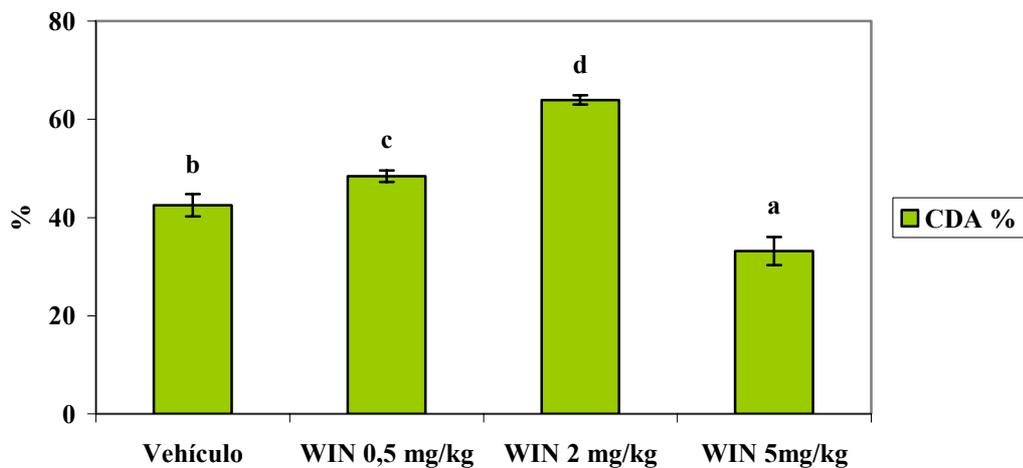


Figura 23: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2 en ratas presaciadas sobre la utilización digestiva de calcio (CDA).

Se produjo una disminución significativa de calcio fecal en todos los grupos inyectados con el WIN 55,212-2 pero el efecto más agudo se observó inyectando WIN 55,212-2 a dosis de 2mg/kg. La excreción urinaria de calcio en los animales inyectados con WIN 55,212-2 a 5mg/kg fue significativamente inferior que al resto de los grupos experimentales (Tabla 21).

El balance de este mineral fue significativamente inferior en el grupo inyectado con WIN 55,212-2 a dosis de 2 y 5mg, mientras fue similar en el grupo inyectado 0,5mg en comparación con el vehículo. El R/A % fue similar también en todos los grupos inyectados con WIN 55,212-2 a diferentes dosis.

Tabla 21: Utilización digestiva y metabólica de calcio en ratas inyectadas con WIN 55,212-2 a diferentes dosis.

	Vehículo	WIN 0.5mg	WIN 2mg	WIN 5mg
Ca Ingerido (mg/d)	255.63±6.73 ^d	222.65±4.2 ^c	115.84±3.86 ^a	155.79±5 ^b
Ca Ing (g/100g Peso)	114.8 ±1.6 ^c	111.97±1.6 ^c	52.01±1.57 ^a	80.62±2.13 ^b
Ca fecal (mg/d)	148.35±7.96 ^d	114.78±2.9 ^c	41.75±1.71 ^a	103.49±3.96 ^b
Ca urinario (mg/d)	1.43±0.19 ^b	1.16±0.2 ^b	1.39±0.11 ^b	0.2±0.02 ^a
Ca absorbido (mg/d)	107.28±5.58 ^c	107.86±3.5 ^c	74.09±2.77 ^b	52.3±5.18 ^a
CDA (%)	42.15±2.27 ^b	48.41±1.16 ^c	63.94±0.96 ^d	33.16±2.83 ^a
Balance (mg/d)	105.85±5.61 ^c	106.7±4.22 ^c	72.7±2.76 ^b	52.1±5.17 ^a
R/A (%)	98.61±0.19 ^b	98.92±0.19 ^b	98.11±0.17 ^b	99.59±0.04 ^b

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

La utilización digestiva de calcio, calculada a través del Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA), fue significativamente menor en los grupos inyectados con AM 251 a dosis de 1 y 2 mg/kg, que en el grupo inyectado con el vehículo, mientras que en el grupo inyectado con AM 251 a 5mg/kg se observó un aumento significativo del CDA (Figura 24).

Se produjo una reducción significativa de la excreción fecal de calcio en el grupo inyectado con AM 5mg/kg, mientras fue similar en el resto de los grupos (Tabla 22).

El R/A % de calcio fue similar en todos los grupos, mientras el balance fue significativamente inferior en los grupos inyectados con AM 251 a diferentes dosis en comparación con el grupo control. El calcio urinario fue también similar en todos los grupos experimentales (Tabla 22).

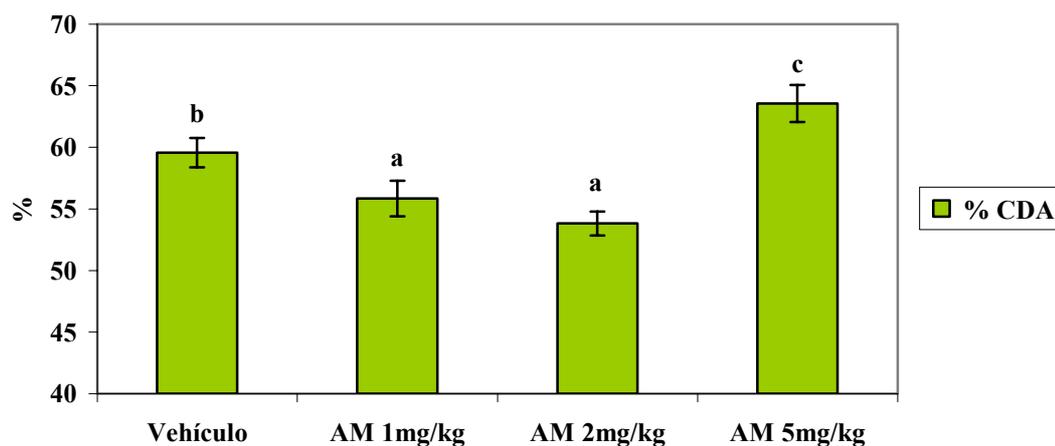


Figura 24: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de AM 251 en ratas presaciadas sobre la utilización metabólica de calcio (CDA).

Tabla 22: Utilización digestiva y metabólica de calcio en ratas inyectadas con AM 251 a diferentes dosis.

	Vehículo	AM 1mg	AM 2mg	AM 5mg
Ca Ingerido (mg/d)	265,51±9,26 ^c	236±8,26 ^b	235,78±8,1 ^b	222,42±7,85 ^a
Ca fecal (mg/d)	104,35±4,54 ^b	100,6±4,72 ^b	104,37±3,76 ^b	82,92±2,56 ^a
Ca urinario (mg/d)	2,43±0,45 ^b	2,33±0,33 ^b	2,31±0,36 ^b	2,22±0,31 ^b
Ca absorbido (mg/d)	158.03±6.17 ^b	132.43±6.1 ^a	132.45±6.07 ^a	136.17±8.61 ^a
CDA (%)	59,56±1,19 ^c	55,83±1,45 ^b	53,82±0,97 ^b	63,56±1,50 ^d
Balance (mg/d)	155,60±6,34 ^b	130,92±7,7 ^a	130,15±6,17 ^a	133,95±8,57 ^a
R/A (%)	98,4±0,29 ^b	98,09±0,23 ^b	98,19±0,29 ^b	98,31±0,24 ^b

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.4.2.3 Utilización digestiva y metabólica de Fósforo

Se observó un aumento ligero de la utilización digestiva de fósforo, sin existir diferencias significativas al inyectar el agonista de los receptores cannabinoides, WIN 55,212-2 a dosis de 0,5 y 2mg/kg, mientras que se observó una disminución significativa inyectando el WIN 55,212-2 a 5mg/kg en comparación con el grupo vehículo (Figura 25).

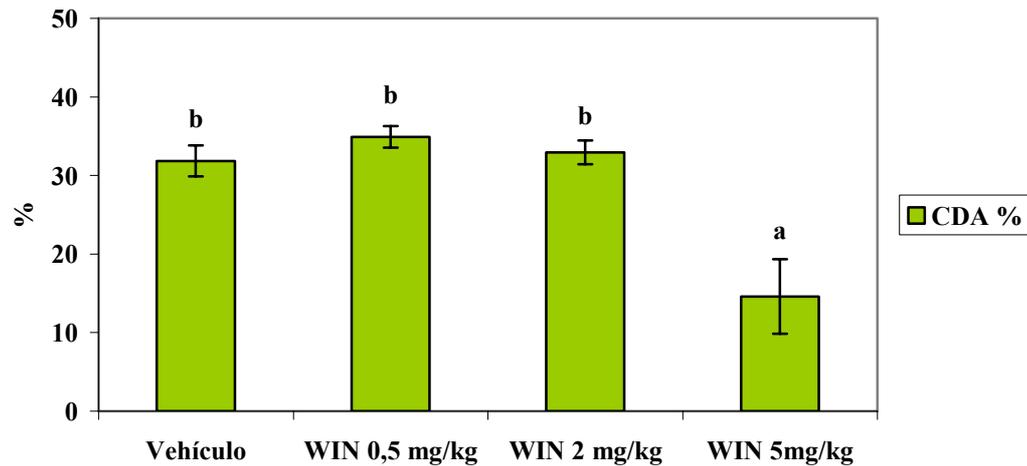


Figura 25: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2 en ratas presaciadas sobre la utilización digestiva de fósforo (CDA).

La excreción fecal de P decreció significativamente en las ratas inyectadas con el fármaco a diferentes dosis en comparación con el grupo control, siendo esta reducción similar entre los grupos inyectados con WIN 55,212-2 (Tabla 23).

Se observó un aumento significativo en el fósforo urinario en los grupos inyectados con WIN 55,212-2 a dosis de 2 y 5mg, y una disminución significativa en el grupo inyectado con 0,5mg en comparación con el vehículo.

Al inyectar 0,5 y 2mg/kg de WIN 55,212-2 no se observaron diferencias significativas en el R/A % mientras que se produjo una disminución significativa inyectando el WIN 55,212-2 a dosis de 5mg/kg en comparación con el vehículo (Figura 26). El balance fue similar en todos los grupos a excepción del grupo inyectado con 5 mg/kg en lo cual se observó una disminución significativa (Tabla 23).

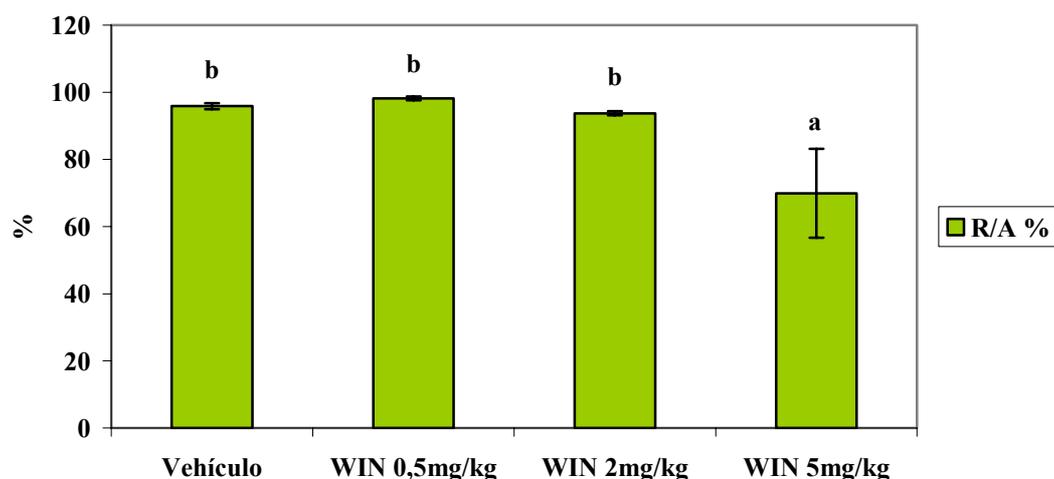


Figura 26: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2 en ratas presaciadas sobre la utilización metabólica de calcio (% R/A).

Tabla 23: Utilización digestiva y metabólica de fósforo en ratas inyectadas con WIN 55,212-2 a diferentes dosis.

	<i>Vehículo</i>	<i>WIN 0.5mg</i>	<i>WIN 2mg</i>	<i>WIN 5mg</i>
P Ingerido (mg/d)	127.63±3.36 ^c	111.16±2.1 ^b	110.29±3.68 ^b	77.78±2.49 ^a
P Ing (g/100g Peso)	57.32±0.80 ^c	55.90±0.80 ^c	49.53±1.50 ^b	40.25±1.07 ^a
P fecal (mg/d)	89.82±4.73 ^b	72.34±1.88 ^a	74.07±3.33 ^a	74.90±2.80 ^a
P urinario (mg/d)	1.50±0.32 ^b	0.77±0.25 ^a	2.24 ± 0.22 ^c	2.32±0.61 ^c
P absorbido (mg/d)	37.81±3.26 ^b	38.82±1.73 ^b	36.22±1.8 ^b	3.89±1.37 ^a
CDA (%)	31.85±1.98 ^b	34.91±1.38 ^b	32.93±1.52 ^b	14.6±4.74 ^a
Balance (mg/d)	38.7±2.45 ^b	38.05±1.91 ^b	35.51±1.48 ^b	8.92±3.53 ^a
R/A (%)	95.84±0.89 ^b	98.14±0.57 ^b	93.75±0.58 ^b	69.89±13.26 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (p< 0,05).

La utilización digestiva de fósforo expresada como CDA, fue significativamente inferior en los grupos inyectados con AM 251 a dosis de 1 y 2 mg/kg, en comparación al grupo inyectado con el vehículo, mientras que en el grupo inyectado con AM 251 a dosis de 5mg/kg se observó un aumento significativo del CDA (Figura 27). La excreción fecal de fósforo expresada en mg/rata/día decreció significativamente en las ratas inyectadas con AM 5mg/kg, mientras fue similar en el resto de los grupos (Tabla 24).

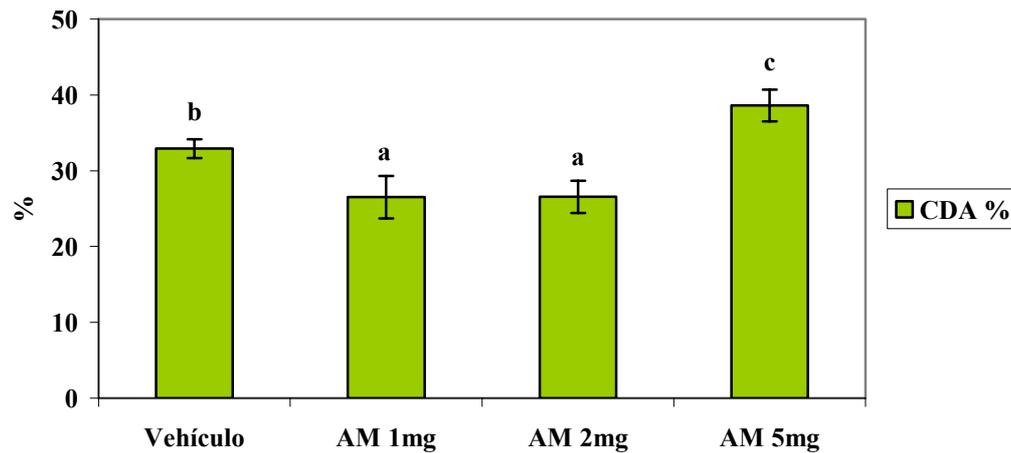


Figura 27: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de AM 251 en ratas presaciadas sobre la utilización digestiva de fósforo (CDA).

Como se observó en el caso de calcio, el R/A % del fósforo fue similar en todos los grupos experimentales.

El balance fue significativamente inferior en el grupo inyectado con AM 251 a dosis de 1 y 2mg/kg, mientras fue superior en el grupo inyectado con 5mg/kg en comparación con el vehículo. Se observó una disminución de fósforo urinario inyectado AM 251 pero el efecto más agudo es el que se consigue a dosis de 5mg (Tabla 24).

Tabla 24: Utilización digestiva y metabólica de fósforo en ratas inyectadas con AM 251 a diferentes dosis.

	<i>Vehículo</i>	<i>AM 1mg</i>	<i>AM 2mg</i>	<i>AM 5mg</i>
P Ingerido (mg/d)	136,33±2,93 ^c	117,11±4,6 ^b	120,32±4,50 ^b	111,04±3,92 ^a
P fecal (mg/d)	89,16±3,95 ^b	84,31±4,78 ^b	88,28±4,13 ^b	69,85±2 ^a
P urinario (mg/d)	1,73±0,22 ^c	1,48±0,16 ^b	1,42±0,26 ^b	0,96±0,16 ^a
P absorbido (mg/d)	40.83±2.25 ^b	31.15±2.51 ^a	32.05±2.89 ^a	41.22±4.37 ^b
CDA (%)	32,91±1,23 ^c	26,52±2,80 ^b	26,56±2,12 ^b	38,61±2,11 ^d
Balance (mg/d)	39,10±2,30 ^b	29,5±3,19 ^a	28,21±2,02 ^a	43,28±3,58 ^c
R/A (%)	95,56±0,58 ^b	95,56±0,83 ^b	94,85±1,14 ^b	96,08±1,25 ^b

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.4.2.4 Utilización digestiva y metabólica de Magnesio

La utilización digestiva de magnesio, fue significativamente superior en los animales inyectados con WIN 55,212-2 a dosis de 0,5 y 2mg/kg, y significativamente menor en los inyectados con 5mg/kg (Figura 28).

Al inyectar WIN 55,212-2 a dosis de 2mg/kg, se observó un aumento significativo en el magnesio fecal, mientras se observó una disminución significativa inyectando WIN 55,212-2 a dosis de 0,5 y 5mg/kg en comparación con el vehículo (Tabla 25).

A diferencia de lo descrito para el calcio y el fósforo, el R/A % de magnesio presenta diferencias significativas inyectando diferentes dosis de WIN 55,212-2. El R/A % fue significativamente más elevado en el grupo inyectado con dosis de 0.5 y 2mg, que en el grupo control. Al inyectar WIN 55,212-2 a dosis de 5mg/kg el R/A % tiene un valor nulo (Figura 29).

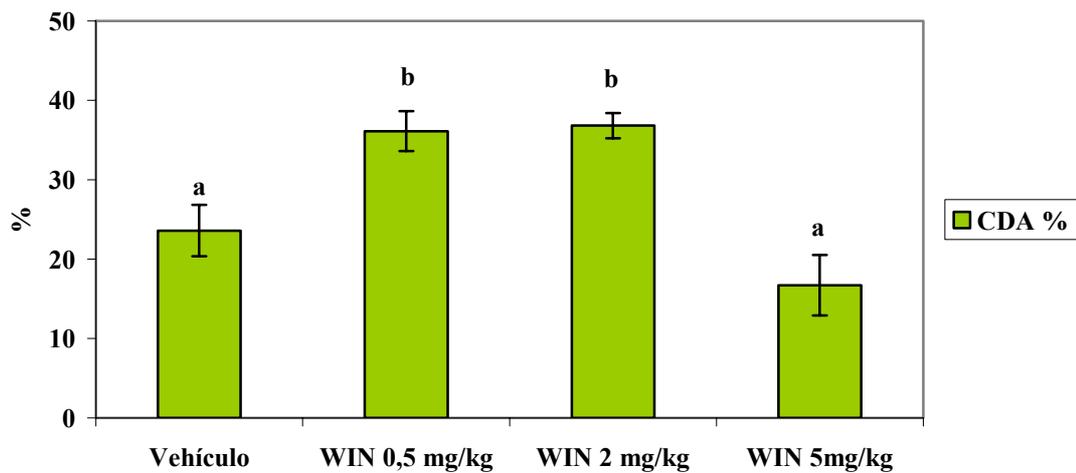


Figura 28: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2 en ratas presaciadas sobre la utilización digestiva de magnesio (CDA).

El magnesio urinario fue significativamente superior en los animales inyectados con WIN 55,212-2 a 2mg/kg mientras fue significativamente menor en aquellos inyectados con 5mg/kg, sin existir diferencias significativas entre el grupo inyectado con WIN 55,212-2 a dosis de 0,5mg/kg y el control. También se observó un aumento significativo de balance en los animales inyectados con las dosis de 2 y 0,5, los animales inyectados con WIN 55,212-2 a dosis de 5 mg/kg presentan balance 0 (Tabla 25).

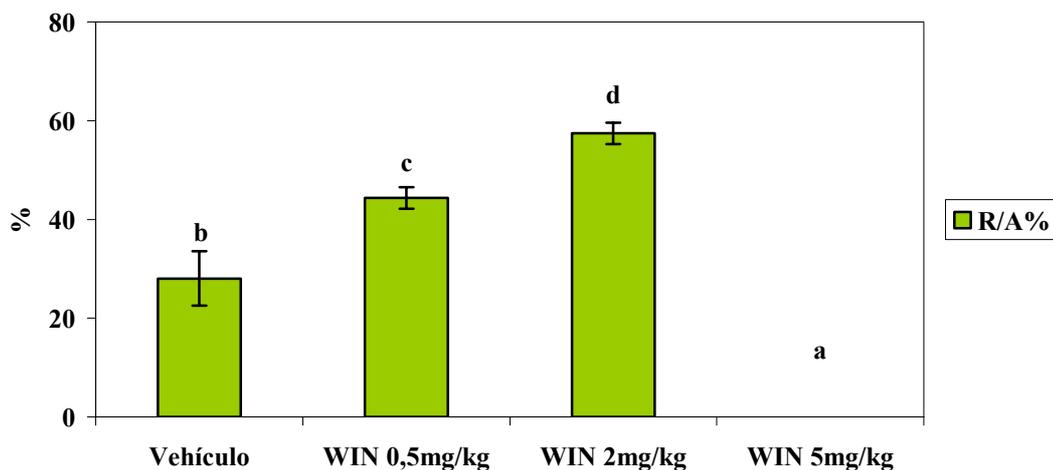


Figura 29: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2 en ratas presaciadas sobre la utilización metabólica de magnesio (% R/A).

Tabla 25: Utilización digestiva y metabólica de magnesio en ratas inyectadas con WIN 55,212-2 a diferentes dosis.

	<i>Vehículo</i>	<i>WIN 0.5mg</i>	<i>WIN 2mg</i>	<i>WIN 5mg</i>
Mg Ingerido (mg/d)	31.56±0.79 ^c	27.54±0.47 ^b	51.30±1.91 ^d	19.27±0.62 ^a
Mg Ing (g/100g Peso)	14.20±0.20 ^b	13.85±0.2 ^b	23.04±0.70 ^c	9.97±0.26 ^a
Mg fecal (mg/d)	24.23±1.40 ^b	17.57±0.70 ^a	32.55±1.76 ^c	16.98±0.88 ^a
Mg urinario (mg/d)	5.59±0.52 ^b	5.67±0.34 ^b	7.94±0.40 ^c	4.05±0.33 ^a
Mg absorbido (mg/d)	7.33±0.93 ^b	9.97±0.78 ^c	18.75±0.71 ^d	2.29±0.96 ^a
CDA (%)	23.59±3.24 ^a	36.11±2.51 ^b	36,82±1,58 ^b	16.7±3.81 ^a
Balance (mg/d)	2.35±0.51 ^b	4.3±0,6 ^c	10.82±0.79 ^d	0 ^a
R/A (%)	28.04±5.52 ^b	44.35±2.18 ^c	57,44±2,18 ^d	0 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

La utilización digestiva de magnesio fue similar en todos los grupos, excepto en el grupo inyectado con AM 251 a dosis de 1mg/kg que presentó una disminución significativa en comparación con el vehículo (Figura 30).

El magnesio fecal fue significativamente superior en los animales inyectados con AM 251 a dosis de 1mg/kg, sin que existan diferencias significativas en aquellos inyectados con 2mg/kg, siendo la menor en los inyectados con AM 5mg/kg (Tabla 26).

El R/A % de magnesio fue similar en todos los grupos al excepto en el grupo inyectado con AM 251 a dosis de 1mg/kg que fue significativamente menor (Figura 31). El balance y el magnesio urinario, fueron significativamente inferiores en el grupo inyectado con 1mg/kg, mientras fue similar en los otros grupos.

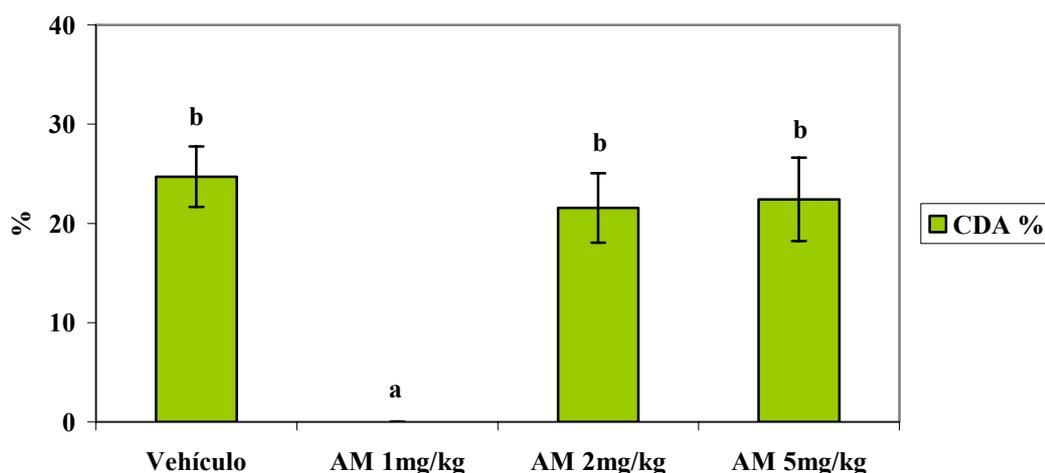


Figura 30: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de AM 251 en ratas presaciadas sobre la utilización metabólica de magnesio (CDA).

Tabla 26: Utilización digestiva y metabólica de magnesio en ratas inyectadas con AM 251 a diferentes dosis.

	<i>Vehículo</i>	<i>AM 1mg</i>	<i>AM 2mg</i>	<i>AM 5mg</i>
Mg Ingerido (mg/d)	32,84±1,15 ^c	28,83±1,14 ^b	29,81±1,11 ^b	26,43±0,79 ^a
Mg fecal (mg/d)	24,72±1,38 ^b	32,13±1,71 ^c	24,87±1,68 ^b	21,04±0,81 ^a
Mg urinario (mg/d)	5,74±0,34 ^b	4,27±0,35 ^a	4,85±0,43 ^b	4,84±0,52 ^b
Mg absorbido (mg/d)	8,13±1,08 ^b	0 ^a	6,93±1,08 ^b	6,48±1,38 ^b
CDA (%)	24,72±3,05 ^b	0 ^a	21,55±3,50 ^b	22,43±4,21 ^b
Balance (mg/d)	2,87±0,96 ^b	0 ^a	2,03±0,62 ^b	2,31±1 ^b
R/A (%)	25,92±7,07 ^b	0 ^a	25,18±7,10 ^b	23,34±7,66 ^b

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

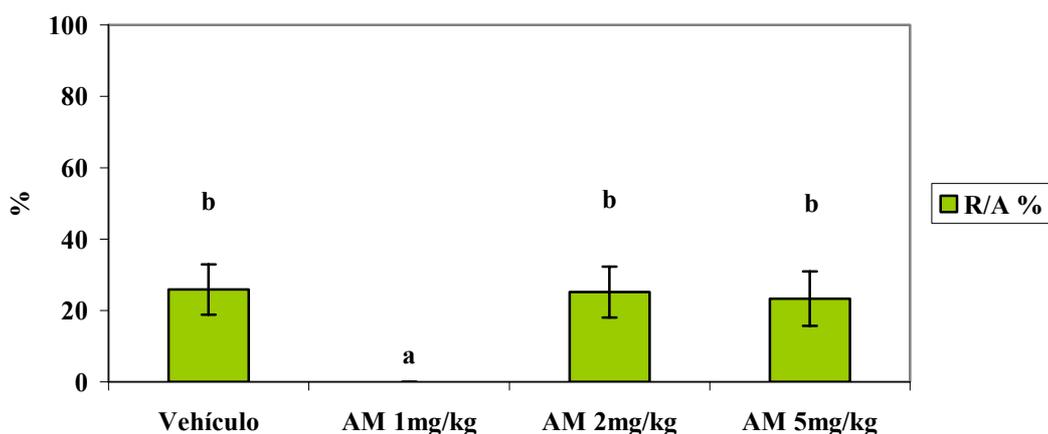


Figura 31: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de AM 251 en ratas presacriadas sobre la utilización metabólica de magnesio (% R/A).

IV.4.2.5 Utilización digestiva y metabólica de Cinc

Se observó un aumento significativo de la utilización digestiva de cinc en los grupos inyectados con el agonista de los receptores cannabinoides, WIN 55,212-2 a dosis de 0,5, 2 y 5mg/kg, este efecto aumenta con el aumento de la dosis inyectada (Figura 32).

La excreción fecal de Zn expresada en $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$ fue significativamente inferior en los grupos inyectados con las diferentes dosis de WIN 55,212-2 en comparación con el vehículo, siendo la menor en los animales inyectados con 5 mg/kg (Tabla 27).

En todos los grupos inyectados con WIN 55,212-2 a diferentes dosis, el R/A % de Zn fue similar. El balance fue significativamente superior en los grupos inyectados con WIN 55,212-2 a dosis de 2 y 5mg, sin encontrar diferencias significativas en el grupo inyectados con 0,5mg en comparación con el vehículo.

El cinc urinario fue significativamente menor en el grupo inyectado con 5mg/kg de WIN 55,212-2 y significativamente mayor en el grupo inyectado con 0.5 mg/kg en relación al control, mientras no hubo diferencias significativas en el grupo inyectado con 2mg (Tabla 27).

Tabla 27: Utilización digestiva y metabólica de cinc en ratas inyectadas con WIN 55,212-2 a diferentes dosis

	<i>Vehículo</i>	<i>WIN 0.5mg</i>	<i>WIN 2mg</i>	<i>WIN 5mg</i>
Zn Ingerido (µg/d)	3140.45±82.64 ^d	2735.26±51.9 ^c	2488.31±82.9 ^b	1913.93±61.37 ^a
Zn Ing (µg/100g Peso)	1410.40 ±19.65 ^c	1375.53± 19.63 ^c	1117.32±33.7 ^b	990.42± 26.21 ^a
Zn fecal (µg/d)	2685.98±156.65 ^d	2104.33±53.7 ^c	1701.88±82.0 ^b	1142.15±54.57 ^a
Zn urinario (µg/d)	15.65±1.24 ^c	25.75±5.18 ^b	13.81±137 ^c	10.52±1.02 ^a
Zn absorbido (µg/d)	454.47± 105.89 ^a	630.93±41.15 ^{ac}	786.43±40.73 ^b	771.78± 67.17 ^{bc}
CDA (%)	14.87±2.56 ^a	23.08±1.46 ^b	31.77±1.65 ^c	39.99±2.93 ^d
Balance (µg/d)	572±70.68 ^a	605.18±47.21 ^a	769.77±40.24 ^b	823.04±81.67 ^b
R/A (%)	96.99±0,48 ^b	95.90±0.84 ^b	97.88±037 ^b	98.58±0.15 ^b

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

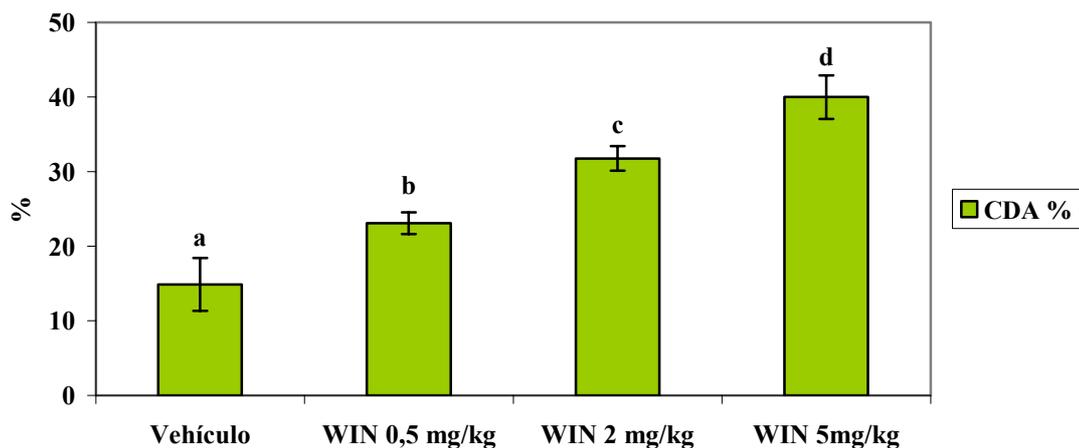


Figura 32: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2 en ratas presaciadas sobre la utilización digestiva de cinc (CDA).

La utilización digestiva de cinc, fue significativamente superior en los animales inyectados con AM 251 a 5mg/kg, y significativamente inferior con los inyectados con 1 y 2mg/kg que en el control (Figura 33).

Se observó una reducción significativa de cinc fecal en el grupo inyectado con AM 251 a dosis de 5mg/kg, mientras fue similar en el resto de los grupos (Tabla 28). El R/A % de cinc fue similar en todos los grupos. El balance de este mineral fue significativamente inferior en los grupos inyectados con AM 251 a dosis de 1 y 2mg que en el grupo control. El cinc urinario fue superior en los grupos inyectados con 1 y 2mg/kg.

Tabla 28: Utilización digestiva y metabólica de cinc en ratas inyectadas con AM 251 a diferentes dosis.

	<i>Vehículo</i>	<i>AM 1mg</i>	<i>AM 2mg</i>	<i>AM 5mg</i>
Zn Ingerido (µg/d)	3261,49±113,75 ^c	2862,47±112,5 ^b	2960,44±110,63 ^b	2732.11±96.39 ^a
Zn fecal (µg/d)	2537,55±113,72 ^b	2265,92±123,92 ^b	2679,57±134,33 ^b	2072±116,55 ^a
Zn urinario (µg/d)	11,31±0,75 ^a	19,78±2,73 ^b	15,75±1,94 ^b	14,50±2,05 ^b
Zn absorbido (µg/d)	723.94±78.3 ^b	489.87±65.98 ^a	320.4±68.48 ^a	759.08±107.39 ^b
CDA (%)	23,31±2,02 ^c	17,05,±2,19 ^b	9,02±1,26 ^a	29,81±2,34 ^d
Balance (µg/d)	712,62±78,08 ^b	451.33±92.94 ^a	265,3±72,58 ^a	823,04±81,67 ^b
R/A (%)	98,26±0,20 ^b	99,45±2,51 ^b	95,74±1,85 ^b	96,88±1,64 ^b

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (p< 0,05).

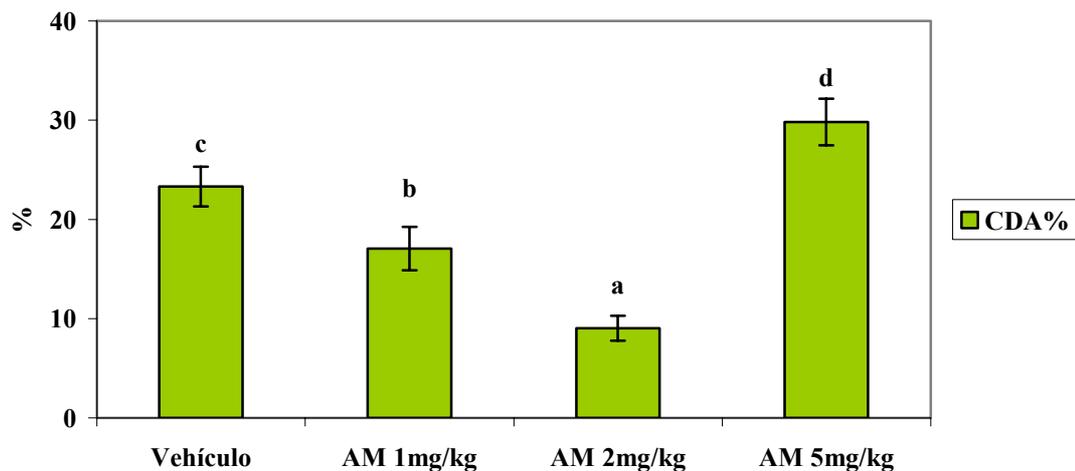


Figura 33: Efecto de la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de AM 251 en ratas presaciadas sobre la utilización metabólica de cinc (CDA).

IV.4.2.6- Contenido mineral en sangre, plasma y eritrocitos

IV.4.2.6.1- Contenido de calcio en sangre y plasma

	Vehículo	AM 1mg	AM 2mg	AM 5mg
Ca en sangre (mg/100ml sangre)	6.67±0.81 ^b	6.03±0.72 ^{ab}	5.43±0.74 ^{ab}	4.71±0.31 ^a
Ca en plasma (mg/100ml sangre)	12.39± 0.27 ^a	13.69± 0.81 ^{ab}	13.39±0.36 ^b	12.79±0.20 ^{ab}

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

El contenido de calcio en sangre no sufre modificaciones como consecuencia de la inyección del antagonista de los receptores cannabinoides, AM 251 a dosis de 1 y 2mg/kg mientras se observó una disminución significativa a dosis de 5mg/kg en comparación con el vehículo. El contenido de calcio en plasma fue significativamente superior en los animales inyectados con AM 251 a dosis de 2mg/kg, mientras no fue significativamente diferente en el resto de los grupos ensayados.

IV.4.2.6.2- Contenido de fósforo en sangre, plasma y eritrocitos

	Vehículo	AM 1mg	AM 2mg	AM 5mg
P en sangre (mg/100ml sangre)	49.57±1.10 ^b	46.98±1.85 ^a	45.17±1.36 ^a	45.31±1.60 ^a
P en plasma (mg/100ml sangre)	7.25±0.24 ^a	7.10±0.22 ^a	8±0.28 ^b	7.97±0.19 ^b
P intraeritrocitario (mg/100ml sangre)	44.93±1.15 ^b	42.43±1.86 ^a	40.96±1.46 ^a	41.08±1.70 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

El contenido de fósforo en sangre fue significativamente inferior en los grupos inyectados con AM 251 a dosis de 1, 2 y 5mg/kg, que en los animales inyectados con el vehículo. También se observó un aumento significativo entre el contenido de P en plasma de los grupos inyectados con 2 y 5mg y el grupo control.

El contenido de fósforo intraeritrocitario fue significativamente inferior similar en los diferentes grupos inyectados con el fármaco y no existió dosis/efecto.

IV.4.2.6.3- Contenido de magnesio en sangre, plasma y eritrocitos

	Vehículo	AM 1mg	AM 2mg	AM 5mg
Mg en sangre (mg/100ml sangre)	4.39±0.09 ^b	3.87±0.15 ^a	4.08±0.20 ^a	4.07±0.09 ^a
Mg en plasma (mg/100ml sangre)	1.86±0.04 ^b	1.72±0.03 ^a	2.06±0.14 ^b	1.88±0.04 ^b
Mg intraeritrocitario (mg/100ml sangre)	3.20±0.09 ^b	2.76±0.15 ^a	2.57±0.12 ^a	2.87±0.09 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se observó una disminución significativa en el contenido de magnesio en sangre en los grupos inyectados con 1, 2 y 5mg/kg del fármaco, en comparación con el grupo inyectado con el vehículo, sin existir diferencias significativas entre los animales inyectados con diferentes dosis de AM 251.

Se observó una disminución significativa en el contenido de magnesio en plasma en el grupo inyectado con AM 251 a dosis de 1mg/kg en comparación con el vehículo.

El magnesio intraeritrocitario disminuyó significativamente en los grupos inyectados con diferentes dosis del fármaco, 1, 2 y 5mg en comparación con el grupo control.

IV.4.2.6.4- Contenido de cinc en sangre, plasma y eritrocitos

	Vehículo	AM 1mg	AM 2mg	AM 5mg
Zn en sangre (mg/100ml sangre)	1.74±0.13 ^a	1.59±0.13 ^a	1.50±0.12 ^a	1.72±0.13 ^a
Zn en plasma (mg/100ml sangre)	0.19±0.07 ^{ab}	0.10±0 ^a	0.13±0.01 ^b	0.12±0.01 ^{ab}
Zn intraeritrocitario (mg/100ml sangre)	1.61±0.15 ^a	1.52±0.13 ^a	1.41±0.12 ^a	1.65±0.12 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (p< 0,05).

El contenido de cinc en sangre y en eritrocito, no sufre modificaciones como consecuencia de la inyección del antagonista de los receptores cannabinoides, el AM 251 a diferentes dosis de 1, 2 y 5mg/kg, ya que los cuatros grupos ensayados presentan valores similares.

Tabla 1: Cambios en la ingesta de alimentos en respuesta a la inyección intracerebroventricular de WIN 55,212-2 (0.1µg/5µl) y AM 251 (1µg/5µl).

	1h	2h	4h	6h	24h
Vehículo	1.39 ± 0.48 ^a	2.44 ± 0.69 ^a	3.08 ± 0.57 ^a	3.98 ± 0.71 ^a	7.23 ± 0.99 ^a
WIN 1µg	3.28 ± 0.48 ^b	4.20 ± 0.78 ^b	5.18 ± 0.96 ^b	9.22 ± 1.35 ^b	18.98 ± 3.27 ^b
AM 0.1µg	0.27 ± 0.2 ^a	0.42 ± 0.4 ^a	0.81 ± 0.37 ^a	0.93 ± 0.47 ^a	2.99 ± 0.51 ^a

Valores medios (n=4) y EEM.

Resultados expresados en g de alimento ingerido/100g de peso del animal. Letras iguales dentro de la misma columna indican que no existen diferencias significativas (p< 0,05).

Tabla 2: Cambios en la ingesta de alimentos en respuesta a la inyección intraperitoneal aguda de distintas dosis de WIN 55,212-2.

	1h	2h	4h	6h	24h
Vehículo	0.11 ± 0.06 ^a	0.62 ± 0.11 ^b	1.93 ± 0.15 ^b	2.95 ± 0.24 ^b	10.11±0.30 ^b
WIN 0,5mg	1,03 ± 0,29 ^b	1,06 ± 0,28 ^b	2,47 ± 0,30 ^b	3,49 ± 0,28 ^b	10,88±0,29 ^b
WIN 1mg	1.12 ± 0.17 ^b	1.7 ± 0.28 ^c	3.24 ± 0.31 ^c	4.58 ± 0.33 ^c	10.57±0.36 ^b
WIN 2mg	1.30 ± 0.15 ^b	1.74 ± 0.18 ^c	3.01 ± 0.27 ^c	4 ± 0.33 ^c	9.43±0.36 ^{ab}
WIN 5mg	0.04 ± 0.03 ^a	0,18 ± 0.11 ^a	1,48 ± 0.26 ^a	1,63 ± 0.27 ^a	9,02±0.24 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Resultados expresados en g de alimento ingerido/100g de peso del animal. Letras iguales dentro de la misma columna indican que no existen diferencias significativas (p< 0,05).

Tabla 3: Cambios en la ingesta de alimentos en respuesta a la inyección intraperitoneal aguda de distintas dosis de AM 251.

	1h	2h	4h	6h	24h
Vehículo	0.2 ± 0.09 ^a	1.2 ± 0.18 ^d	2.47 ± 0.37 ^c	3.08 ± 0.21 ^c	11.91±0.2 ^c
AM 0.5mg	0 ^a	0.28 ± 0.21 ^{bc}	1.34 ± 0.33 ^b	2.29 ± 0.25 ^b	10.33±0.46 ^b
AM 1mg	0.03 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.09 ^b	0.94 ± 0.17 ^b	1.93 ± 0.19 ^b	9.29 ± 0.20 ^b
AM 2mg	0.10 ± 0.06 ^a	0.36 ± 0.15 ^c	0.92 ± 0.21 ^b	1.92 ± 0.18 ^b	9.03 ± 0.29 ^b
AM 5mg	0 ^a	0 ^a	0.06 ± 0.05 ^a	0.77 ± 0.19 ^a	7.65 ± 0.14 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Resultados expresados como g/100g de peso del animal. Letras iguales dentro de la misma columna indican que no existen diferencias significativas (p< 0,05).

Tabla 4: Cambios en la ingesta de bebida en respuesta a la inyección intraperitoneal de distintas dosis de WIN 55,212-2.

	1h	2h	4h	6h	24h
Vehículo	1,05 ± 0.11 ^b	2,06 ± 0.19 ^a	4.93 ± 0.22 ^b	7,38 ± 0.36 ^b	13,90 ± 0.75 ^a
WIN 0,5mg	1,55 ± 0,39 ^{bc}	2,62 ± 0,45 ^a	6,38 ± 0,61 ^c	7,83 ± 0,27 ^b	17,89 ± 0,54 ^b
WIN 1mg	1.94 ± 0.30 ^c	3.07 ± 0.32 ^b	5,69 ± 0.50 ^b	7.53 ± 0.50 ^b	14,21 ± 0.56 ^a
WIN 2mg	1.68 ± 0.29 ^c	2,44 ± 0.37 ^a	4,69 ± 0.34 ^b	6,66 ± 0.45 ^b	13.45 ± 0.62 ^a
WIN 5mg	0.23 ± 0.07 ^a	1,98 ± 0.46 ^a	3,56 ± 0.53 ^a	6,28 ± 0.49 ^b	13,53 ± 0.32 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Resultados expresados en g de agua bebida /100g de peso del animal. Letras iguales dentro de la misma columna indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 5: Cambios en la ingesta de bebida en respuesta a la inyección intraperitoneal de distintas dosis de AM 251.

	1h	2h	4h	6h	24h
Vehículo	1.57 ± 0.18 ^b	3.32 ± 0.30 ^c	6.01 ± 0.30 ^c	8.09 ± 0.33 ^b	18.03 ± 0.47 ^c
AM 0.5mg	0.58 ± 0.12 ^a	2.31 ± 0.12 ^b	4.85 ± 0.46 ^b	7.26 ± 0.31 ^{ab}	16.66 ± 0.24 ^b
AM 1mg	0.61 ± 0.19 ^a	1.54 ± 0.30 ^a	4.15 ± 0.38 ^b	6.86 ± 0.39 ^a	15.52 ± 0.48 ^b
AM 2mg	1.81 ± 0.26 ^b	2.73 ± 0.29 ^b	4.74 ± 0.24 ^b	6.96 ± 0.23 ^a	16.58 ± 0.52 ^b
AM 5mg	1.04 ± 0.18 ^{ab}	2.17 ± 0.28 ^b	3.34 ± 0.36 ^a	5.69 ± 0.66 ^a	13.63 ± 0.52 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Resultados expresados en g de agua bebida/100g de peso del animal. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 6: Cambios en la actividad locomotora y exploratoria en respuesta a la inyección con WIN 55,212-2 a dosis de 5mg/kg.

	Actividad locomotora	Actividad exploratoria
Vehículo	100 ± 13.12 ^b	100 ± 19.75 ^b
WIN 55,212-2 (% control)	21 ± 1.77 ^a	35 ± 5.78 ^a

Valores medios (n= 5) y EEM.

Resultados expresados en % de los valores registrados en los animales del grupo vehículo. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 7: Efecto de la administración cerebroventricular de WIN 55,212 y AM 251 sobre la liberación de la serotonina (5-HT) en el hipotálamo ventromedial de las ratas presacriadas

	<i>Vehículo</i>	<i>WIN (1ug)</i>	<i>AM (1ug)</i>
<i>15</i>	33.2 ± 5.8	42 ± 5.3	45 ± 8.1
<i>30</i>	37.4 ± 4.5	39.3 ± 4	50 ± 10.1
<i>45</i>	35.7 ± 6.9	33.9 ± 4.9	39.2 ± 6.7
<i>60</i>	40.1 ± 5.8	46.8 ± 5.7	47.1 ± 8.5
<i>75</i>	48.3 ± 6.1	46.2 ± 4.8	46.2 ± 7.2
<i>90</i>	59.5 ± 4.3	60.2 ± 5.2	50.6 ± 10.4
<i>105</i>	60.9 ± 8.5*	56.1 ± 4.3*	70.2 ± 11.7*
<i>120</i>	64.3 ± 8.2*	62.1 ± 8.5*	80.5 ± 12.5*
<i>135</i>	69.3 ± 7.3*	60.9 ± 7.7*	69.7 ± 9.4*
<i>150</i>	65.8 ± 8.9*	58.7 ± 4.1*	85.3 ± 16.2*
<i>165</i>	74.7 ± 9*	41 ± 3.7 ⁺	90.7 ± 11.8* ⁺
<i>180</i>	82.5 ± 10.*	32.1 ± 5.8 ⁺	113.6 ± 8.6* ⁺
<i>195</i>	79.2 ± 9.6*	35.8 ± 5 ⁺	115.8 ± 8.9* ⁺
<i>210</i>	70.6 ± 12.6*	42.3 ± 4.9 ⁺	101.7 ± 9.4* ⁺
<i>225</i>	74.8 ± 7.5*	38.1 ± 6 ⁺	105 ± 10.1* ⁺
<i>240</i>	72.9 ± 11.2*	35.7 ± 4.5 ⁺	112.3 ± 14.5* ⁺
<i>255</i>	62.8 ± 10.9*	27.3 ± 5.6 ⁺	104.8 ± 12* ⁺
<i>270</i>	69.7 ± 8.8*	41.5 ± 6.9 ⁺	101.6 ± 12.7* ⁺
<i>285</i>	48.7 ± 7.5	43 ± 7.3	103.7 ± 18.5* ⁺
<i>300</i>	54.3 ± 12.4	36.2 ± 5.8	99.5 ± 14.2* ⁺
<i>315</i>	54.9 ± 8.2	41.1 ± 7.6	85.6 ± 13.8* ⁺
<i>330</i>	40.8 ± 5.9	43.5 ± 6.7	70.9 ± 12.3* ⁺

Valores medios (n=10) y EEM.

Resultados expresados en g de alimento ingerido/100g de peso del animal.

* indica diferencias significativas entre los valores basales y cada grupo experimental (p< 0,05).

+ indica diferencias significativas entre cada grupo inyectado con el fármaco y el vehículo (p< 0,05).

Tabla 8: Efecto de la administración cerebroventricular de WIN 55,212 y AM 251 sobre la liberación del metabolito de la serotonina (5HIAA) en el hipotálamo ventromedial de las ratas presaciadas

	<i>Vehículo</i>	<i>WIN (1ug)</i>	<i>AM (1ug)</i>
<i>15</i>	451 ± 136	417 ± 101	470 ± 89
<i>30</i>	501 ± 129	430 ± 124	391 ± 101
<i>45</i>	439 ± 145	492 ± 111	455 ± 92
<i>60</i>	479 ± 139	460 ± 62	508 ± 91
<i>75</i>	832 ± 162	611 ± 170	520 ± 104
<i>90</i>	820 ± 174	694 ± 122	733 ± 128
<i>105</i>	1316 ± 195*	1376 ± 230*	1182 ± 185*
<i>120</i>	1215 ± 135*	1149 ± 100*	1099 ± 167*
<i>135</i>	1276 ± 151*	1078 ± 148*	1007 ± 199*
<i>150</i>	1106 ± 162*	1155 ± 112*	909 ± 132*
<i>165</i>	1179 ± 127*	529 ± 94 ⁺	1364 ± 159* ⁺
<i>180</i>	1094 ± 154*	648 ± 87 ⁺	1988 ± 208* ⁺
<i>195</i>	1198 ± 143*	520 ± 65 ⁺	1958 ± 227* ⁺
<i>210</i>	983 ± 126*	654 ± 89 ⁺	1602 ± 186* ⁺
<i>225</i>	1306 ± 182*	523 ± 130 ⁺	2125 ± 302* ⁺
<i>240</i>	875 ± 186*	571 ± 90 ⁺	1394 ± 174* ⁺
<i>255</i>	920 ± 192*	560 ± 168	1012 ± 153*
<i>270</i>	697 ± 94	620 ± 121	822 ± 122*
<i>285</i>	621 ± 123	400 ± 93 ⁺	894 ± 125* ⁺
<i>300</i>	473 ± 73	565 ± 80	695 ± 141
<i>315</i>	512 ± 141	496 ± 102	839 ± 127* ⁺
<i>330</i>	589 ± 119	511 ± 127	942 ± 158* ⁺

Valores medios (n=10) y EEM.

Resultados expresados en g de alimento ingerido/100g de peso del animal.

* indica diferencias significativas entre los valores basales y cada grupo experimental (p< 0,05).

+ indica diferencias significativas entre cada grupo inyectado con el fármaco y el vehículo (p< 0,05).

Tabla 9: Cambios en el número de las neuronas marcadas con el anticuerpo frente al NPY en el núcleo arcuato en respuesta a la inyección intracerebroventricular de AM 251 y WIN 55,212-2.

	Nombre de las neuronas marcadas con el anticuerpo frente al NPY
Vehículo	2832 ± 109.36 ^b
WIN 55 (1µg)	3030 ± 115.15 ^b
AM 251 (1µg)	1123 ± 34.65 ^a

Valores medios (n=4) y EEM.

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas (p< 0,05).

Tabla 10: Cambios en la ingesta de alimentos en respuesta a la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2.

	Vehículo	WIN 0.5mg/kg	WIN 2mg/kg	WIN 5mg/kg
<i>Primer día</i>	10.11 ± 0.30 ^b	10.44 ± 0.31 ^b	9.91 ± 0.28 ^b	7.5 ± 0.37 ^a
<i>Segundo día</i>	9.80 ± 0.32 ^b	9.39 ± 0.13 ^b	9.58 ± 0.42 ^b	6.99 ± 0.29 ^a
<i>Tercer día</i>	9.85 ± 0.34 ^b	9.89 ± 0.21 ^b	9.44 ± 0.41 ^b	6.82 ± 0.24 ^a
<i>Cuarto día</i>	9.66 ± 0.29 ^b	9.38 ± 0.21 ^b	8.97 ± 0.38 ^b	6.73 ± 0.38 ^a
<i>Quinto día</i>	9.3 ± 0.26 ^b	8.97 ± 0.21 ^b	9.26 ± 0.40 ^b	6.45 ± 0.37 ^a
<i>Sexto día</i>	9.14 ± 0.22 ^b	8.95 ± 0.20 ^b	8.59 ± 0.29 ^b	6.46 ± 0.37 ^a
<i>Séptimo día</i>	9.17 ± 0.17 ^b	8.91 ± 0.16 ^b	8.91 ± 0.36 ^b	6.73 ± 0.28 ^a
<i>Octavo día</i>	8.57 ± 0.25 ^b	8.66 ± 0.16 ^b	8.36 ± 0.26 ^b	6.50 ± 0.29 ^a
<i>Noveno día</i>	8.44 ± 0.21 ^b	8.34 ± 0.17 ^b	8.34 ± 0.37 ^b	6.28 ± 0.26 ^a
<i>Décimo día</i>	8.46 ± 0.18 ^b	8.26 ± 0.12 ^b	8.33 ± 0.23 ^b	5.75 ± 0.15 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Resultados expresados en g de alimento ingerido/100g de peso del animal. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (p< 0,05)

Tabla 11: Cambios en la ingesta de alimentos en respuesta a la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de AM 251.

	Vehículo	AM 1mg/kg	AM 2mg/kg	AM 5mg/kg
<i>Primer día</i>	11.91 ± 0.28 ^c	9.29 ± 0.20 ^b	9.49 ± 0.39 ^b	7.65 ± 0.14 ^a
<i>Segundo día</i>	10.02 ± 0.19 ^b	8.79 ± 0.33 ^a	8.66 ± 0.41 ^a	8.02 ± 0.31 ^a
<i>Tercer día</i>	10.78 ± 0.24 ^c	9.34 ± 0.28 ^b	9.16 ± 0.31 ^b	7.91 ± 0.29 ^a
<i>Cuarto día</i>	10.38 ± 0.34 ^b	8.52 ± 0.29 ^a	8.5 ± 0.21 ^a	7.82 ± 0.27 ^a
<i>Quinto día</i>	10.04 ± 0.25 ^b	8.59 ± 0.31 ^a	8.25 ± 0.36 ^a	7.97 ± 0.30 ^a
<i>Sexto día</i>	9.82 ± 0.17 ^b	8.37 ± 0.26 ^a	8.1 ± 0.28 ^a	7.94 ± 0.26 ^a
<i>Séptimo día</i>	9.77 ± 0.17 ^b	7.94 ± 0.26 ^a	8.02 ± 0.21 ^a	7.82 ± 0.34 ^a
<i>Octavo día</i>	9.5 ± 0.18 ^b	7.98 ± 0.18 ^a	8.35 ± 0.35 ^a	8.23 ± 0.23 ^a
<i>Noveno día</i>	9.5 ± 0.28 ^b	8.16 ± 0.11 ^a	8.03 ± 0.27 ^a	8.07 ± 0.20 ^a
<i>Décimo día</i>	9.14 ± 0.17 ^b	8.22 ± 0.16 ^{ac}	8.93 ± 0.41 ^{bc}	7.72 ± 0.18 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Resultados expresados en g de alimento ingerido/100g de peso del animal. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (p< 0,05).

Tabla 12: Cambios en la ingesta de bebida en respuesta a la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2.

	Vehículo	WIN 0.5mg/kg	WIN 2mg/kg	WIN 5mg/kg
<i>Primer día</i>	16.27 ± 0.47 ^b	17.50 ± 0.49 ^b	15.26 ± 0.62 ^b	13.53 ± 0.32 ^a
<i>Segundo día</i>	11.82 ± 0.39 ^b	11.3 ± 0.29 ^b	11.95 ± 0.41 ^b	9.64 ± 0.55 ^a
<i>Tercer día</i>	11.99 ± 0.15 ^b	12.73 ± 0.20 ^b	12.27 ± 0.64 ^b	10.69 ± 0.39 ^a
<i>Cuarto día</i>	11.95 ± 0.28 ^b	12.13 ± 0.33 ^b	12.14 ± 0.53 ^b	10.37 ± 0.54 ^a
<i>Quinto día</i>	12.91 ± 0.48 ^b	12.56 ± 0.29 ^b	12.34 ± 0.77 ^b	10.88 ± 0.37 ^a
<i>Sexto día</i>	12.05 ± 0.21 ^b	12.5 ± 0.18 ^b	12.07 ± 0.6 ^b	10.45 ± 0.36 ^a
<i>Séptimo día</i>	12.09 ± 0.25 ^b	11.72 ± 0.41 ^b	12.36 ± 0.59 ^b	10.56 ± 0.62 ^a
<i>Octavo día</i>	11.98 ± 0.16 ^a	11.72 ± 0.33 ^a	11.6 ± 0.54 ^a	10.40 ± 0.46 ^a
<i>Noveno día</i>	11.62 ± 0.37 ^b	11.26 ± 0.27 ^b	12.07 ± 0.57 ^b	10.82 ± 0.11 ^a
<i>Décimo día</i>	10.86 ± 0.21 ^b	11.22 ± 0.27 ^b	11.88 ± 0.59 ^b	10.4 ± 0.54 ^b

Valores medios (n=10) y EEM.

Resultados expresados en g de agua bebida/100g de peso del animal. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (p< 0,05).

Tabla 13: Cambios en la ingesta de bebida en respuesta a la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de AM 251.

	Vehículo	AM 1mg/kg	AM 2mg/kg	AM 5mg/kg
<i>Primer día</i>	18.03 ± 0.47 ^c	16.37 ± 0.31 ^b	16.23 ± 0.43 ^b	13.13 ± 0.32 ^a
<i>Segundo día</i>	12.73 ± 0.51 ^b	11.3 ± 0.44 ^a	10.78 ± 0.54 ^a	9.24 ± 0.76 ^a
<i>Tercer día</i>	12.81 ± 0.46 ^b	11.52 ± 0.27 ^a	11.28 ± 0.43 ^a	11.16 ± 0.36 ^a
<i>Cuarto día</i>	13.51 ± 0.51 ^b	10.84 ± 0.37 ^a	10.29 ± 0.56 ^a	9.98 ± 0.54 ^a
<i>Quinto día</i>	12.77 ± 0.45 ^b	11.77 ± 0.34 ^a	11.16 ± 0.43 ^a	11.74 ± 0.35 ^a
<i>Sexto día</i>	12.65 ± 0.57 ^b	11.16 ± 0.45 ^a	10.56 ± 0.56 ^a	9.84 ± 0.30 ^a
<i>Séptimo día</i>	12.61 ± 0.79 ^b	10.09 ± 0.44 ^a	10.75 ± 0.52 ^a	9.98 ± 0.56 ^a
<i>Octavo día</i>	13.21 ± 0.41 ^b	11.39 ± 0.33 ^a	11.16 ± 0.55 ^a	10.74 ± 0.35 ^a
<i>Noveno día</i>	12.91 ± 0.60 ^b	11.06 ± 0.31 ^a	11.11 ± 0.44 ^a	10.85 ± 0.41 ^a
<i>Décimo día</i>	12.28 ± 0.60 ^b	10.9 ± 0.57 ^a	10.7 ± 0.42 ^a	9.87 ± 0.42 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Resultados expresados en g de agua bebida/100g de peso del animal. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (p< 0,05).

Tabla 14: Cambios en el incremento de peso en respuesta a la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de WIN 55,212-2.

	DMSO	WIN 0.5mg/kg	WIN 2mg/kg	WIN 5mg/kg
<i>Primer día</i>	19.88 ± 1.66 ^b	19.53 ± 0.68 ^b	18.5 ± 0.7 ^b	16.6 ± 0.71 ^a
<i>Segundo día</i>	3.22 ± 1.07 ^b	2.1 ± 0.65 ^b	2.87 ± 0.83 ^b	-1.79 ± 0.84 ^a
<i>Tercer día</i>	4.86 ± 0.81 ^b	5.06 ± 0.55 ^b	3 ± 0.45 ^{ab}	2.12 ± 0.87 ^a
<i>Cuarto día</i>	5.02 ± 0.69 ^b	5.64 ± 0.62 ^b	4.88 ± 0.76 ^b	1.9 ± 0.92 ^a
<i>Quinto día</i>	4.26 ± 0.68 ^b	4.18 ± 0.58 ^b	3.60 ± 0.41 ^b	1.28 ± 1.01 ^a
<i>Sexto día</i>	3.36 ± 0.55 ^b	3.19 ± 0.76 ^b	3.86 ± 0.85 ^b	1.56 ± 0.44 ^a
<i>Séptimo día</i>	4.16 ± 0.89 ^b	3.65 ± 0.75 ^{ab}	4.56 ± 0.81 ^b	2.41 ± 0.53 ^a
<i>Octavo día</i>	4.01 ± 0.89 ^b	3.54 ± 0.64 ^b	3.31 ± 0.7 ^b	1.06 ± 0.9 ^a
<i>Noveno día</i>	3.49 ± 0.68 ^a	2.65 ± 0.61 ^a	3.94 ± 0.78 ^a	3.06 ± 0.75 ^a
<i>Décimo día</i>	3.27 ± 0.78 ^a	2.48 ± 1.01 ^a	3.59 ± 0.69 ^a	2.33 ± 0.56 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Resultados expresados como g/100g de peso del animal. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P < 0,05).

Tabla 15: Cambios en el incremento de peso en respuesta a la inyección intraperitoneal crónica de distintas dosis de AM 251.

	Vehículo	AM 1mg/kg	AM 2mg/kg	AM 5mg/kg
<i>Primer día</i>	13 ± 0.98 ^c	8.79 ± 0.77 ^b	8.79 ± 0.94 ^b	4 ± 0.12 ^a
<i>Segundo día</i>	4.19 ± 0.84 ^c	2.49 ± 0.82 ^b	0 ± 0.63 ^a	-1.81 ± 0.73 ^a
<i>Tercer día</i>	4.44 ± 0.63 ^b	4.43 ± 0.90 ^b	4.56 ± 1.06 ^b	0.87 ± 0.75 ^a
<i>Cuarto día</i>	3.84 ± 0.98 ^a	3.76 ± 0.67 ^a	3.4 ± 0.69 ^a	3.56 ± 0.56 ^a
<i>Quinto día</i>	4.1 ± 0.57 ^a	3.46 ± 0.56 ^a	4.31 ± 0.79 ^a	3.92 ± 0.96 ^a
<i>Sexto día</i>	3.41 ± 0.73 ^a	3.86 ± 0.59 ^a	3.49 ± 0.85 ^a	3.66 ± 0.74 ^a
<i>Séptimo día</i>	4.21 ± 0.78 ^a	3.98 ± 0.80 ^a	3.76 ± 0.58 ^a	3.9 ± 0.99 ^a
<i>Octavo día</i>	4.63 ± 0.38 ^a	4.16 ± 0.64 ^a	4.51 ± 0.75 ^a	5.24 ± 0.78 ^a
<i>Noveno día</i>	4.06 ± 0.60 ^a	3.94 ± 0.42 ^a	4.08 ± 0.71 ^a	4.12 ± 0.79 ^a
<i>Décimo día</i>	4.23 ± 0.63 ^b	4.64 ± 0.88 ^b	2.74 ± 0.63 ^a	3.53 ± 0.65 ^a

Valores medios (n=10) y EEM.

Resultados expresados en g de alimento ingerido/100g de peso del animal. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (p < 0,05).

V. DISCUSIÓN

Nuestros resultados apoyan la existencia de dos sistemas de regulación del control de la ingesta, que se llevan a cabo a nivel central y periférico, en los que el sistema endocannabinoide está implicado a través de receptores específicos. La acción central está mediada por receptores hipotalámicos CB₁ (Jamshidi y Taylor, 2001), mientras que la acción periférica está mediada por receptores CB₁ presentes en las terminales sensitivas nerviosas del tracto digestivo que son sensibles a la acción neurotóxica de la capsaicina (Gómez y col., 2002). Bajo nuestras condiciones experimentales, y de forma similar a lo que ha sido descrito por otros autores (Currie y col., 1996; Orozco y col., 2002), el mecanismo responsable del control de la ingesta implica la participación del hipotálamo y tiene lugar de forma paralela a un incremento de los niveles de serotonina (Fetissou y col., 2000), lo cual probablemente contribuye a la señal de saciedad. Los estudios inmunohistoquímicos, que se presentan en esta tesis, aportan datos sobre la intervención del neuropéptido Y en el efecto sobre la ingesta de los cannabinoides. Por otra parte, nuestros resultados también muestran que, además de este efecto sobre la ingesta de alimentos, los cannabinoides tienen efecto sobre la utilización nutritiva de la dieta y que este efecto varía en función de la dosis empleada.

V.1 Efectos de los cannabinoides sobre la ingesta de alimento y líquido y la liberación de 5-HT, su metabolito 5-HIAA y la inmunoexpresión de NPY

V.1.1 Efecto de la administración central de WIN 55,212-2 y AM 251 sobre la ingesta de alimento

La inyección intracerebroventricular de WIN 55,212-2 promueve hiperfagia a dosis pequeñas (1 µg) desde 1h hasta 24h, mientras que la inyección intracerebroventricular de AM 251 produce una hipofagia a dosis de 0.1 µg en ese mismo periodo de tiempo. Estos datos inducen a pensar que los cannabinoides actúan directamente, a través de receptores CB₁, que están implicados fuertemente en la regulación de la ingesta (Di Marzo y Matías, 2005; Wiley y col., 2005), y están presentes en el SNC y en los sistemas periféricos. En el cerebro, los receptores CB₁ se han identificado en las estructuras responsables de la recompensa y del balance energético (Cota y col., 2003; Robbe y col., 2003; Pickel y col., 2004), sobre diversos núcleos (núcleo paraventricular, ventromedial, arqueado y supraóptico del hipotálamo, núcleo del tracto solitario, núcleos del rafe). Estas estructuras regulan la ingesta y el metabolismo (Solomon y col., 2004). De hecho, los resultados obtenidos por Jamshidi y Taylor (2001) muestran que la administración directamente en el hipotálamo ventromedial de anandamida, agonista endógeno de los receptores CB, estimula la ingesta en ratas presaciadas. También Verty y colaboradores (2005) han confirmado que la inyección paraventricular de THC (5 µg) aumenta la ingesta mientras la inyección de SR 141716 A provoca un efecto contrario disminuyendo la ingesta.

V.1.2 Efecto de la administración periférica a corto plazo de WIN 55,212-2 y AM 251 sobre la ingesta de alimento y líquido

Las condiciones experimentales del presente estudio permiten precisar el efecto orexigénico de la administración de WIN 55,212-2 a ratas presaciadas. La existencia de receptores CB₁ a nivel periférico ha sido descrita ampliamente en la bibliografía, y muchos autores (Williams y Kirkham, 1999; Gómez y col., 2002) han observado una hiperfagia significativa dosis- dependiente después de la administración periférica de WIN 55,212-2 y anandamida. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la hiperfagia inducida tras la administración periférica de WIN 55,212-2 a dosis de 0.5, 1 y 2 mg/kg apareció poco después de la inyección de este agonista del receptor CB₁ y no guardó relación dosis-efecto. Así, el efecto orexígeno a corto plazo tras la inyección de dosis de 1 y 2 mg/kg se aprecia 1h, 2h, 4h y 6h tras la inyección y cuando se inyecta la dosis de 0.5mg/kg desaparece la hiperfagia a las 2h tras la inyección en que los animales responden aumentando la ingesta y posteriormente la mantienen similar a los controles, estos resultados indicarían que el fármaco se ha metabolizado en el periodo transcurrido hasta 2h de la inyección. El mecanismo que podría explicar estos resultados podría ser: a dosis de 1 y 2mg/kg es posible que se alcancen niveles en sangre suficientemente elevados para conseguir la activación de receptores centrales y periféricos, mientras que a dosis de 0.5mg/kg sólo se habrían activado los periféricos. Otros autores (Gómez y col, 2002) han demostrado que la administración periférica del WIN 55,212-2, a dosis de 0.4mg/kg y de 2mg/kg en ratas presaciadas, provoca una hiperfagia muy significativa 1h, 2h y 4h tras la inyección y que ésta es dosis dependiente.

La duración del efecto hiperfágico es diferente cuando se ensaya otro agonista de los receptores cannabinoides como es el THC, y así, Koch (2001) ha demostrado que la inyección intraperitoneal de este fármaco a dosis de 0.5 y 1mg/kg produce hiperfagia 1h 2h y 4 h tras la inyección mientras la dosis de 2.5 mg/kg no produjo ninguna diferencia significativa. También este efecto hiperfágico se observó inyectando THC a dosis de 3, 10 y 56 mg/kg mientras no se observó ningún efecto inyectando 1mg/kg (Wiley y col., 2005).

Por otra parte, Williams y Kirkham (1999) inyectando anandamida, ligando endógeno de los receptores cannabinoides, encontraron que se produce hiperfagia en ratas y que el efecto sobre el apetito puede ser variable dependiendo de la dosis y de las circunstancias experimentales. Resultados anteriores de nuestro laboratorio (en prensa) demostraron más concretamente que la metanandamida a dosis de 1 mg/kg peso ip produce una hiperfagia significativa a las 1h, 2h, 4h, 6h e incluso a las 24h tras la inyección.

Por el contrario, tras la administración periférica del agonista WIN 55,212-2 a dosis elevadas (5 mg/kg), se observó un efecto opuesto, que consiste en la anorexia como resultado probablemente de la inhibición de la actividad motora. Gómez y col (2002) también confirman este efecto inyectando una dosis de 10mg/kg, que produce una profunda

inmovilidad la cual interfiere con el comportamiento alimentario. De hecho, en experimentos dedicados a la evaluación del efecto del agonista de los receptores cannabinoides sobre la actividad motora en campo abierto “open field”, nuestros resultados indican que la inyección del WIN 55,212-2, a dosis de 5mg/kg produce una reducción significativa de la actividad locomotora. Este efecto del WIN 55,212-2 se generaliza también a la conducta exploratoria asociada a la locomoción, ya que se induce inmovilidad, incapacidad para iniciar movimientos, lo cual produce catalepsia, según Dewey (1986).

En este sentido es interesante destacar que la gran cantidad de receptores CB₁ que se han localizado en el cerebelo y en los ganglios basales apoya la existencia de un sistema endocannabinoide que regula la actividad motora (Rodríguez de Fonseca y col, 1998), lo que a su vez puede influir en la ingesta. La administración aguda de cannabinoides psicoactivos produce a dosis bajas un efecto estimulador de corta duración de la actividad motora, y a dosis altas una profunda inhibición de esta actividad.

La administración aguda a nivel periférico del agonista inverso/ antagonista de los receptores CB₁, AM 251, revierte el efecto de WIN 55,212-2 sobre la ingesta de alimentos, lo que concuerda con datos recientes que confirman su efecto anoréxico por bloqueo de los receptores CB₁. En este sentido, la disminución significativa de la ingesta se observa desde la primera hora tras la inyección y continúa a las 2, 4, 6 y 24 h, y el efecto es dosis dependiente, siendo la mayor caída de la ingesta la que se observa a dosis de 5 mg/kg peso. Mc Laughlin y colaboradores (2005) han demostrado también que la administración periférica aguda del AM 251 a dosis de 4 y 8 mg/kg disminuye la ingesta de alimentos provocando una hipofagia significativa dosis dependiente, mientras no se observaron diferencias significativas inyectando 2mg/kg. Chambers y colaboradores (2004) han observado que la administración de AM 251 a dosis de 5mg/kg produce hipofagia 1h, 2h y 3h tras la inyección. Shearman y colaboradores (2003) han inyectado el AM 251 a dosis de 3, 10 y 30mg/kg y han observado que 2h tras la inyección había una disminución significativa de la ingesta a dosis de 10 y 30mg/kg mientras 4h tras la inyección se observó este efecto a dosis de 3 y 30mg/kg.

Otros autores (Rinaldi-Carmona y col, 1994) han demostrado que la inyección periférica del SR 141716, antagonista selectivo de los receptores CB₁, provoca hipofagia probablemente antagonizando las acciones de los endocannabinoides liberados de forma endógena como son la anandamida y el 2-araquidonoilglicerol (Arnone y col., 1997; Colombo y col., 1998; Simiand y col., 1998; Kirkham y Williams, 2001). También estos resultados concuerdan con los descritos por Gómez y colaboradores (2002) que observaron a dosis de 1 y 3 mg/kg una disminución significativa dosis dependiente de la ingesta de alimentos 30 minutos, 1h y 2h tras la administración del SR141716A.

Wiley y colaboradores (2005) han demostrado que 1h tras inyección del SR141716A a dosis de 1, 3, 10 y 30 mg/kg disminuye significativamente la ingesta de alimentos, también

han observado un efecto similar inyectando dos análogos estructurales del SR141716A, el O-3259 y el O-3257. Thornton-Jones y col., 2005 han observado una disminución significativa de la ingesta inyectando SR 141716A a dosis de 1 y 3mg/kg mientras no había ningún efecto significativo inyectando una dosis de 1mg/kg. Gardner y Mallet (2006) observaron también este efecto hipofágico inyectando el antagonista SR 141716A a dosis de 3mg/kg, este efecto se observó 1h, 2h, 3h y 4h tras la inyección. Otros autores (Verty y col, 2004) han descrito que este antagonista de los receptores cannabinoides suprime la ingesta significativamente, con independencia de la composición de la dieta estudiada, sin afectar a la actividad locomotora. El antagonista SR141716A, disminuye el consumo de alimento en ratas (Rinaldi-Carmona y col., 1994; Arnone y col., 1997; Carai y col., 2004), atenúa el consumo de alcohol en ratones (Wang y col., 2003), e inhibe el efecto orexigénico de anandamida en ratas (Williams y Kirkham, 1999). El SR141716A es particularmente potente en la inhibición de la ingesta en animales genéticamente obesos tales como ratones ob/ob, ratones db/db, ratas fa/fa Zucker y animales alimentados con dietas altas en grasas (Di Marzo y col., 2001; Vickers y col., 2003).

Recientemente, un análogo de Δ^8 -tetrahidrocannabinol, con una alta afinidad para los receptores cannabinoides CB₁, fue desarrollado, este "antagonista silencioso" llamado O-2050 inhibe la ingesta a dosis de 3mg/kg sin aparecer ningún efecto significativo inyectando 0.3mg/kg, este efecto se observó 1h, 2h, 3h y 4h tras la inyección (Gardner y Mallet, 2006).

Con respecto a la ingesta de agua por parte de los animales inyectados con WIN 55,212-2, no parece estar claramente relacionada con la ingesta de alimento, excepto la primera hora tras la inyección en la que se observa una correlación entre estos dos parámetros. A dosis de 1 y 2 mg/kg la ingesta de líquidos es significativamente mayor, al igual que ocurre con la ingesta de alimentos, mientras que a dosis de 5mg la ingesta de sólidos y líquidos es menor que en el grupo control. Esta relación no se observa a partir de la primera hora de la inyección. Algunos autores (Verty et al, 2005) han señalado que el THC estimula la ingesta de alimentos pero no de agua. Además, la reducción de la actividad motora complica la interpretación de los datos de consumo de sólidos y líquidos, ya que no es posible determinar si el WIN 55,212-2, a dosis de 5mg/kg reduce la ingesta porque suprime el apetito y la sensación de sed o porque produce un efecto sedante, incluso la reducción de la ingesta de líquidos podría no deberse a ningún efecto central sino solamente a una menor necesidad de beber asociada a la menor ingesta.

La administración periférica aguda de las dosis ensayadas del AM 251 provoca también una disminución significativa de la ingesta de agua. Existe, por lo tanto, una correlación entre la ingesta de alimento y la ingesta de agua en las horas posteriores a la inyección. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Gardner y Mallet (2006) que han observado una disminución de la ingesta de agua inyectando el antagonista O-2050 a dosis de 3mg/kg.

Podría ocurrir que el AM 251 tenga un efecto directo sobre el hipotálamo disminuyendo la ingesta de líquidos o, sencillamente, que estos animales tengan unas necesidades menores de agua al tener reducida la ingesta de alimento, como hemos comentado anteriormente en el grupo inyectado con 5 mg/kg de WIN 55,212-2.

La administración periférica no permite distinguir entre los mecanismos centrales y periféricos de los cannabinoides puesto que los receptores CB₁ están también presentes en el tracto digestivo y los cannabinoides atraviesan la barrera hematoencefálica.

V.1.3 Efecto de los cannabinoides sobre la liberación de la serotonina y su metabolito y la inmunoexpresión de neuropéptido Y

Todas las áreas hipotalámicas y extrahipotalámicas sintetizan péptidos que producen diversas señales que a través de conexiones neuronales regulan la ingesta y la homeostasis energética (Broberger, 2005). Los neuropéptidos actúan normalmente por la vía de receptores acoplados a proteína G y pueden variar la actividad neuronal junto con la producción de neurotransmisores específicos (Hillebrand y col., 2002). Una serie de estímulos en diferentes sistemas relacionados con el estado metabólico son recibidos en el hipotálamo, los cuales modulan la liberación de péptidos hipotalámicos que regulan la ingesta alimentaria y el eje hipotálamo hipofisario (Leibowitz y Wortley., 2004).

Entre estos neuropéptidos podemos citar el neuropéptido Y (NPY) que es uno de los neurotransmisores más abundantes en el cerebro (Allen y col., 1983) y uno de los factores orexígenos más potentes (Edwards y col., 1999; Kalra y Kalra, 2004). La principal localización de este neuropéptido es el ARC, desde donde se prolongan fibras nerviosas al PVN, DMN y LH, estableciendo un efecto estimulador de la ingesta. El NPY interacciona con gran cantidad de neuronas orexigénicas y anorexigénicas, siendo la más evidente la relación con las productoras de proteína relacionada con agouti y su efecto inhibitor en neuronas productoras de melanocortina (Leibowitz y Wortley, 2004).

Para explorar las posibles interacciones entre los cannabinoides y una serie de neuropéptidos hipotalámicos, como el NPY, hemos estudiado el efecto de la inyección intracerebroventricular de WIN 55,212-2 y de AM 251 sobre la inmunoexpresión del NPY mediante la técnica de inmunohistoquímica. Hemos encontrado que la inyección intracerebroventricular de AM 251 produjo una disminución significativa del número de las neuronas marcadas por el anticuerpo frente al NPY, la disminución del marcaje nos indica una disminución de la cantidad de NPY en el interior de las neuronas y esto se debe a una disminución de la síntesis del NPY y/o un aumento de su liberación. Mientras la inyección intracerebroventricular de WIN 55,212-2 provocó un aumento en el número de estas neuronas, este aumento nos indica por lo tanto un aumento de la cantidad de NPY en el interior de las neuronas y eso se debe a un aumento en la síntesis de NPY y/o una disminución

de su liberación. Nuestros resultados están confirmados con estudios realizados por Gamber y colaboradores (2005) que han examinado el efecto del agonista de los receptores cannabinoides el CP55, 940 y el agonista inverso/antagonista AM 251 sobre la liberación del NPY utilizando un modelo experimental *in vitro* que utiliza secciones tratadas con dosis diferentes de los fármacos. Sus resultados han demostrado que los agonistas de los receptores cannabinoides, el CP55, 940 (100nM) y anandamida (10, 50 y 100nM), aumentan la liberación del NPY en el hipotálamo, lo que podría tratarse de un mecanismo para explicar la actividad orexigénica de los cannabinoides, mientras que al añadir AM 251 a diferentes concentraciones (0, 10, 100 y 1000 nM) se observó una inhibición de la liberación de NPY, que dosis dependiente.

Otros han demostrado que el NPY estimula la ingesta cuando se inyecta en el sistema ventricular del cerebro de ratas produciendo hiperfagia (Clark y col., 1984), hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. El NPY estimula preferentemente la ingesta de carbohidratos a través de receptores Y1 y Y5 que se expresan en los sitios hipotalámicos implicados en la regulación diaria del balance energético y del comportamiento de la ingesta, el ARC, el NPV, el DMH, el VMH y el LH (Kishi y col., 2005). Se ha demostrado que la señalización de los receptores Y1 juega un papel importante en el estímulo de la ingesta y de la obesidad, de hecho se ha visto que los cambios en el balance energético inducen una plasticidad marcada en la función y la expresión de estos receptores en las regiones específicas del hipotálamo (Eva y col., 2006).

De igual forma, inyecciones repetidas de NPY en el PVN producen obesidad en pocos días (Stanley y col., 1996) incrementando la actividad lipogénica en el tejido adiposo blanco y modificando la actividad del sistema nervioso autónomo y a la función neuroendocrina (Elmqvist y col., 1999). El NPY es el principal factor causante de hiperfagia y obesidad en situaciones con deficiencia de leptina (Erickson y col., 1996).

Poco se sabe del mecanismo de acción a través del cual los cannabinoides producen su conocido efecto orexigénico. Al ser el neuropéptido Y uno de los factores orexigénicos más potentes y un mediador principal en el control hipotalámico de la ingesta parece que la activación de los endocannabinoides a consecuencia de NPY media algunos de sus efectos orexigénicos, que están atenuados por la inhibición farmacológica o genética de los receptores CB₁. Sin embargo, el antagonista SR141716A es eficaz como agente anoréxico tanto en el grupo control como en ratones deficientes de NPY (Di Marzo y col., 2001), lo que indica que la inducción de la ingesta por los endocannabinoides no está mediada únicamente a través del NPY sino que probablemente existe una interacción de los cannabinoides con otros factores reguladores de la ingesta (grelina, CCK, orexinas, CRH...).

Además de las variaciones en el NPY producidas por la inyección de WIN 55,212-2 y AM 251, hemos estudiado la existencia o no de una interacción entre el SEC y el sistema

serotonérgico del hipotálamo medioventral a través de la evaluación de los efectos de la inyección intracerebroventricular de WIN 55,212-2 y AM 251 (1µg/5µl) sobre la liberación *in vivo* de la serotonina y su principal metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (el 5HIAA).

Los resultados obtenidos indican que el inicio de la ingesta se acompaña, en el núcleo ventromedial hipotalámico, de un incremento progresivo en la liberación basal de serotonina y en las concentraciones extracelulares del 5HIAA. Estos datos confirman los de la bibliografía que indican que el incremento en la liberación de serotonina a partir del hipotálamo, observado después del inicio de la ingesta, se considera como un señal de saciedad (Currie, 1996; Orozco y col., 2002), de acuerdo también con numerosos datos que indican que la inervación serotonérgica de diferentes núcleos hipotalámicos está relacionada con la regulación y el control de la ingesta diaria y el metabolismo energético y que la 5-HT hipotalámica pudiera desempeñar un papel como señal de saciedad (Fetissov y col., 2000).

Halford y colaboradores (2005) han encontrado que la 5-HT está implicada en el proceso de saciedad, y de los numerosos subtipos de los receptores 5-HT identificados actualmente para mediar este proceso de saciedad son los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2c}. Las correlaciones funcionales entre la serotonina y, CCK o NPY también fueron sugeridas, que eran a través de los receptores 5-HT_{2A}, de 5-HT_{2C}, o de 5-HT_{2A(2C)} (Samanin y Garatini, 1996; Curzon y col., 1997). La serotonina y sus agonistas inhiben la ingesta cuando se administran periféricamente o centralmente en animales (Leibowitz, 1989). La administración de mCPP (agonista de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2c}) en el VMH provoca una reducción de la ingesta acompañada de un aumento en la concentración extracelular de 5-HT (Hikiji y col., 2004) Los estimulantes de esta monoamina reducen el aumento de peso aumentando el gasto energético en animales y seres humanos por su acción en el hipotálamo ventromedial.

Datos recientes indican que la serotonina y los agonistas de receptores 5HT1 y 5HT2 bloquean el efecto hiperfágico producido por la administración en diferentes núcleos del hipotálamo, del neuropeptido Y (NPY) (Currie y col., 1999; 2002). Así se puede especular que el bloqueo del sistema serotonérgico hipotalámico puede ser uno de los mecanismos utilizados por los fármacos que estimulan la ingesta.

La administración central de WIN 55,212-2 (1µg/5µl) induce en estos animales, comparados a animales inyectados con el vehículo, una disminución significativa en la liberación basal de serotonina, mientras la administración central de AM 251 (1µg/5µl) produce un incremento significativo en relación al obtenido en animales controles. Esto está confirmado con recientes estudios realizados por Avraham y Verty (2004) que han demostrado que la administración central del Δ⁸-THC o de Δ⁹-THC estimula la ingesta y reduce el contenido tisular del 5-HT en el hipotálamo y en el hipocampo. Hao y colaboradores (2000) han encontrado que la inyección intraperitoneal de dosis pequeña de

anandamida (1µg/kg) promueve hiperfagia y disminuye la concentración de serotonina en el hipotálamo.

Estos datos confirman los de la bibliografía que indican que la ingestión de alimentos se acompaña de un incremento de la liberación de serotonina y muestran que los efectos estimuladores de los agonistas cannabinoides sobre la ingesta están relacionados, al menos en parte, con una inhibición del incremento en la liberación de serotonina inducido por la ingesta. Así, uno de los efectos de los cannabinoides relacionados con la estimulación de la ingesta puede ser la inhibición o el “retraso en tiempo” de la transmisión serotoninérgico del hipotálamo medio implicada en la regulación de los procesos de saciedad tal como demuestra Balázsa y colaboradores (2008) que sugieren que una subpoblación de neuronas serotoninérgicas aferentes no sinápticas expresa los receptores CB1 y la activación de estos receptores produce una disminución de la liberación de 5-HT. Este efecto inhibitorio puede ser relacionado con el bloqueo de los canales de calcio sensibles al voltaje acoplados a la transmisión sináptica.

Se han demostrado que los receptores CB1 están presentes en un subconjunto de neuronas serotoninérgicas en el cerebro (Haring y col., (2007); Lau y Schloss, 2008). Estos resultados apoyan el concepto que existe una interferencia directa entre el SEC y las neuronas serotoninérgicas. Los efectos observados de la activación exógena y/o endógena de los receptores CB1 sobre la liberación de la serotonina (Nakazi y col., 2000; Egashira y col., 2002; Darmani y col., 2003; Tzavara y col., 2003) pueden ser debidos por lo menos en parte a una acción directa de los receptores CB1 sobre los terminales serotoninérgicos.

De hecho, se ha demostrado que la activación de los receptores CB₁ centrales inhibe la liberación sináptica de diferentes neurotransmisores, como la noradrenalina, el ácido glutámico y la acetilcolina en diferentes cerebrales. Así, la inhibición de la liberación presináptica de neurotransmisores puede ser uno de los mecanismos fundamentales de los cannabinoides. Por otra parte, este resultado parece estar confirmado por los datos obtenidos con el agonista inverso/ antagonista, el AM 251.

El efecto combinado de los cannabinoides sobre ambos tipos de canales (calcio y potasio) parece ser la base de su efecto antagonista sobre la liberación de los neurotransmisores. La activación de los receptores CB₁ atenúa la actividad neuronal por la inhibición presináptica de la liberación de los neurotransmisores y de la hiperpolarización postsináptica (Freund y col., 2003). El estudio de Köfalvi y col., 2005 permitió una visualización directa de los receptores CB₁ por primera vez en los terminales catecolaminérgicos en el cuerpo estriado. La inhibición presináptica de la liberación de los neurotransmisores por los cannabinoides parece ser más eficaz debido a dos hechos: Primero, los receptores CB₁ aparecen estar presentes en una densidad más alta en el terminal presináptico (Herkenham y col., 1991; Twichell y col., 1997). Segundo, la activación de los

canales de potasio por los cannabinoides pueden amplificar una inhibición presináptica de los canales de calcio reduciendo la duración del potencial de acción.

Nuestros resultados nos permiten sugerir, que la acción del AM 251, se ejerce al menos en parte, por la acción sobre los receptores cannabinoides centrales e implica principalmente a los receptores CB₁ hipotalámicos. En efecto, la administración central del AM 251 (1µg/5µl) provoca un incremento en la liberación basal de serotonina y esto puede explicar, al menos en parte, su efecto anoréxico. Así, el AM 251 parece producir sus efectos anoréxicos incrementando los mecanismos de la sensación de saciedad.

V.1.4 Efecto de la administración periférica a largo plazo de WIN 55,212-2 y AM 251

V.1.4.1 Ingesta y cambios ponderales:

En nuestras condiciones experimentales cuando los animales consumen la dieta estandar de laboratorio con un 16% de proteína y un peso inicial medio de 190g, se observa que la inyección diaria de 0.5 y de 2 mg/kg de peso de WIN 55,212-2 durante el periodo experimental no produce ningún efecto sobre la ingesta de alimento. Así, cuando se estudia día a día la evolución de la ingesta, no aparecen diferencias significativas respecto a los controles, la falta del efecto del fármaco puede deberse a su rápida metabolización, su efecto no dura más allá de 6h como hemos visto en los experimentos a corto plazo, así 24 h tras la inyección no se observaba ningún efecto sobre la ingesta. Por otra parte, las ratas inyectadas con WIN 55,212-2 a dosis de 0.5 y 2 mg/kg de peso experimentan un incremento de peso similar a las ratas del grupo control.

Avraham y col (2004) han encontrado que el efecto de la administración crónica de THC sobre la ingesta de alimento durante 9 días era bifásico y que tanto 0.001 mg/kg como 1mg/kg aumentan considerablemente la ingesta, mientras las dosis intermedias de 0.1 y 0.01mg/kg (0.01/0.1) no causaron ningún cambio significativo. En estos experimentos, el aumento de la ingesta no se tradujo en un aumento de peso de los animales, Avraham y col (2004) han asumido que la ausencia del aumento de peso en el grupo tratado pudo haber sido debido al aumento significativo de la actividad observada. Las dosis bajas de THC podían estimular la actividad motora, según lo indicado por la hiperlocomoción observada, e inducen comportamiento dirigido ipsilateral en ratas con lesión unilateral de la sustancia negra por hidroxidopamina 6 (Sakurai y col., 1985). Chaperon y Thiebot (1999) también han registrado que los agonistas de los receptores cannabinoides, tales como THC, pueden inducir hiperactividad en dosis bajas.

La inyección de WIN 55,212-2 a dosis de 5 mg/kg de peso disminuye significativamente la ingesta y el incremento de peso, probablemente debido al efecto

narcótico del fármaco que altera la capacidad motora y produce somnolencia (Gómez y col., 2002; Jarbe y col., 2006). Este efecto es similar al que se observa cuando se estudia la inyección aguda del fármaco a dosis altas. La disminución significativa de la ingesta ocurre desde el primer día y continúa hasta el final del experimento.

El vehículo utilizado DMSO para la inyección de WIN 55,212-2 no produce por sí mismo ningún efecto ni sobre la ingesta ni sobre el incremento de peso de los animales cuando se compara con los resultados obtenidos en el grupo control. Izzo y colaboradores (1999) observaron que el DMSO (30µl/ratón) tampoco modificaba significativamente el tránsito intestinal.

Cuando se estudió el efecto de la inyección diaria de AM 251 a lo largo del periodo experimental (10 días) se observó una disminución progresiva de la ingesta de alimentos de los animales inyectados con el fármaco en comparación con el vehículo a partir del 2 día, lo que se puede atribuir mayoritariamente al efecto del fármaco, puesto que nuestro diseño experimental, manteniendo a las ratas en ayuno previamente al inicio del experimento presaciándolas a continuación, permite claramente observar el efecto de AM 251 sobre el nivel de ingesta.

Este efecto hipofágico del antagonista AM 251 concuerda con lo descrito por Chambers y col (2004) a dosis de 1.25, 2.5mg/kg durante 10 días, Chambers y colaboradores (2005) a dosis de 1 y 5mg/kg durante 30 días, 1mg diariamente mientras 5mg cada 5 días, y Hildebrandt y col (2003) a dosis de 3 y 30mg/kg, 14 días, los cuales observan una disminución significativa dosis dependiente de la ingesta de alimentos tras la administración crónica del fármaco. Otros autores (Colombo y col, .1998) han confirmado este efecto inyectando diariamente el antagonista de los receptores cannabinoides SR 141617 a dosis de 2.5 y 10mg/Kg 14 días.

Los datos aportados por la bibliografía (Chambers y col (2004), Zhou y col (2004), McLaughlin y col (2005) y Shearman (2003), describieron el efecto negativo de AM 251 sobre la ingesta tras la inyección aguda de fármaco, nuestro diseño experimental permite añadir que este descenso de la ingesta se mantiene tras la administración crónica.

El mantenimiento de los niveles plasmáticos de AM 251 y sus metabolitos podría producir un fuerte efecto inhibitor sobre los núcleos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta. Está generalmente aceptado que estas acciones hiperfágicas e hipofágicas de los agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides están mediadas por receptores CB₁ implicados fuertemente en la regulación de la ingesta (Di Marzo y Matías, 2005; Wiley y col., 2005). Estos receptores están presentes en el SNC y en los sistemas periféricos. En el cerebro, los receptores CB₁ se han identificado en las estructuras responsables de la recompensa y del balance energético (Cota y col., 2003; Robbe y col.,

2003; Pickel y col., 2004). Mientras en los sistemas periféricos, se han identificado en el intestino (Crocì y col., 1998; Kulkarni-Narla y Brown, 2000; Coutts y col., 2002), así como en los hepatocitos (Osei-Hyiaman y col., 2005) y en el tejido adiposo (Bensaid y col., 2003; Cota y col., 2003). También se han encontrado los receptores CB₁ en terminaciones nerviosas que inervan el tracto gastrointestinal (Crocì et al, 1998; Hohmann y Herhenham, 1999), que están implicadas en la mediación de señales de saciedad que se originan en el estómago (Reidelberger, 1992), lo que permite adscribir un papel en la regulación de la ingesta a los receptores CB₁ periféricos.

Con respecto a la ingesta de agua por parte de los animales inyectados con WIN 55,212-2 a dosis de 0.5 y 2mg/kg no se observaron diferencias significativas en comparación con el grupo control como se ocurrió con la ingesta de alimentos, mientras es significativamente menor a lo largo del periodo experimental al inyectar 5mg/kg.

La administración periférica crónica de las dosis ensayadas de AM 251 provoca una disminución significativa de la ingesta de agua. Existe, por lo tanto, una correlación entre la ingesta de alimento y la ingesta de agua. Nuestros resultados no coinciden con los obtenidos por Colombo y col (1998) que no han encontrado ningún efecto de la inyección crónica del SR 141716 a dosis de 2.5 y de 10mg/kg sobre la ingesta de agua.

A diferencia de lo que ocurre con la ingesta, no existe relación entre las dosis inyectadas de AM 251 y la pérdida de peso, lo que sugiere que otros factores relacionados con la utilización nutritiva del alimento influyen como veremos más tarde. Estos resultados son diferentes de lo que han descrito Chambers y col (2004) que observaron una pérdida de peso durante todos los días después de la inyección del fármaco. No obstante, existió una diferencia fundamental en el diseño experimental porque estos autores solamente han inyectado los animales una vez durante el tercer día mientras que nosotros hemos inyectado diariamente los animales.

Colombo y col (1998) también descubrieron una pérdida de peso inyectando diariamente 2.5 y 10mg/kg del SR 141716. El efecto del SR 141716 en la reducción de la ingesta y del peso corporal ha sido también estudiado por Vickers y col. (2003), encontrando que este efecto es mayor en animales obesos y que es reversible cuando se abandona el tratamiento.

La mayor parte de los efectos agudos observados tras la administración de cannabinoides desarrollan tolerancia cuando la administración se repite durante varios días. Esto se ha visto tanto en humanos como en animales de experimentación para efectos como la inhibición motora (Magur y col., 1977; Karler y col., 1984; Abood y col., 1993; Hutcheson y col., 1998), la hipotermia (Thompson y col., 1974; Hutcheson y col., 1998), la analgesia

(Martin, 1985) catalepsia (Pertwe, 1974), tránsito gastrointestinal (Anderson y col., 1974), peso corporal (Hutcheson y col., 1998) y otros efectos.

Se ha demostrado claramente que esta tolerancia está relacionada mayoritariamente con reducciones en la disponibilidad de los receptores para cannabinoides vegetales, sintéticos o endógenos en el cerebro (Maldonado, 2001), aunque puedan existir algunos cambios a nivel del metabolismo de estos compuestos (Rodríguez y col., 1991; Costa y col., 1996).

Los estudios de Childers y col (1996) han demostrado que los cambios a nivel de la densidad de estos receptores se acompañan de una profunda desensibilización medida en términos de la capacidad de los receptores de activar mecanismos de transducción de señales, en concreto a nivel de su capacidad de activar las proteínas G que juegan un papel relevante en la transducción de la señal a nivel de la membrana de las células nerviosas. Otros estudios también han demostrado que los cambios inducidos por la administración crónica de THC en los receptores de los cannabinoides CB₁ son reversibles, incluso cuando los animales eran tratados a largo plazo (3 meses en ratas y 7 meses en monos) (Westlake y col., 1991). De acuerdo con estos resultados, la tolerancia a los efectos farmacológicos de THC aparece a partir de 7 a 11 días después del final de un tratamiento crónico.

En nuestras condiciones experimentales no se observó el desarrollo de tolerancia al inyectar unas dosis de 1 y 5mg/kg de AM 251 con las que la ingesta seguía siendo significativamente menor que en los controles mientras que se observó al inyectar 2mg/kg el último día del experimento (décimo día) en que desaparecieron las diferencias significativas respecto al control.

Estos resultados concuerdan con lo que han descrito Chambers y col (2005) que no han observado la instauración de la tolerancia al inyectar ambas dosis del AM 251, 1 y 5mg/kg. Otros autores Hildebrandt y col (2003) han observado el desarrollo de la tolerancia a partir del 9 día al administrar 3mg/kg diariamente por vía oral.

Nuestros resultados son diferentes de lo que han descrito Colombo y col (1998), que han observado el desarrollo de la tolerancia al efecto inhibitor de la ingesta producido por el antagonista SR 141716, a partir del quinto día.

El control de la ingesta y los cambios de peso durante el periodo experimental nos ha permitido calcular los gramos de incremento de peso por gramo de proteína ingerida, que corresponde al índice Coeficiente de Eficacia en Crecimiento (CEC). Este índice se correlaciona bien con la calidad proteica. Observamos que el índice es similar en todos los grupos inyectados con diferentes dosis de WIN 55,212-2, lo que indica que han utilizado la proteína de la dieta con eficacia, incluso el grupo inyectado con 5 mg/kg, que tienen un

incremento de peso significativamente menor que los otros, tiene un CEC similar para una menor ingesta.

La relación entre la ingesta y los cambios de peso a través del CEC indica que AM 251 a dosis de 2 y 5mg/kg produce una disminución de la eficacia de la utilización de la proteína de la dieta ya que la disminución de la ingesta se ha traducido en un incremento de peso menor de lo esperado en términos relativos.

No observamos diferencias significativas en el CEC entre el grupo inyectado con 1mg en relación al inyectado con el vehículo, lo que indica que la disminución de la ingesta ha sido proporcional a la pérdida de peso experimental.

V.2- Efecto de los cannabinoides sobre la utilización digestiva y metabólica de proteína y minerales

V.2.1- Efecto de la inyección diaria de WIN 55,212-2 (dosis 0.5, 2 y 5mg/kg)

V.2.1.1- Sobre la utilización digestiva

La capacidad para absorber la proteína y minerales de la dieta se ha evaluado en función del Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA), calculado como la relación porcentual entre la cantidad de nitrógeno ó minerales absorbidos en relación al nitrógeno ó minerales ingeridos, sin tener en cuenta las pérdidas endógenas.

Observamos que en el grupo inyectado con WIN 55,212-2 a dosis de 0,5 y 2 mg/kg hay un aumento significativo del CDA de nitrógeno, calcio, magnesio y zinc para una ingesta muy similar al grupo control, lo cual implica una mejora de la utilización digestiva de estos nutrientes, es decir un buen nivel de absorción de nitrógeno y minerales. En nuestras condiciones experimentales se observa, de hecho, una reducción significativa del contenido en nitrógeno y minerales de las heces y de la cantidad de heces excretadas. Esto podría ser debido en parte al efecto que este agonista de los cannabinoides produce reduciendo la defecación, al parecer activando los receptores CB₁ (Izzo y col, 1999). Se ha demostrado que su activación por los cannabinoides endógenos así como por los agonistas sintéticos disminuye el peristaltismo intestinal (Calignano y col., 1997; Colombo y col., 1998; Izzo y col., 1999, 2000; Krowicki y col., 1999; Vigna, 2003). Estos receptores se han podido identificar en el plexo mientérico de hamsters (Griffin y col, 1997) y de otras especies animales (Griffin y col., 1997; Kulkarni-Narla y Brown, 2000; Pinto y col., 2002). Varios agonistas de los receptores CB₁, como la anandamida, cannabinoil, WIN 55,212-2, y CP 55-940 inhiben la motilidad gástrica e intestinal en ratas y ratones (Di Carlo y Izzo, 2003).

Los receptores CB₁ se han encontrado en el sistema digestivo (Pertwee, 2001), donde median varias funciones, incluyendo la inhibición de la secreción gástrica (Coruzzi y col.,

1999; Adami y col., 2002), la contractilidad y el vaciado gástrico (Izzo y col., 1999; Krowicki y col., 1999), la motilidad intestinal (Landi y col., 2002; Casu y col., 2003), y las secreciones intestinales (Izzo y col., 2003), así como aumento de la defensa mucosal gástrica (Germanó y col., 2001).

Los agonistas de los receptores cannabinoides reducen la acumulación del fluido intestinal in vivo (Izzo y col., 1999; Tyler y col., 2000; Pertwee, 2001), lo cual puede ser considerado un índice del nivel de secreciones digestivas. Sin embargo, no se sabe si este efecto de los cannabinoides sobre la acumulación del fluido implicó una acción inhibitoria directa sobre el transporte mucosal, produciendo cambios en la motilidad intestinal, o era debido a los cambios en el flujo intestinal sanguíneo. Todo esto podía producir la inhibición significativa de la acumulación del fluido intestinal. Los resultados de Tyler y colaboradores (2000), sugieren que los agonistas de los receptores cannabinoides pueden producir sus efectos antisecretorios a través de un mecanismo neuronal, que con toda probabilidad, implican la inhibición de la secreción del acetilcolina de las neuronas del plexo submucosal.

Bajo nuestras condiciones experimentales parece que la acción inhibidora sobre la motilidad ha predominado sobre la acción inhibidora sobre las secreciones digestivas, lo cual explica el aumento en la absorción de nutrientes observado.

En el grupo inyectado con WIN 55,212-2 5mg/kg se observa un aumento del CDA de nitrógeno en relación al control aunque no se alcanza un valor numérico tan elevado como en el grupo inyectado con WIN 55,212-2 a dosis de 0,5 y 2 mg/kg. Sin embargo esta mejora de la utilización digestiva tiene una importancia relativa mayor, ya que en este grupo experimental la inyección del fármaco produce una disminución significativa de la ingesta. El mecanismo por el cual se ha podido forzar la absorción de nitrógeno puede haber estado influido, por el efecto del WIN 55,212-2 reduciendo la defecación, y el hecho de que el CDA no llegue a alcanzar el mismo valor puede deberse en parte a que el WIN 55,212-2 también produce una disminución del volumen de fluido intestinal que es significativo a partir de 1 mg/kg (Izzo et al, 1999). Al haber menos secreciones digestivas será también menor la capacidad de digestión y absorción del alimento. Es posible que a dosis de 2 mg/kg exista un equilibrio entre cantidad de alimento ingerido y nivel de secreción gástrica requerida para su digestión, pero que este equilibrio se rompa para dosis de 5 mg/kg en que predomine el efecto inhibitorio de la secreción sobre el efecto inhibitorio de la motilidad, y por ello la absorción no llega a ser tan elevada. Otro factor que podría influir en la regulación de la función intestinal son las taquikinas. Las taquikinas endógenas, la neurokina A y la sustancia P, tienen un potente efecto espasmogénico sobre el digestivo de los mamíferos a través de la activación de receptores NK₁ y NK₂. (Holzer- Petsche 1995). El WIN 55,212-2 disminuye la respuesta contráctil de las taquikinas (Izzo et al 1998). Esta disminución en la motilidad podría explicar la menor excreción fecal y la mayor utilización digestiva observada.

Al contrario de lo que se observa para el nitrógeno, la inyección de 5 mg de WIN 55,212-2 disminuye el CDA (Ca, P, Mg) debido a la menor ingesta (la caída de la ingesta ha podido ser tan grande que no permite forzar la absorción), a pesar de la menor excreción fecal en relación al control. En el caso del Zn el CDA de ratas inyectadas con 5 mg es mayor que el control y que el obtenido con cualquiera de las otras dosis; estas ratas presentan una ingesta de Zn muy baja pero la excreción fecal se reduce en proporción mayor que con los otros minerales, lo que da lugar a una absorción neta de este mineral 2/3 mayor que el control y similar a los otros grupos tratados.

V.2.1.2 Sobre la utilización metabólica

La utilización metabólica se ha determinado en función de los índices balance de nitrógeno ó minerales (diferencia entre la cantidad ingerida y la excretada en heces y orina) y el porcentaje de nitrógeno o minerales retenidos en función de las cantidades absorbidas (%R/A).

Observamos que en las ratas inyectadas con WIN 55,212-2 a dosis de 0,5 mg/kg la mejora en la utilización digestiva va acompañada de una mayor retención de nitrógeno porque la eliminación urinaria es más baja en relación a los animales del grupo control. Esta menor eliminación urinaria de nitrógeno obtenida inyectando una dosis baja de WIN 55,212-2 podría estar relacionada con el efecto inhibitor sobre la filtración glomerular descrito por Koura y colaboradores (2004) para el agonista endógeno de los receptores cannabinoides anandamida. También en este grupo el CEC era ligeramente más alto que en los otros y se obtienen valores significativamente más altos de %R/A, lo que indica que, además del efecto a nivel digestivo del WIN aumentando la absorción, también existe un efecto a nivel metabólico mejorando la retención de nitrógeno para recambio proteico del animal. A dosis de 2 mg/kg la mayor absorción porcentual de nitrógeno no conduce a retenciones mayores de este nutriente que en el grupo control, debido a su mayor excreción urinaria.

En las ratas inyectadas con WIN 55,212-2 a 5 mg/kg el balance de nitrógeno es significativamente menor que en el resto de grupos experimentales debido sobre todo a la menor ingesta. No obstante, al producirse en este grupo experimental una mejora del CDA y una disminución de la excreción urinaria, el índice %R/A es similar a los demás grupos, lo cual refleja un buen aprovechamiento metabólico de la proteína. De hecho, este índice podría haber alcanzado un valor más alto si la calidad de la proteína de la dieta hubiera sido mejor (las dietas experimentales empleadas son pienso estándar de laboratorio), los animales han tenido unas necesidades de nitrógeno muy altas con un balance muy bajo y podrían forzar aún más la utilización metabólica de la proteína para hacer frente a ellas. En cualquier caso, ante una menor ingesta de alimento han funcionado los mecanismos de compensación a nivel digestivo y metabólico con el fin de mantener un adecuado aporte de nitrógeno para cubrir las necesidades de los animales.

La inyección de WIN 55,212-2 a dosis de 0,5 y 2 mg/kg conduce a valores elevados de utilización metabólica de Ca, P, Mg y Zn, que son iguales o superiores al control. Por el contrario la dosis de 5 mg/kg condujo a un descenso significativo en la utilización metabólica de P y Mg, no observándose diferencias apreciables con respecto al control en la utilización metabólica de Ca y Zn.

En general, los animales preservan con eficacia los minerales absorbidos, como se refleja por el alto valor de %R/A. Incluso a las dosis más elevadas del fármaco la utilización metabólica es muy alta, excepto para fósforo y magnesio. A dosis de 5mg/kg hay un aumento de la excreción urinaria de P y una reducción acusada de la ingesta, que se reflejan en una disminución del %R/A y en un balance muy bajo. En el caso del Mg no se retiene prácticamente nada porque la absorción es muy reducida, debido a que junto a una ingesta muy limitada se produce una alta excreción fecal, y, aunque el riñón elimina una cantidad muy pequeña, deja al animal en balance cero. Además, la interacción calcio-magnesio ha podido influir en la absorción del magnesio, ya que la ingesta de calcio es muy superior a la de magnesio y, como es conocido, ambos iones compiten por transportadores similares (Aranda y col., 2007).

V.2.2- Efecto de la inyección diaria de AM 251 (dosis 1, 2 y 5mg/kg)

V.2.2.1- Sobre la utilización digestiva

La inyección de AM 251 a dosis de 1 y 2 mg/kg produce una hipofagia significativa y una disminución significativa del CDA de nitrógeno, calcio, fósforo, y zinc. Este resultado podría ser consecuencia de la menor ingesta o de la inyección del fármaco, por ello se planteó una experiencia de pair fed dando a los animales la misma cantidad de comida que había ingerido el grupo inyectado anteriormente con AM 251 a dosis de 2mg/kg, así se eliminó el efecto de la menor ingesta y se puede estudiar si la disminución del CDA % se debe al efecto del fármaco. Aunque la cantidad ingerida fue similar en los dos grupos experimentales, se mantuvo la disminución significativa de la utilización digestiva de nitrógeno, fósforo, magnesio y zinc.

En general, los resultados obtenidos demuestran que realmente el AM 251 produce un efecto a nivel digestivo ya que, además de la disminución de la ingesta, se produce un aumento de la excreción fecal de estos nutrientes. Según la bibliografía, los antagonistas de los receptores cannabinoides producen un aumento en las secreciones digestivas (Izzo y col., 1999 a; Tyler y col., 2000) y en la motilidad gastrointestinal (Calignano y col., 1997; Colombo y col., 1998; Izzo y col., 1999 b, 2001; Carai y col., 2004). Desde el punto de vista de la utilización digestiva de nitrógeno estos dos efectos parecen ser antagónicos, puesto que el aumento de las secreciones digestivas se relaciona con una mejor absorción de nutrientes

mientras que el aumento de la motilidad, al disminuir el tiempo de tránsito intestinal, puede reducir la cantidad de nutrientes absorbidos.

En nuestras condiciones experimentales, los efectos del AM 251 sobre la motilidad parecen haber predominado sobre sus efectos sobre las secreciones intestinales inyectando 1mg/kg, lo que produce un aumento significativo de la excreción fecal y una disminución en la absorción potencial de nitrógeno y minerales. Por otra parte, el aumento en la utilización digestiva en el grupo inyectado con 2mg/kg con respecto al grupo inyectado con 1mg podría ser debido al efecto compensatorio frente a una menor ingesta o al efecto del antagonista aumentando las secreciones digestivas, que podría ser eficaz a partir de 1mg/kg. Sin embargo, el efecto del antagonista sobre la motilidad parece seguir predominando, lo que se ve reflejado en una menor utilización digestiva de la proteína en comparación con el grupo control, debido a valores similares de excreción fecal, a pesar de la menor ingesta.

Cuando estudiamos el efecto de la inyección de dosis progresivamente mayores de AM 251 sobre la utilización digestiva de nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio y zinc, los valores de CDA aumentan hasta igualarse o incluso superar al grupo control. Este aumento corre paralelo al descenso en la ingesta de alimento, y por consiguiente, de estos nutrientes ingeridos en dichos grupos experimentales, lo cual implica una progresiva mejora de la utilización digestiva de la proteína y minerales, es decir un mejor nivel de absorción. Se aprecia claramente como se han puesto en marcha los mecanismos de compensación a nivel digestivo del animal con objeto de suplir el efecto negativo del fármaco sobre la ingesta con un mejor aprovechamiento nutritivo del nitrógeno y minerales ingeridos.

En caso del grupo inyectado con 5mg/kg, el aumento en el CDA podría ser debido al efecto sobre las secreciones digestivas que continuaría aumentando con mayor dosis inyectada, lo cual favorecerá la digestión de la proteína y minerales de la dieta que estarán disponibles para ser absorbidos a nivel intestinal. Se observa, además, que la excreción fecal es significativamente menor al grupo control y a los otros dos grupos experimentales. A ello habría que añadir el efecto compensatorio a nivel digestivo con el fin de hacer frente a los requerimientos nutricionales del animal.

En definitiva, el animal fuerza la absorción de nitrógeno y minerales, aunque debido a la hipofagia causada por la inyección del fármaco antagonista de los receptores cannabinoides, esta mejora en la utilización digestiva no se ve reflejada en una mejora del incremento de peso en relación a la ingesta, tal como refleja el CEC.

V.2.2.2 Sobre la utilización metabólica

A nivel metabólico el AM 251 produce una disminución significativa de la excreción renal de nitrógeno que no es dosis dependiente, y ello conduce a valores similares de

retención de nitrógeno y del índice %R/A con dosis de 2 y 5mg/kg respecto al grupo control. Sin embargo, en el experimento pair fed no se observan diferencias en la excreción urinaria, ni en el balance ni en %R/A entre el grupo control y el inyectado con 2 mg AM 251/kg. Por todo ello puede concluirse que los efectos observados a nivel metabólico se deben atribuir a la hipofagia significativa inducida por el AM 251 y no por efecto directo del fármaco, tal como podría esperarse de los resultados de Deutsch y colaboradores 1997, que han descrito la existencia de receptores CB1 a nivel renal.

Ante niveles menores de ingesta los animales fuerzan la retención de nitrógeno para mantener un nivel de aminoácidos disponibles indispensable para hacer frente a sus necesidades de recambio proteico. Solamente con dosis de 1mg/kg se observa una disminución significativa del balance, producido sin duda por la gran excreción fecal observada en este grupo, sin embargo la utilización metabólica juzgada por el %R/A mantiene valores elevados similares al resto de grupos experimentales, lo que es reflejo de una buena utilización del N absorbido.

En relación con los minerales se observan valores muy elevados de %R/A (Ca, P y Zn) a dosis de 1, 2 y 5 mg/kg e iguales al control, y valores bajos e iguales al control para el Mg. El AM 251 no parece tener ningún efecto sobre este índice, al igual que se observa en el caso del nitrógeno.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos, se pueden concluir estos puntos esenciales:

1.- A nivel periférico, la inyección aguda del agonista de los receptores cannabinoides WIN 55,212-2 aumenta el apetito y produce hiperfagia a dosis de 1 y 2 mg/kg hasta 6h tras la inyección, mientras a dosis de 5mg/kg produce un efecto contrario, como resultado, al menos en parte, de la inhibición de la actividad motora lo cual interfiere con el comportamiento alimentario. El antagonista/agonista inverso de los receptores cannabinoides AM 251 disminuye la ingesta y produce hipofagia a dosis de 1, 2 y 5mg/kg a partir de 2h tras la inyección hasta 24h. El efecto más agudo es el que se consigue a dosis de 5mg.

2.- Los resultados de la inyección central coinciden con los resultados de la inyección periférica a corto plazo. El agonista de los receptores cannabinoides WIN 55,212-2 aumenta el apetito y produce hiperfagia a dosis de 1 μ g, mientras el antagonista de los receptores cannabinoides, AM 251 produce hipofagia a dosis de 0.1 μ g.

3.- La administración central de WIN 55,212-2 (1 μ g/5 μ l) induce una disminución significativa en la liberación basal de la serotonina en comparación con los animales inyectados con el vehículo, mientras la administración central de AM 251 (1 μ g/5 μ l) produce un incremento significativo. La inhibición de la transmisión serotoninérgica del hipotálamo medio implicada en la regulación de los procesos de saciedad puede ser uno de los mecanismos por los que el agonista de los receptores cannabinoides estimula la ingesta y produce su efecto hiperfágico, mientras el antagonista/agonista inverso de estos receptores parece producir sus efectos anoréxicos incrementando los mecanismos de la sensación de saciedad y por lo tanto aumenta la liberación de serotonina.

4.- Otro mecanismo de acción a través del cual los cannabinoides pueden producir su conocido efecto orexigénico es la activación de las neuronas que expresan el neuropéptido Y que es uno de los neurotransmisores más abundantes en el cerebro y uno de los factores orexígenos más potentes. La administración icv de WIN 55,212-2 causa un aumento de la inmunoexpresión de NPY en el núcleo arcuato, mientras la administración de AM 251 causa una disminución significativa.

5.- A largo plazo, el WIN 55,212-2 a dosis de 0.5 y 2mg/kg no produce ningún efecto sobre la ingesta mientras a dosis de 5mg/kg produce una hipofagia significativa a partir del primer día de la inyección hasta el décimo día. El AM 251 a dosis de 1, 2 y 5mg/kg disminuye significativamente la ingesta desde el primer día hasta el décimo día tras la inyección para las dosis de 1 y 5mg/kg mientras al inyectar el AM 251 a dosis de 2mg/kg el efecto hipofágico desaparece en el último día como consecuencia probablemente del desarrollo de la tolerancia. Las diferencias en el efecto sobre la ingesta entre las distintas dosis

del fármaco ensayadas desaparecen a partir del cuarto día en el que, sin embargo, siguen existiendo diferencias significativas respecto al grupo inyectado con el vehículo.

6.- La inyección diaria de WIN 55,212-2 a dosis de 0.5 y 2 mg/kg no producen diferencias significativas en el peso de los animales respecto al control, mientras que a dosis de 5 mg/kg produjo una pérdida significativa de peso a lo largo de todo el experimento. La disminución de la ingesta inyectando el AM 251 se relaciona con un menor incremento de peso de los animales durante los tres primeros días cuando la diferencia de peso se calcula con respecto al día anterior, mientras a partir del cuarto día no hay diferencias significativas en el incremento de peso entre los animales inyectados con diferentes dosis del fármaco y el grupo inyectado con el vehículo, así el incremento de peso se mantiene constante en todos los grupos experimentales lo que sugiere que otros factores relacionados con la utilización nutritiva del alimento pueden influir.

7.- El WIN 55,212-2 a dosis de 0.5 y 2mg/kg produce una disminución de la excreción fecal de nitrógeno y minerales y de la cantidad de heces excretadas y eso aumenta la absorción porcentual de estos nutrientes, lo cual implica una mejora de su utilización digestiva. Por el contrario, la administración de AM 251 a dosis de 1 y 2mg/kg, además de su efecto hipofágico, produce un efecto a nivel digestivo disminuyendo la absorción porcentual de la proteína y de los minerales y aumentando la excreción fecal. Estos resultados podrían deberse en parte al efecto de estos fármacos sobre el peristaltismo intestinal y las secreciones digestivas actuando a nivel de receptores cannabinoides CB1 localizados a nivel del plexo mientérico.

8.- Cuando estudiamos el efecto de la inyección de dosis progresivamente mayores de AM 251 sobre la utilización digestiva de nitrógeno y minerales, los valores de CDA van aumentando, en general, hasta igualarse o incluso superar al grupo control. Este aumento corre paralelo al descenso en la ingesta de alimento, y por consiguiente, de estos nutrientes ingeridos en dichos grupos experimentales, lo cual implica una progresiva mejora de la utilización digestiva de la proteína y minerales, es decir un mejor nivel de absorción. Se aprecia claramente cómo se han puesto en marcha los mecanismos de compensación a nivel digestivo del animal con objeto de suplir el efecto negativo del fármaco sobre la ingesta con un mejor aprovechamiento nutritivo del nitrógeno y minerales ingeridos.

Conclusión general

Nuestros resultados apoyan la implicación del sistema endocannabinoide en la regulación de la ingesta a través de receptores específicos CB1. La inhibición de la transmisión serotoninérgica del hipotálamo medio implicada en la regulación de los procesos de saciedad observada tras la administración central del WIN 55,212-2 puede ser uno de los mecanismos por los que el agonista de los receptores cannabinoides estimula la ingesta y produce su efecto hiperfágico, mientras el antagonista/agonista inverso de estos receptores parece producir sus efectos anoréxicos incrementando los mecanismos de la sensación de saciedad y por lo tanto aumenta la liberación de serotonina. Otro mecanismo de acción a través del cual los cannabinoides pueden producir su conocido efecto orexigénico es la activación de las neuronas que expresan el neuropéptido Y.

Por otra parte, nuestros resultados también muestran que, además de este efecto sobre la ingesta de alimentos, los cannabinoides tienen además un efecto sobre la utilización a nivel digestivo de la dieta y que este efecto varía en función de la dosis empleada.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abanades S, Cabrero A, Fiz J, Farré M. 2005.** Farmacología clínica del cannabis. 20: 187-98.
- Abel EL. 1975.** Cannabis: Effects on hunger and thirst. *Behav. Biol* 15: 255-281.
- Abood ME, Martin BR. 1992.** Neurobiology of marijuana abuse. *Trends. Pharmacol. Sci* 13: 201-207.
- Abood ME, Sauss C, Fan F, Tilton CL, Martin BR. 1993.** Development of behavioral tolerance to delta 9-THC without alteration of cannabinoid receptor binding or mRNA levels in whole brain. *Pharmacol. Biochem. Behav* 46: 575-579.
- Aceto MD, Scates SM, Lowe JA, Martin BP. 2001.** Spontaneous and precipitated withdrawal with a synthetic cannabinoid, Win 55,212-2. *Eur. J. Pharmacol* 416: 75-81.
- Adami M, Coruzzi G, Soldani G, Todorov S, Zamfirova R, Stavrev E, Brown DR, Kulkarni-Narla A. 2001.** Investigation of CB1 cannabinoid receptors mediating antisecretory effects in rat stomach. *Br. J. Pharmacol* 133(suppl): 244.
- Adami M, Frati P, Bertini S, Kulkarni-Narla A, Brown DR, Giuseppe de Caro, Gabriella Coruzzi, Soldani G. 2002.** Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *Br. J. Pharmacol* 135: 1598-1606.
- Adami M, Zamfirova R, Sotirov E, Tashev R, Dobrinova Y, Todorov S, Coruzzi G. 2004.** Gastric antisecretory effects of synthetic cannabinoids alter central or peripheral administration in the rat. *Br. Res. Bull* 64: 357-361.
- Adams IB, Martin BR. 1996.** Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* 91: 1585-1614.
- Aggarwal BB, Takada Y, Shishodia S, Gutierrez AM, Oommen OV, Ichikawa H, y col. 2004.** Nuclear transcription factor NF-Kappa B: role in biology and medicine. *Indian. J. Exp. Biol* 42: 341-353.
- Agurell S, Halldin M, Lindgren J, Ohlsson A, Widman M, Gillespie H, Hollister L. 1986.** Pharmacokinetics and metabolism of delta-9-THC and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol. Rev* 38: 21-42.
- Ahston CH. 2001.** Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br. J. Psychiatry* 178: 101-106.
- Alfenas RC, Mattes RD. 2003.** Effect of fat sources on satiety. *Obes. Res* 11: 183-187.
- Ali N, Sikthberg L. 2001.** Osteoporosis prevention in female adolescents: calcium intake and exercise participation. *Pediatric. Nursing* 27: 135-139.
- Allain H, Schuck S, Polard E, Tribut O, Duchêne F, Galesne G. 1999.** Les recepteurs au cannabis. <http://www.med.univ-rennes1.fr/etud/pharmacol/cannabis.htm>.
- Allen JM, Adrian TE, Polak JM, y col. 1983.** Neuropeptide Y (NPY) in the adrenal gland. *J. Auton. Nerv. Syst* 9: 559-63.
- Amador GM, Hermelo TM. 1996.** Alimentación y Nutrición. En: *Pediatría* 2. Amador GM, Caneti FS, Cobas SM, Hermelo TM, Jordán Rodríguez JA, Martínez GA, et al. Eds. La Habana: Pueblo y Educación, pp. 33-142.

- Ameri A. 1999.** The effects of cannabinoids on the brain . *Prog. Neur* 58: 315-348
- Anand BK, Brobeck JR. 1951.** Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale. J .Biol. Med* 24: 123-146.
- Andersen JB, Sell ML, Garner SC, Calvo MS. 2001.** Phosphorus. En: *Present Knowledge in Nutrition* (8th ed). Bowman BA, Russell RM. Eds. Washington, DC: International Life Sciences Institute.
- Anderson JJB. 1991.** Nutritional biochemistry of calcium and phosphorus. *J. Nutr. Biochem* 2: 300-309.
- Anderson PE, Jackson DM, Chesher GB. 1974.** Interaction of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on intestinal motility in mice. *J. Pharm. Pharmacol* 26: 136-137.
- Andrews PL, Sanger GJ. 2002.** Abdominal vagal afferent neurones: an important target for the treatment of gastrointestinal dysfunction. *Curr. Opin. Pharmacol* 2: 650-656.
- Antonson DL, Barak AJ, Vanderhoof JA. 1979.** Determination of the site of zinc-absorption in rat small-intestine . *J. Nutr* 109: 142-147.
- Appleyard SM, Bailey TW, Doyle MW, y col. 2005.** Proopiomelanocortin neurons in nucleus tractus solitarius are activated by visceral afferents: regulation by cholecystikinin and opioids. *J. Neurosci* 25: 3578-3585.
- Aranda P, Llopis J. 1993.** Minerales. *En Nutrición y dietética. Aspectos sanitarios*. Mataix FJ. Ed. Consejo General de colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid, pp. 177-240.
- Aranda P, López-Frias M, López-Jurado M, Llopis J, Rivero M, Urbano G. 1989.** Nutricional availability of magnesium and calcium in Mg-supplemented diets. *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 35: 81-89.
- Aranda P, Planeéis E, Sánchez C, Quintero B, Llopis J. 2007.** Experimental Data on Chronic Magnesium. En: *New perspectives in magnesium research. Nutrition and Health*. Springer-Verlag (London), pp. 104-116.
- Arnaud CD, Sánchez SD. 1990.** Present Knowledge in Nutrition. *En: Nutrition Reviews*. 6th ed. Brown ML. Ed. Washintong, DC. The Nutrition Foundation, pp. 212.
- Arnone M, Maruani J, Chaperon F, Thiebot MH, Poncelet M, Soubrie P, Le Fur G. 1997.** Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoide (CB₁) receptors. *Psychopharmacology* 132: 104-106.
- Arrizabalaga JJ, Calañas-continente A, Vidal J, Masmiquel L, Díaz-Fernández MJ, Garcia-Luna PP et al. 2003.** Guía práctica para el manejo del sobrepeso y la obesidad en personas adultas. *Endocrinol. Nutr* 50: 1-38.
- Arseneault L, Cannon M, Witton J, Murray R. 2004.** Causal association between cannabis and psychosis: examination of the evidence. *Br. J. Psychiatry* 184: 110-117.
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, y col. 2001.** Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120: 337-345.
- Ashmead DH, Graff DJ, Ashmead HH. 1985.** Intestinal absorption of metal ion and quelates. Thomas Spellingfield II. Citado por Ashmead DH. 1989. En: *Nutrient Availability: Chemical and*

Biological Aspect. Southgate D, Hohnson I, Fenwick GR. Eds. Royal Society of Chemistry; Thomas Graham House, Cambridge. England, pp. 122-124.

Ashmead DH. 1989. A peptide dependent intestinal pathway for the absorption of essential minerals. En: *Nutrient Availability: Chemical and Biological Aspect*. Southgate D, Hohnson I, Fenwick GR. Eds. Royal Society of Chemistry; Thomas Graham House, Cambridge. England, pp: 122-124.

Avioli LA. 1980. Calcium and Phosphorus. En: *Modern Nutrition in Health and Disease*. Shils, ME., Young VR, Eds. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 142-158.

Avraham Y, Ben-Shushan D, Breuer A, Zolotarev O, Okon A, Fink N, Katz V, Berry EM. 2004. Very low doses of Delta (8)-THC increase food consumption and alter neurotransmitter levels following weight loss. *Pharmacol. Biochem. Behav* 77: 675-684.

Bacic D, Schulz N, Biber J, y col. 2003. Involvement of the MAPK-Kinase pathways in the PTH-mediated regulation of the proximal tubule type IIa Na⁺/Pi cotransporter in mouse kidney. *Pflugers Arch-Eur. J. Physiol* 446: 52-60.

Badman MK, Flier JS. 2005. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science* 307: 1909-1914.

Bado A, Lévassieur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, et al. 1998. The stomach is a source of leptin. *Nature* 394: 790-793.

Baehler RV, Work J, Koychen TA, Mc Morrow G, Guthrie G. 1980. Studies on the pathogenesis of Bartter's Syndrome. *Am. J. Med* 59: 933-938.

Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. 2003. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet. Neurology* 2: 291-298.

Baker D, Pryce G, Groxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW, Layward L. 2000a. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* 404: 84-87.

Baker D, Pryce G, Groxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, Khanolkar A, Layward L, Fezza F, Bisogno T, Di Marzo V. 2000b. Endocannabinoids control spasticity in experimental multiple sclerosis. *FASEB. J* 15: 300-302.

Balázsa T, Bíró J, Gullai N, Ledent C, Sperlágh B. 2008. CB1-cannabinoid receptors are involved in the modulation of non-synaptic [³H] serotonin release from the rat hippocampus. *Neurochem. International*. 52: 95-102.

Barlett SE, Enquist J, Hopf FW, Lee JH, Gladher F, Kharazia V, Aldhoer M, Mailliard S, Armstrong R, Bonci A, Whistler JL. 2005. Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11521-11526.

Bass CE, Martin BR. 2000. Time course for the induction and maintenance of tolerance to Delta-9-tetrahydrocannabinol in mice. *Drug. Alcohol. Depend* 60: 113-119.

Batterham RL, Bloom SR. 2003. The gut hormone peptide YY regulates appetite. *Ann. NY. Acad. Sci* 994:162-168.

Beaconsf P, Ginsburg J, Rainsbur R. 1972. Marijuana smoking - cardiovascular effects in man and possible mechanisms. *New. England. J. Medicine* 287: 209.

- Beardsley PM, Martin BR. 2000.** Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716A, after Delta-9-tetrahydrocannabinol withdrawal. *Eur. J. Pharmacol* 387: 47-53.
- Begg M, Dale N, Ilaudet E, Molleman A, Parsons ME. 2002.** Modulation of the release of endogenous adenosine by cannabinoids in the myenteric plexus-longitudinal muscle preparation of the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol* 137: 1298-1304.
- Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Ming Mo F, et al. 2005.** Evidence for novel cannabinoid receptor. *Pharm. Ther* 106: 133-145.
- Beinfeld MC, Connolly K. 2001.** Activation of CB1 cannabinoid receptors in rat hippocampal slices inhibits potassium-evoked cholecystokinin release, a possible mechanism contributing to the spatial memory defects produced by cannabinoids. *Neurosci. Lett* 301: 69-71.
- Benamar K, Yondorf M, Meissler JJ, Geller EB, Tallarida RJ, Eisenstein TK, Adler MW. 2007.** A novel role of cannabinoids: Implication in the fever induced by bacterial lipopolysaccharide. *J. Pharmacol. Exper* 320: 1127-1133.
- Bengoia J, Wood R. 1984.** Magnesium. En: *Absorption and Malabsorption of Mineral Nutrients*. Solomons NW, Rosenberg IH. Eds. Alan R Liss, New York, pp.69.
- Bennet RG, Hamel FC, Duckworth WC. 2000.** Insulin inhibits the ubiquitin-dependent degrading activity of the 26S proteasome. *Endocrinology* 141: 2508-2517.
- Benowitz NL, Rosenberg J, Rogers W, et al. 1979.** Cardiovascular effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol - autonomic nervous mechanisms. *Clin. Pharmacol. Ther* 25: 440-446.
- Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclançon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubrie P. 2003.** The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR 141716A increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol. Pharmacol* 63: 908-914.
- Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R. 1998.** An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur. J. Pharmacol* 353: 23-31.
- Bernardis LL, Bellinger LL. 1996.** The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev* 20: 189-287.
- Berrendero F, Bisogno T, González S, Cavaliere P, Romero J, Cebeira M, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ. 2000.** Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid conyents in the striatum of delta-9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *J. Neurochem* 74: 1627-1635.
- Berrendero F, Garcia L, Hernández ML, Romero J, Cebeira M, deMiguel R, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ. 1998.** Localization of mRNA expresión and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetla development. *Development* 125: 3179-3188.
- Berrendero F, Garcia L, Hernández ML, Romero J, Cebeira M, deMiguel R, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ. 1998.** Localization of mRNA expresión and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetla development. *Development* 125: 3179-3188.

- Berry EB, Mechoulam R. 2002.** Tetrahydrocannabinol and endocannabinoids in feeding and appetite. *Pharmacol. Therap* 95: 185-190.
- Berthold HK, Reeds PJ, Klein PD. 1995.** Isotopic evidence for the differential regulation of arginine and proline synthesis in man. *Metabolism* 44: 466-473.
- Bettger WJ, O'Dell BL. 1981.** A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life. Sci* 28: 1425-1438.
- Bhear J, Kerstein MD. 1976.** Intestinal calcium absorption: Differences in transport between duodenum and ileum. *Am.J.Physiol* 230: 1255-1260.
- Biber J, Hernando N, Traebert M, y col. 2000.** Parathyroid hormone mediated regulation of renal phosphate reabsorption. *Nephrol. Dial. Transplant* 15: 29-30.
- Biber J, Murer H, Forster I. 1998.** The renal type II Na⁺/phosphate cotransporter. *J. Bionerg. Biomembr* 30: 187-194.
- Bikle DD, Morrisey RL, Zolock DT. 1979.** The mechanism of action of vitamin D in the intestine. *Am. J. Clin. Nutr* 32, 2322,
- Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ, Di Marzo V. 1999.** Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosíntesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 256: 377-380.
- Bittencourt JC, Presse F, Arias C, y col. 1992.** The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno-and hybridization histochemical characterization. *J. Comp. Neurol* 319: 218-45.
- Blevins JE, Schwartz MW, Baskin DG. 2004.** Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brainstem nuclei controlling meal size. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Com. Physiol* 287: R87-R96.
- Blundell JE .1984.** Serotonin and appetite. *Neuropharmacology* 23: 1537-1551.
- Blundell JE, Burley VJ, Cotton JR, Lawton CL. 1993.** Dietary fat and the control of energy intake: evaluating the effects of fat on meal size and postmeal satiety. *Am. J. Clin. Nutr* 57: 772S-777S.
- Blundell JE, King N, Halford JCG. 2002.** Appetite control system and functional foods for the control of energy intake. En: *Study on Obesity and Functional Foods in Europe*. Palou A, Bonet ML, Serra F. Eds. Luxembourg: European Commission, Directorate General for Research, pp. 302-316.
- Blundell JE, Lawton CL, Cotton JR, Macdiarmid JL. 1996.** Control of human appetite: implications for the intake of dietary fat. *Ann. Rev. Nutr* 16: 285-319.
- Bohme GA, Laville M, Ledent C, Parmentier M, Imperato A. 2000.** Enhanced long-term potentiation in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Neuroscience* 95: 5-7.
- Boirie Y, Gachon P, Beaufrère B. 1997.** Splanchnic and whole body leucine kinetics in young and elderly men. *Am. J. Clin. Nutr* 65: 489-495.
- Borowitz SM, Grishan FK. 1989.** Phosphate transport in human jejunal brush-border membrane vesicles. *Gastroenterology* 96: 4-10.

- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M., et al. 1995.** Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem. J* 312: 637-163.
- Bouillon R, Van Cromhaut S, Carmeliet G. 2003.** Intestinal calcium absorption: molecular vitamin D mediated mechanisms. *J. Cell. Biochem* 88: 332-339.
- Bray GA, York DA. 1979.** Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol. Rev* 59: 719-809.
- Bray GA.1997.** Amino acids, protein, and body weight. *Obes. Res* 5: 373-376.
- Breivogel CS, Wlaker JM, Huang SM, Roy MB, Childers SR. 2004.** Cannabinoid signaling in rat cerebellar granule cells: G-protein activation, inhibition of glutamate release and endogenous cannabinoids. *Neuropharmacology* 47: 81-91.
- Breslau NA. 1996.** Calcium, Magnesium, and Phosphorus: intestinal absorption. En: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. (3rd ed). Favus MS. Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 41-49.
- Brink EJ, Beynen Ac. 1992.** Nutrition and magnesium absorption: a review. *Prog. Food Nutr. Sci* 16: 125-162.
- Brink EJ, Dekker PR, Beresteijn ECH, Beynen AC. 1991.** Inhibitory effect of dietary soybean protein vs. Casein on magnesium absorption in rats. *J. Nutr* 121: 1374-1381.
- Brobeck JR. 1946.** Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiol. Rev* 26:541-559.
- Broberger C. 2005.** Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J. Intern. Med* 258: 301-327.
- Bronner F, Pansu D and Stein wd. 1986.** An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. *Am. J. Physiol* 250: G561-G569.
- Bronner F. 2003a.** Mechanisms and functional aspects of intestinal calcium absorption. *J. Exp. Zool* 300A: 47-52.
- Bronner F. 2003b.** Mechanisms of intestinal calcium absorption. *J. Cell. Biochem* 88: 387-393.
- Brown NK, Harvey DJ. 1990.** Comparative in vitro metabolism of cannbinol in rat, mouse, rabbit, guinea pig, hamster, gerbil and cat. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinetics* 15: 253-258.
- Brown TM, Brotchie JM, Fitzjohn SM. 2003.** Cannabinoids decrease corti-costriatal synaptic transmission via an effect on glutamate uptake. *J. Neurosci* 23: 11073-11077.
- Bruneton J. 1991.** Elementos de Fotoquímica y de Farmacognosia. Editorial Acribia SA, Zaragoza.
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E. 1998.** Expression of the CB₁ and CB₂ receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 82: 1131-1149.
- Burdyga G, Lal S, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ. 2004.** Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *J. Neurosci* 24: 2708-2715.

- Calapai G, Corica F, Corsonello A, sautebin L, di Rosa M, Campo GM y col. 1999.** Leptin increases serotonin turnover by inhibition of brain nitric oxide síntesis. *J. Clin. Invest* 104: 975-982.
- Calignano A, Katona Y, Desarnaud F, Giuffrida A, La Rana G, Mackie K, Freund TF, Piomelli D. 2000.** Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids. *Nature* 408: 96-101.
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. 1998.** Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394: 277-281.
- Calignano A, La Rana G, Makryannis A, Lin SY, Beltramo M, Piomelli D. 1997.** Inhibition of intestinal motility by anadamide, an endogenous cannabinoid. *Eur. J. Pharmacol* 340: R7-R8.
- Cami J, Rodríguez ME. 1988.** Cocaine the coming epidemics. *Med. Clin* 91: 71-76.
- Campfield LA, Smith FJ, Rosenbaum M, Hirsch J. 1996.** Human eating: evidence for a physiological basis using a modified paradigm. *Neurosci. Biobehav. Rev* 20: 133-137.
- Campfield LA, Smith JF, Burn P. 1998.** Strategies and potential molecular targets for obesity treatment. *Science* 280: 1383-1387.
- Canello R, Tounian A, Poitou C, y col. 2004.** Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diabetes. Metab* 30: 215-227.
- Carai MA, Colombo G, Gessa GL. 2004.** Rapid tolerance to the intestinal prokinetic effect of cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A. *Eur. J. Pharmacol* 494: 221-224.
- Carter JE, Truong-Tran AQ, Grosser D, Ho L, Ruffin RE, Zalewski PD. 2002.** Involvement of redox events in caspase activation in Zn-depleted airway epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 297: 1062-1070.
- Casabiell X, Pineiro V, Tome MA, Peino R, Dieguez C, Casanueva FF. 1997.** Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation on neonatal food intake. *J. Clin. Endocrinal. Metab* 82: 4270-4273.
- Cashman KD, Flynn A. 1999.** Optimal nutrition: calcium, magnesium and phosphorus. *Proc. Nutr. Soc* 58: 477-487.
- Casu MA, Porcella S, Ruiu P, Saba G, Marchese G, Carai MA, Reali R, Gessa GL, Pani L. 2003.** Differential distribution of functional cannabinoid CB1 receptors in the mouse gastroenteric tract. *Eur. J. Pharmacol* 459: 97-105.
- Causey KR, Zemel MB. 2003.** Dairy augmentation of the anti-obesity effect of Ca in aP2-agouti transgenic mice. *FASEB J* 17: A746-A746 (Abstract).
- Ceddia RB, Heikki AK, Zierath JR, Sweeney G. 2002.** Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB. J* 16: 1163-1176.
- Chambers AP, Koopmans HS, Pittman QJ, Sharkey KA. 2005.** AM 251 produces sustained reductions in food intake and body weight that are resistant to tolerance and conditioned taste aversion. *Br. J. Pharmacol* 147: 109-116.
- Chambers AP, Sharkey KA, Koopmans HS. 2004.** Cannabinoid (CB₁) receptor antagonist, AM 251, causes a sustained reduction of daily food intake in the rat. *Physiol. Behav* 82: 863-869.

- Chaperon F, Thiébot MH. 1999.** Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. *Crit. Rev. Neurobiol* 13: 243-281.
- Chapman V. 1999.** The cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716A, selectively facilitates nociceptive responses of dorsal horn neurones in the rat. *Br. J. Pharmacol* 127: 1765-1767.
- Cheer JF, Wassum K, Hein M, Philips P, Wightman R. 2004.** Cannabinoids enhance subsecond dopamine release in the nucleo accumbens of awake rats. *J. Neuroscience* 24: 4393-400.
- Chen RZ, Huang RR, Shen CP, MacNeil DJ, Fong TM. 2004.** Synergistic effects of cannabinoid inverse agonist AM251 and opioid antagonist nalmefene on food intake in mice. *Brain. Res* 999: 227-230.
- Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. 1997.** Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138: 4489-4492.
- Childers SR, Deadwyler SA. 1996.** Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol* 52: 819-827.
- Christophe J. 1998.** Is there appetite after GLP-1 and PACAP? *Ann. N. Y. Acad. Sci* 865: 323-35.
- Chutkow J. 1964.** Sites of magnesium absorption and excretion in the intestinal tract of the rat. *J. Lab. Clin. Med* 63: 71-79.
- Cinti S, Matteis RD, Pico C, Ceresi E, Obrador A, Maffei C, y col. 2000.** Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord* 24: 789-793.
- Clark I. 1969.** Importance of dietary Ca: PO₄ ratios on skeletal calcium, magnesium and phosphate metabolism. *Am. J. Physiol* 257: 865-870.
- Clarke RW, Harris J, Jenkins S, Witton SK. 2001.** Cannabinoidergic and opioidergic inhibition of spinal reflexes in the decerebrated, spinalized rabbit. *Neuropharmacology* 40: 570-577.
- Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM. 2002.** Role for stearyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 297: 240-243.
- Collins MT, Chebli C, Jones J, Kushner H, Consugar M, Rinaldo P, Wientroub S, Bianco P, Robey PG. 2001.** Renal phosphate wasting in fibrous dysplasia of bone is part of a generalized renal tubular dysfunction similar to that seen in tumor-induced osteomalacia. *J. Bone. Miner. Res* 16: 806-813.
- Colombo G, Agabio R, Diaz G, Lobina C, Reali R and Gessa GL. 1998.** Appetite supresión and weight loss alter the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life. Sci* 63: 113-117.
- Compton DR, Dewey WL, Martin BR. 1990.** Cannabis dependence and tolerance productions. *Adv. Alcohol. Subt. Abuse* 9: 156-158.
- Condamina J, Zornoza-Sabina T, Granero L, Polache A. 2002.** Kinetics of zinc transport in vitro in rat small intestine and colon: interaction with copper. *Eur. J. Pharm. Sci* 16: 289-295.
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, y col. 2001.** The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord* 25: S63-S67.

- Consroe P. 1998.** Brain cannabinoid systems as targets for the therapy of neurological disorders. *Neurobiol. Dis* 5: 534-551.
- Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D, Giagnoni G. 2002.** Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br. J. Pharmacol* 65: 999-1007.
- Coppack SW, Patel JN, Lawrence VJ. 2001.** Nutritional regulation of lipid metabolism in human adipose tissue. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109 Suppl 2: S202-14.
- Coruzzi G, Adami G, Coppelli G, Frati P, Soldani G. 1999.** Inhibitory effect of the cannabinoid receptor agonist Win 55,212-2 on pentagastrin-induced gastric acid secretion in the anesthetized rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch* 360: 715-718.
- Corwin RL, Corp ES, Gibbs J, y col. 1992.** Decreased behavioral effects of daily intracerebroventricular bombesin. *Peptides* 13: 1251-1258.
- Corwin RL, Gibbs J, Smith GP. 1991.** Increased food intake after type A but not type B cholecystokinin receptor blockade. *Physiol. Behav* 50: 255-258.
- Cosenza M, Gifford AN, Gatley SJ, Pyatt B, Liu Q, Makriyannis A, Volkow ND. 2000.** Locomotor activity and occupancy of brain cannabinoid CB1 receptor by the antagonist/inverse agonist AM 281. *Synapse* 38: 477-482.
- Costa B, Colleoni M, Conti S, Parolaro D, Franke C, Trovato AE, Giagnoni G. 2004.** Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan induced inflammation in the rat paw. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 369: 74-79.
- Costa B, Giagnoni G, Cooleoni M. 2000.** Precipitated and spontaneous withdrawal in rats tolerant to anandamide. *Psychopharmacology* 149: 121-128.
- Costa B, Parolaro D, Colleoni M. 1996.** Chronic cannabinoid, CP-55,940, administration alters biotransformation in the rat. *Eur. J. Pharmacol* 313-17-24.
- Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thonereineke C, Ortman S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. 2003.** The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J. Clin. Invest* 112: 423-431.
- Coudray C, Feillet-Coudray C, Grizard D, Tressol JC, Gueux E, Rayssiguier Y. 2002.** Fractional intestinal absorption of magnesium is directly proportional to dietary magnesium intake in rats. *Am. Soc. Nutr. Sci* 2043-2047.
- Coudray C, Feillet-Coudray C, Tressol JC, y col. 2005.** Stimulatory effect of inulin on intestinal absorption of calcium and magnesium in rats is modulated by dietary calcium intakes - Short- and long-term balance studies. *Eur. J. Nutr* 44: 293-302.
- Cousins R, McMahon R. 2002.** Integrative aspects of zinc transporters. *J. Nutr* 130: 1384S-1387S.
- Cousins RJ, Hempe JM. 1991.** Cinc. En: *Conocimientos Actuales Sobre Nutrición*. (6 ed). Brown ML, Filer LJ, Guthrie HA, Levander OA, Mc Cormick DB, Olson RE y col. Eds, Washington DC, pp. 289-298. (Publicación Científica núm 532).

- Cousins RJ. 1985.** Absorption, transport, and hepatic-metabolism of copper and zinc - special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev* 65: 238-309.
- Cousins RJ. 1986.** Toward a molecular understanding of zinc-metabolism. *Clin. Physiol. Biochem* 4: 20-30.
- Coutts AA, Brewster N, Ingram T, Razdan RK, Pertwee RG. 2000.** Comparison of novel cannabinoid partial agonists and SR141716A in the guinea-pig small intestine. *Br. J. Pharmacol* 129: 645-652.
- Coutts AA, Irving AJ, Mackie K, Pertwee RG, Anavi-Goffer S. 2002.** Localization of cannabinoid CB1 receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus. *J. Comp. Neurol* 448: 410-422.
- Coutts AA, Pertwee RG. 1997.** Inhibition by cannabinoid receptor agonists of acetylcholine release from the guinea-pig myenteric plexus. *Br. J. Pharmacol* 121: 1557-1566.
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, y col. 2003.** The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37: 649-661.
- Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, y col. 2001.** Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc. Acad. Sci. USA* 98: 9371-9376.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gigula NB. 1996.** Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384: 83-87.
- Crawley JN, Corwin RL. 1994.** Biological actions of cholecystokinin on sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue. *Brain. Res* 597:298-303.
- Crawley JN. 1995.** Biological actions of galanin. *Regul. Pept* 59:1-16.
- Croci T, Landi M, Galzin AM, Marini P. 2003.** Role of cannabinoid CB1 receptors and tumor necrosis factor-alpha in the gut and systemic anti-inflammatory activity of SR141716A in rodents. *Br. J. Pharmacol* 140: 115-122.
- Croci T, Manara L, Aureggi G, Guagnini F, Rinaldi-Carmona M, Maffrand JP, Le Fur G, Mukenge S, Ferla G. 1998.** In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum. *Br. J. Pharmacol* 125: 1393-1395.
- Cui L, Takagi Y, Wasa M, Sando K, Khan J, Okada A. 1999.** Nitric oxide synthase inhibitor attenuates intestinal damage induced by zinc deficiency in rats. *J. Nutr* 129: 792-798.
- Cunningham BC, Bass S, Fuh G, Wells JA. 1990.** Zinc modulation of the binding of human growth hormone to the human prolactin receptor. *Science* 250: 1709-1712.
- Currie PJ, Coiro CD, Niyomchai T, Lira A, Farahmand F. 2002.** Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine: Receptor-specific inhibition of NPY-stimulated eating and energy metabolism. *Pharmacol. Biochem. Behav* 71: 709-716.
- Currie PJ, Coscina DV, Bishop C, y col. 2001.** Hypothalamic paraventricular nucleus injections of urocortin alter food intake and respiratory quotient. 2001. *Brain. Res* 916: 222-228.

- Currie PJ, Coscina DV. 1996.** Regional hypothalamic differences in neuropeptide Y-induced feeding and energy substrate utilization. *Brain. Res* 737: 238-242
- Currie PJ, Saxena N, Tu AY. 1999.** 5-HT_{2A/} (2C) receptor antagonists in the paraventricular nucleus attenuate the action of DOI on NPY-stimulated eating. *Neuroreport* 10: 3033-3036.
- Curthoys NP, Watford M. 1995.** Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr* 15: 134-159.
- Curzon G, Gibson EL, Oluyomi AO. 1997.** Appetite supresión by commonly used drugs depends on 5-HT receptors but not on 5-HT availability. *Trends. Pharmacol. Sci* 18: 21-25.
- Darmani NA, Janoyan JJ, Kumar N, Crim JL. 2003.** Behaviorally active doses of the CB1 receptor antagonist SR 141716A increase brain serotonin and dopamine levels and turnover. *Pharmacol. Biochem. Behav* 75: 777-787.
- De Beur SM, Finnegan RB, Vassiliadis J, Cook B, Barberio D, Estes S, Manavalan P, Petroziello J, Madden SL, Cho JY, Kumar R, Levine MA, Schiavi SC. 2002.** Tumors associated with oncogenic osteomalacia express genes important in bone and mineral metabolism. *J. Bone. Miner. Res* 17: 1102-1110.
- De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V. 2004.** The endocannabinoid System: a general view latest addition. *Br. J. Pharmacol* 141: 765-774.
- De Vry J, Jentzsch KR, Kuhl E, Eckel G. 2004.** Behavioral effects of cannabinoids show differential sensitivity to cannabinoid receptor blockade and tolerante development. *Behav. Pharmacol* 15: 1-12.
- De Vry J, Schreiber R, Eckel G, Jentzsch KR. 2004.** Behavioral mechanisms underlying inhibition of food-maintained responding by the cannabinoid receptor antagonist/inverse agonist SR 141716A. *Eur. J. Pharmacol* 483: 55-63.
- Delecea, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE y col. 1998.** The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 322-327.
- Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PC, Krebsbach RJ, Oschmid HHO, Das SK; Dey SK, Arreaza G, Thorup C, Stefano G, Moore LC. 1997.** Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J. Clin. Invest* 100: 1538-1546.
- Devane WA, Dysarc FAIII, Johnson MR, Mevin LS and Howlett AC. 1988.** Determination and caracterisation of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molec. Pharmac* 34: 605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A and Mechoulam R. 1992.** Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-1949.
- Dewey WL. 1986.** Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol. Rev* 38: 151-178.
- Dhillon H, Zigman JM, Ye CP, Lee CE, McGovern RA, Tang VS, Kenny CD, Christiansen LM, White RD, Edelstein EA, Coppari R, Balthasar N, Cowley MA, Chua S, Elmquist JK, Lowell BB. 2006.** Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* 49: 191-203.
- Di Carlo, Izzo AA. 2003.** Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 12: 39-49.

- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. 2000.** Endocannabinoids and multiple sclerosis: a blessing from the “inner bliss”? *Trends. Pharmacol. Sci* 21: 195-197.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. 2004.** The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug. Discov* 3: 771-784.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Fezza F, Ligresti A, Bisogno T. 2002.** Anandamide receptors. *Prostag. Leukot. Essent. Fat. Acids* 66: 377-391.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. 1994.** Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372: 686-691.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T and Kunos G. 2001.** Leptin- regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410: 822-825.
- Di Marzo V, Hill MP, Bisogno T, Crossman aR, Brotchie JM. 2000.** Enhanced levels of endocannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson’s disease. *FASEB. J* 14: 1432-1438.
- Di Marzo V, Matías I. 2005.** Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Med* 8: 585-589.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. 1998.** Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligando with neuromodulatory action. *Trends. Neurosci* 21: 521-528.
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG. 2003.** Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J. Neurosci* 23: 4850-4857.
- Diana M, Melis M, Muntoni AL, Gessa GL. 1998.** Mesolimbic dopaminergic decline alter cannabinoid withdrawal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10269-10273.
- Drezner MK. 2000.** PHEX gene and hypophosphatemia. *Kidney. Int* 57: 9-18.
- Duran M, Laporte JR, Capellá D. 2004.** Novedades sobre las potencialidades terapéuticas del cannabis y el sistema cannabinoide. *Med. Clin (Barc)* 122: 390-398.
- Edholm OG. 1977.** Energy balance in man. *J. Human. Nutr* 31: 413-431.
- Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. 1999.** The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J. Endocrinol* 3: R7-R12.
- Egashira N, Mishima K, Katsurabayashi S, Yoshitake T, Matsumoto Y, Ishida J, Yamaguchi M, Iwasaki K, Fujiwara M. 2002.** Involvement of 5-hydroxytryptamine neuronal system in delta (9)-tetrahydrocannabinol-induced impairment of spatial memory. *Eur. J. Pharmacol* 445: 221-229.
- Eggum BO. 1973.** A study of certain factors influencing protein utilization in rats and pigs. *Beretn. Forsogslab* 406, 173.
- Ekholm P, Virkki L, Ylinen M, Johansson L. 2003.** The effect of phytic acid and some natural chelating agents on the solubility of mineral elements in oat bran. *Food. Chem* 80: 165-170.

- Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, y col. 2005.** Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434: 514-20.
- Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, y col. 1998.** Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J. Comp. Neurol* 402: 442- 459.
- Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. 1999.** From lesion to leptin: Hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221-223.
- Elmquist JK. 1998.** CNS regulation of energy balance and body weight: insights from rodent models. *Lab. Anim. Sci* 48: 630-637.
- Elwynn DH. 1970.** The role of the liver in regulation of amino acid protein metabolism. En: *Mammalian, Fi Metabolism Protein*. Munro HN. Ed. Academic Press, New York, Vol 4, pp. 523-557.
- Emmanuel A, Stamatakis and Marion M Hetherington. 2003.** Neuroimaging in Eating disorders. *Nutri. Neurosciences*, 6:324-334.
- Emond M, Schwartz G, Ladenheim E, Moran T. 1999.** Central leptin modulates behavioural and neuronal responsivity to CCK. *Am. J. Physiol* 276: R1545-R1549.
- Erbersdobler H. 1972.** The normal course of digestion of food proteins. En: *Protein in Human Nutrition*. Potter JW, Rolls BA. Eds. Academic Press, London y New York, pp. 453-467.
- Erickson J, Clegg K, Palmiter R. 1996.** Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381: 415-418.
- Erlanson-Albertsson C. 2005.** Appetite regulation and energy balance. 2005. *Acta. Paediatr. Suppl* 94: 40-1.
- Eva C, Serra M, Mele P, Panzica GC, Oberto A. 2006.** Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor. *Frontiers. Neuro* 27: 308-339.
- Everitt BJ, Hokfelt T. 1989.** The coexistence of neuropeptide Y with other peptides and amines in the central nervous system. En: *Neuropeptide Y*. Mutt V, Fuxe K, Hokfelt T, Lundberg J. Eds. Raven Press, New York, pp. 61-72.
- Fan F, Tao Q, Aboud M, Martin BR. 1996.** Cannabinoid receptor down-regulation with alteration of the inhibitory effect of CP-55,940 on adenylyl cyclase in the cerebellum of CP-55,940-tolerant mice. *Brain. Res* 706: 13-20.
- Fan W, Dinulescu DM, Butler AA, y col. 2000.** The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. *Endocrinology* 141: 3072-3079.
- Fanelli CG, Porcellati F, Pampanelli S, y col. 2004.** Insulin therapy and hypoglycaemia: the size of the problem. *. Diabetes. Metab. Res. Rev* 20 Suppl 2: S32-42.
- Fehr K, Kalant H. 1983.** ARF/WHO Scientific Meeting on Adverse Health and Behavioral Consequences of Cannabis Use (1981: Toronto, Canada) Cannabis and Health Hazards: *Proceedings of an ARF/WHO Scientific Meeting on Adverse Health and Behavioral Consequences of Cannabis Use*. Toronto, Canada: Addiction Research Foundation.
- Feinle C, O'Donovan D, Horowitz M. 2002.** Carbohydrate and satiety. *Nutr. Rev* 60: 155-169.

- Fekete C, Wittmann G, Liposits Z, y col. 2004.** Origin of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)-immunoreactive innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Comp. Neurol* 469: 340-350.
- Felder C, Glass M. 1998.** Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Am. Rev. Pharmacol. toxicol* 38: 179-200.
- Felder CC, Briley EM, Axelrad J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA. 1993.** Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal-transduction. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 7656-7660.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Glass M, Mackie KP, Fahey KJ, Cullinan GJ, Hunden DC, Johnson DW, Chaney MO, Koppel GA, Brownstein M. 1998.** LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 284: 291-297.
- Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. 1996.** Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *Febs. Letters* 393: 231-235.
- Fell GS, Fleck A, Cuthbertson DP, y col. 1973.** Urinary zinc levels as an indication of muscle catabolism. *Lancet* 2: 280-282.
- Fergusson DM, Horwood LJ, Ridder EM. 2005.** Tests of causal linkages between cannabis use and psychotic symptoms. *Addiction* 100: 354-366.
- Fergusson DM, Poulton R, Smith PF, Boden JM. 2006.** Cannabis and psychosis. *BMJ* 332: 172-174.
- Fernández-Ruiz JJ, Berrendero F, Hernández ML, Ramos JA. 2000.** The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends. Neurosci* 23: 14-20.
- Fernández-López D, Martínez-Orgado J, Casanova I, Bonet B, Leza JC, Lorenzo P, et al. 2005.** Newborn brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation as an in vitro model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J. Neurosci. Meth* 145: 205-212.
- Fernández-Ruiz JJ, Lastres-Becker I, Cabranes A, González S, Ramos JA. 2002.** Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukot. Esent. Fat. Acids* 66: 263-273.
- Fernández-Ruiz JJ, Rodríguez F, Navarro M, Ramos JA. 1992.** Maternal cannabinoid exposure and brain development: changes in ontogeny of dopamine neurons. En: *Marihuana/Cannabinoids: Neurobiology and Neurophysiology*. Bartke A, Murphy LL. Eds. CRC Press, Boca Raton, FL, Vol IV, pp. 119-164.
- Fetisov SO, Meguid MM, Chen C, Miyata G. 2000.** Synchronized release of dopamine and serotonin in the medial and the lateral hypothalamus of rats. *Neurosciences*. 101: 657-663.
- Fine KD, Santa ana CA, Portel JL, Fordtran JS. 1991.** Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. *J. Clin. Investig* 88: 396-402.
- Flatman PW. 1991.** Mechanism of magnesium transport. *Ann. Rev. Physiol* 52: 259-271.

- Flier JS, Maratos-Flier E, 1998.** Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* 92: 437-440.
- Flier JS. 2004.** Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116: 337-350.
- Flint A, Raben A, Ersboll AK, et al. 2001.** The effect of physiological levels of glucagon-like peptide-1 on appetite, gastric emptying, energy and substrate metabolism in obesity. *Int. Obes. Relat. Metab. Disord* 25: 781-792.
- Forbes S, Bui S, Robinson BR, y col. 2001.** Integrated control of appetite and fat metabolism by the leptin-proopiomelanocortin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4233-4237.
- Forsell P, Eberhardson M, Iennernas T, Knutson T, Knutson L. 2006.** Rapid modulation of Ca²⁺ uptake in human jejunal enterocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commu* 340: 961-966.
- Foster AC, Joppa M, Markison S, Gogas KR, Fleck BA, Murphy BJ et al. 2003.** Body weight regulation by selective MC4 receptor agonists and antagonists. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 994: 103-110.
- Foster DM, Aamodt RL, Henkin RI, y col. 1979.** Zinc-metabolism in humans - kinetic-model. *Am. J. Physiol* 237: R340-R349.
- Frausto de Silva JJR, Williams RJP. 1991.** The biological chemistry of magnesium: phosphate metabolism. The biological chemistry of the elements. Oxford University Press, pp. 241-267.
- Freddie LC, Zhang T, Gómez G, Greeley GH. 1991.** Peptide YY, a new gut hormone. *Steroids* 56: 77-82.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. 2003.** Role of endogenous cannabinoids in synaptic signalling. *Physiol. Rev* 83: 1017-1066.
- Fride E. 2002.** Endocannabinoids in the central nervous system-an overview. *Prostag. Leukot. Essent. Fat. Acids* 66: 221-233.
- Fride E. 2004.** The endocannabinoid CB1 receptor system in pre-and postnatal life. *Eur. J. Pharmacol* 500: 289-297.
- Friedman JM, Halaas JL. 1998.** Leptin and regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.
- Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Salvador J. 2001.** Leptin-induced lipolysis opposes the tonic inhibition of endogenous adenosine in white adipocyte. *Faseb. J* 15: 333-340.
- Fuentes JA, Ruiz-Gayo M, Manzanares J, Vela G, Reche I, Corchero. 1999.** Cannabinoids as potential new analgesics. *Life. Sci* 65: 675-685.
- Gagne CM, Acton JC. 1983.** Fiber constituents and fibrous food residue effects on the in vivo enzymatic digestion of protein. *J. Food. Sci* 48: 734-738.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. 1995.** Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Pharmacol* 232: 54-61.

- Gamber KM, Macarthur H, Westfall TC. 2005.** Cannabinoids augment the release of neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Neuropharmacology* 49: 646-652.
- García Alcántara A, de la torres Prados MV, Poulet Brea A. 2004.** Trastornos del metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. En: *Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral*. Riancho Moral JA, Conzáles MJ. Eds. Jarpyo Editores SA, Madrid, pp. 7-12.
- Gardner A, Mallet PE. 2006.** Suppression of feeding, drinking, and locomotion by a putative cannabinoid receptor “silent antagonist”. *Eur. J. Pharmacol* 530: 103-106.
- Garner A, Mallet PE. 2006.** Suppression of feeding, drinking, and locomotion by a putative cannabinoid receptor “silent antagonist”. *Eur. J. Pharmacol* 530: 103-106.
- Gautvik KM, de Lecea L, Gautvik VT, y col. 1996.** Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8733-8738.
- Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR. 1999.** Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Amer. J. Physiol* 276: H2085-H2093.
- Geiselman PJ. 1996.** Control of food intake. A physiologically complex, motivated behavioural system. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am* 25: 815-829.
- Gerdeman G, Lovinger DM. 2001.** CB₁ cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J. Neurophysiol* 85: 468-471.
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM. 2002.** Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat. Neurosci* 5: 446-451.
- Germanó MP, D’Angelo V, Mondello MR, Pergolizzi S, Capasso F, capasso R. Izzo AA, Mascolo N, De Pasquale R. 2001.** Cannabinoid CB1-mediated inhibition of stress-induced gastric ulcers in rats. *Naunyn Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol* 363: 242-244.
- Gessa GL, Mascia MS, casu MA, carta G. 1997.** Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. *Eur. J. Pharmacol* 327: R1-R2.
- Ghodse AH. 1986.** Cannabis psychosis. *Br. J. Addict* 81: 473-478.
- Gibbins RJ, McDougall J, Miles CG, Marshman JA. 1976.** Tolerance to marijuana induced tachycardia in man. *Acta. Pharmacol. Toxicol* 39: 65-76.
- Gifford AN, Ashby CR JR. 1996.** Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist SR 141716A. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 277: 1431-1436.
- Gifford AN, Tang Y, Gatley SJ, Volkow ND, Lan R, makriyannis A. 1997.** Effect of the cannabinoid receptor SPECT agent, AM 281, on hippocampal acetylcholine release from rat brain slices. *Neuroscience. Lett* 238: 84-86.
- Gilbert GL, Kim HJ, Waataja JJ, Thayer SA. 2007.** Δ⁹-Tetrahydrocannabinol protects hippocampal neurons from excitotoxicity. *Br. Res* 1128: 61-69.

- Gitler CS. 1964.** Protein digestion and absorption in nonruminants. En: *Mammalian Protein Metabolism*. Munro HN, Allison JB. Eds. Academic Press, New York, pp. 35-70.
- Giuffrida A, Beltramo M, Piomelli D. 2001.** Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 298: 7-14.
- Glass M, Dragunow M, Faull RLM. 1997.** Cannabinoid receptors in the human brain; A detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77: 299-318.
- Glass M, Felder CC. 1997.** Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurones: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J. Neurosci* 17: 5327-5333.
- Gómez AC, Rodríguez GM, Cannata JB. 2004.** Metabolismo del calcio, del fósforo y del magnesio. En: *Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral*. Riancho Moral JA, Conzáles MJ. Eds. Jarpyo Editores SA, Madrid, pp. 7-12.
- Gómez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo MJ, Bilbao A, Del Arco I, Cippitelli A, Nava F, Piomelli D, and Rodríguez de Fonseca F. 2002.** A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J. Neurosci* 22: 9612-9617.
- González S, Cebeira M, Fernandez-Ruiz J. 2005.** Cannabinoid tolerance and dependence a review of studies in laboratory animals. *Pharmacol. Biochem. Behav* 81: 300-318.
- González S, Fernández-Ruiz J, Di Marzo V, Hernandez M, Arevalo C, Nicanor C, Cascio MG, Ambrosio E, Ramos JA. 2004.** Behavioral and molecular changes elicited by acute administration of SR 141716 to Delta9-tetrahydrocannabinol tolerant rats: an experimental model of cannabinoid abstinence. *Drug. Alcohol. Depend* 74: 159-170.
- González S, Romero J, de Miguel R, Lastres-Becker I, Villanúa MA, Makriyannis A, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ. 1999.** Extrapyramidal and neuroendocrine effects of AM 404, an inhibitor of the carrier-mediated transport of anandamide. *Life. Sci* 65: 327-336.
- Graham LA, Ceasar JJ. 1960.** Burden gastrointestinal absorption and excretion of Mg 28 in man. *Metab. Clin. Exp* 9: 646-659.
- Griffin G, Fernando SR, Ross RA, McKay NG, Ashford MLJ, Shire D, Huffman JW, Yu S, Lainton JAM, Pertwee RG. 1997.** Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol* 339: 53-61.
- Groff JL, Gropper SS. 2000.** Advanced nutrition and human metabolism. (3rd ed). Wadsworth Thomson Learning, Belmont, CA.
- Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL, Bruning JC. 2005.** Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nature. Neurosci* 8: 1289-1291.
- Guilmeau S, Buyse M, Bado A. 2004.** Gastric leptin: a ne manager of gastrointestinal function. *Curr. Opin. Pharmacol* 4: 561-6.
- Gutierrez T, Farthing JN, Zvonok AM, Makriyannis A, Hohmann AG. 2007.** Activation of peripheral cannabinoid CB1 and CB2 receptors suppresses the maintenance of inflammatory nociception: a comparative analysis. *Br. J. Pharmacol* 150: 153-163.

- Gutzwiller JP, Drewe J, Goke B, y col. 1999.** Glucagon-like-peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *Am. J. Physiol* 276: R1541-R1544.
- Gutzwiller JP. 1994.** Effect of intravenous human gastrin releasing peptide on food intake in humans. *Gastroenterology* 106:1168-1173.
- Guyton AC, Hall JE. 2000.** En: *Textbook of Medical Physiology*. (10th ed). WB Saunders, Philadelphia, pp. 836-943.
- Guzmán M y col. 2001.** Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *J. Mol. Med* 78: 613-625.
- Gúzman M, Sánchez C, Galve-Roperh I. 2002.** Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol. Ther* 95: 175-184.
- Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van DerPloeg LH et al. 2000.** Longterm orexigenic effect of AgRP (83-132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am. J. Physiol* 279: R47-52.
- Hájos N, Freund TF. 2002.** Pharmacological separation of cannabinoid sensitive receptors on hippocampal excitatory and inhibitory fibers. *Neuropharmacology* 43: 503-510.
- Hájos N, Ledent C, Freund TF. 2001.** Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience* 106: 1-4.
- Halford JC, Harrold JA, Lawton CL, Blundell JE. 2005.** Serotonin (5-HT) drugs: Effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Curr. Drug. Targets* 6: 201-213.
- Hambidge KM, Casey CE, Krebs NF. 1986.** Zinc. En: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. Mertz W. Ed. Academic Press, Orlando, FL, Vol 2, pp. 1-37.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod, Wink D. 1998.** Cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc. Acad. Sci. USA*. 95: 8268-8273.
- Haney M, Ward AS, Comer SD, Flotin RW, Fischman MW. 1999a.** Abstinence symptoms following oral THC administration to humans. *Psychopharmacology* 141: 385-394.
- Haney M, Ward AS, Comer SD, Flotin RW, Fischman MW. 1999b.** Abstinence symptoms following smoked marijuana to humans. *Psychopharmacology* 141: 395-404.
- Haney M, Ward aS, Comer SD, Wards aS, Foltin RW, Fischman MW. 1997.** Factors influencing marijuana self-administration by humans. *Behav. Pharmacol* 8: 101-112.
- Hansen HH, Ikonomidou C, Bittigau P, y col. 2001.** Accumulation of the anandamide precursor and other N-acyl ethanolamine phospholipids in infant rat models of in vivo necrotic and apoptotic neuronal death. *J. Neurochem* 76: 39-46.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2001.** 2-araquidonyl glycerol ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci* 98: 3662-3665.
- Hao S, Avraham Y, Mechoulam R, Berry EM. 2000.** Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet, restricted mice. *Eur. J. Pharm* 392: 147-156.

- Hara H, Konishi A, Kasai T. 2000.** Contribution of the cecum and colon to zinc absorption in rats. *J. Nutr* 130: 83-89.
- Hardman GL. 1976.** Self-reporting radiograph. *Br. J. Radiol* 49: 298-298.
- Hardwick LL, Jones MR, Brautbar N, Lee DB. 1990.** Site and mechanism of intestinal magnesium absorption. *Miner. Electrolyte. Metab* 16: 174-180.
- Haring M, Marsicano G, Lutz B, Monory K. 2007.** Identification of the cannabinoid receptor type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice. *Neuroscience* 146: 1212-1219.
- Harper AE, Kumpta US. 1964.** Citado por Harper AE. En: *Mammalian Protein Metabolism*. Munro HN, Allison JB. Eds. Academic Press. New York, Vol II, pp. 88.
- Harper AE, Miller RH, Block KP. 1984.** Branched-chain amino acid metabolism. *Ann. Rev. Nutr* 4: 409-454.
- Harrold JA, Elliot JC, King PJ, Widdowson PS & Williams G. 2002a.** Down-regulation of cannabinoid-1 (CB1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? *Brain. Res* 952: 232-238.
- Harrold JA., Elliott JC, King PJ, Widdowson PS, Williams G. 2002b.** Down-regulation of cannabinoid CB1 receptor in specific receptor on anxiety. *Eur. J. Neurosci* 16: 1395-1398.
- Hart CL, Ward AS, Haney M, Comer SD, Foltin RW, Fischman MW. 2002.** Comparison of smoked marijuana and oral Delta-9-tetrahydrocannabinol in humans. *Psychopharmacology (Berlin)* 164: 407-415.
- Hartwell D, Hassager C, Overgaard K, Riis BJ, Podenphant JR, Christiansen C. 1990.** Vitamin D metabolism in osteoporotic women during treatment with estrogen, an anabolic steroid, or calcitonin. *Acta. Endocrinol (Copenh)* 122: 715-721.
- Harvey DJ. 1984.** Chemistry, metabolism and pharmacokinetics of the cannabinoids. Nahas GG. Ed. Raven Press, New York, pp. 37-107.
- Harvey DJ. 1999.** Absorption, distribution and biotransformation of the cannabinoids. Nahas GG, Sutin KM, Harvey DJ, Agurell S. Eds. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 91-103.
- Haussinger D, Lamers WH, Moorman AF. 1992.** Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme* 46: 72-93.
- Havel PJ, Larsen PJ. 1998.** Control of food intake. *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. Totowa: 335- 351.
- Henquet C, Krabbendam L, Spauwen J, y col. 2005.** Prospective cohort study of cannabis use, predisposition of psychosis, and psychotic symptoms in young people. *Brit. Med. J* 330: 11-14.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC .1991.** Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative *in vitro* autoradiographic study. *J. Neurosci* 11: 563-583.
- Herring AC, Kaminiski NE. 1999.** Cannabinol-mediated inhibition of nuclear factor-kB, cAMP response element-binding protein, and interleukin-2 secretion by activated thymocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 291: 1156-1163.

- Heydorn A, Sondergaard BP, Ersboll B, Holst B, Nielsen FC, Haft CR, Whistler J, Schwartz TW. 2004.** A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G-protein coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *J. Biol. Chem* 279:54291-54303.
- Hikiji K, Inoue K, Iwasaki S, Ichihara K, Kiriike N. 2004.** Local perfusion of mCPP into ventromedial hypothalamic nucleus, but not into lateral hypothalamic area and frontal cortex, inhibits food intake in rats. *Psychopharmacology* (Berl).
- Hilairiet S, Bouaboula M, Carriere D, Le Fur G, Casellas P. 2003.** Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716A. *J. Biol. Chem* 278: 23731-23737.
- Hildebrant AL, Kelly-Sullivan DM, Black SC. 2003.** Antiobesity effects of chronic cannabinoid CB1 receptor antagonist treatment in diet-induced obese mice. *Eur. J. Pharmacol* 462: 125-132.
- Hillard CJ, Manna S, Greenberg MJ, Dicomelli R, Ross RA, Stevenson LA, Murphy V, Pertwee, RG & Campbell WB. 1999.** Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J. Pharmacol. Exp. Ther* 289: 1427–1433.
- Hillebrand JJ, de Weid D, Adan RA. 2002.** Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23: 2283-306.
- Ho LH, Ruffin RE, Murgia CLiL, Krilis SA, Zalewski PD. 2004.** Labile zinc and zinc transporter ZnT4 in mast cell granules: role in regulation of caspase activation and NF-kB translocation. *J. Immunol* 172: 7750-7760.
- Hoaldley JE, Leinart AS, Cousins RJ. 1988.** Relationship of 65Zn absorption on kinetics to intestinal metallothionein in rats: effects of zinc depletion and fasting. *J. Nutr* 118: 497-502.
- Hoehe MR, Caenazzo L, Martinez MM, Hsieh WT, Modi WS, Gershon ES and Bonner T.I. 1991.** Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New. Biolo* 3:880-885.
- Hoendrerop JGJ, Nilius B, Bindels RJM. 2005.** Calcium absorption across epithelia. *Physiol. Rev* 373-422.
- Hohmann AG, Herhenham M. 1999.** Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: A double-label in situ hybridization study. *Neuroscience* 90: 923-931.
- Hohmann AG, Tsou K, walker JM. 1999.** Cannabinoid suppression of noxious heat-evoked activity in wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat. *J. Neurophysiol* 81: 575-583.
- Hollister LE. 1986.** Health aspects of cannabis. *Pharmacol. Rev* 38: 1-17.
- Hollister LE. 1988.** Cannabis-1988. (Literature review). *Acta Psychiatr. Scand* 78: 108-118.
- Holst JJ, 1997.** Enteroglucagon. *Ann. Rev. Physiol* 59: 257-271.
- Holzer-Petsche U. 1995.** Tachykinin receptors in gastrointestinal motility. *Regul. Pept* 57: 19-42.

- Horvath TL. 2003.** Endocannabinoids and the regulation of body fat: the smoke is clearing. *J. Clin. Invest* 112: 323-326.
- Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. 2002.** Structural divergence of human ghrelin, identification of multiples ghrelin- derived molecules produced by post-translational processing. *J. Biol. Chem* 278:64-70.
- Howes OD, McDonald C, Cannon M, Arseneault L, Boydell J, Murray RM. 2004.** Pathways to schizophrenia: the impact of environmental factors. *Int. J. Neuropsychoph* 7: S7-S13.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, MacKie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. 2002.** International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev* 54: 161-202.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. 2003.** International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *PNAS*. 2, 161-202.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hamson RE, Porrino LJ. 2004.** Cannabinoid physiology and pharmacology 30 yers of progress. *Neuropharmacology* 47: 345-358.
- Hu Z, Cha SH, Chohnan S, Lane MD. 2003.** Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100: 12624-12629.
- Huang CC, Lo SW, Hsu KS. 2001.** Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J. Physiol (Lond)* 532: 731-748.
- Huang I, Kirschke CP, Gitschier J. 2002.** Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J. Bio. Chem* 277: 26389-26395.
- Huestis MA, Henningfield JE, Cone EJ. 1992.** Blood cannabinoids: I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THC-COOH during and after smoking marijuana. *J. Anal. Toxicol* 16: 276-286.
- Huestis MA, Mitchell JM, Cone EJ. 1996.** Urinary excretion of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in humans after single smoked doses of marijuana. *J. Anal. Toxicol* 20: 441-452.
- Hurley LS, Tao S. 1972.** Alleviation of teratogenic effects of zinc deficiency by simultaneous lack of calcium. *Am. J. Physiol* 222: 322-325.
- Huszar D et al. 1997.** Target disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88: 131-141.
- Hutcheson DM, Tzavara ET, Smadja C, Valjent E, Roques BP, Hanoune J, Maldonado R. 1998.** Behavioural and biochemical evidence of signs of abstinence in mice chronically treated with Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Br. J. Pharmacol* 125: 1567-1577.
- Ihenetu K, Molleman A, Parsons mE, Whelan CJ. 2003.** Inhibition of interleukin-8 release in the human colonic epithelial cell line HT-29 by cannabinoids. *Eur. J. Pharmacol* 458: 207-215.
- Inui A. 2000.** Transgenic approach to the study of body weight regulation. *Pharmacol. Rev* 52: 35-61.

- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G. 1996.** Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br. J. Pharmacol* 118: 2023-2028.
- Iverson L. 2003.** Cannabis and the brain. *Brain* 126: 1252-1270.
- Izzo AA, Capasso F, Costagliola A, Bisogno T, Marsicano G, Ligresti A, Matias I, Capasso R, Pinto L, Borrelli F, Cecio A, Lutz B, Mascolo N, Di Marzo V. 2003.** An endogenous cannabinoid tone attenuates cholera toxin-induced fluid accumulation in mice. *Gastroenterology* 125: 765-774.
- Izzo AA, Fezza F, Capasso R, Bisogno T, Pinto L, Luvone T, Eposito G, Mascolo N, Di Marzo V, Capasso F. 2001.** Cannabinoid Cb1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a modelo f intestinal inflammation. *Br. J. Pharmacol* 134: 563-570.
- Izzo AA, Mascolo N, Borrelli F, Capasso F. 1998.** Excitatory transmiión to the circular muscle of the guinea-pig ileum: evidence for the involvement of cannabinoid CB1 receptor. *Br. J. Pharmacol* 124: 1363-1368.
- Izzo AA, Mascolo N, Borrelli F, Capasso F. 1999.** Defaecation intestinal fluid accumulation and motility in rodents: implications of cannabinoid CB1 receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's. Arch Pharmacol* 359: 65-70.
- Izzo AA, Mascolo N, Pinto L, Capasso R, Capasso F. 1999.** The role of cannabinoid receptors in intestinal motility, defaecation and diarrhoea in rats. *Eur. J. Pharmacol* 384: 37-42.
- Izzo AA, Pinto L, Borrelli R, Capasso R, Mascolo F, Capasso F. 2000.** Central and peripheral cannabinoid modulation of gastrointestinal transit in physiological status or during the diarrhoea induced by croton oil. *Br. J. Pharmacol* 129: 1627-1632.
- Izzo AA. 2004.** Cannabinoids and intestinal motility: welcome to CB2 receptors. *Br. J. Pharmacol* 142: 1201-1202.
- Jackson MJ, Jones DA, Edwards RHT, y col. 1984.** Zinc homeostasis in man - studies using a new stable isotope-dilution technique. *Br. J. Nutr* 51: 199-208.
- Jacobson L. 1999.** Glucocorticoid replacement, but not corticotropin-releasing hormone deficiency, prevents adrenalectomy-induced anorexia in mice. *Endocrinology* 140: 310-317.
- Jaffe JH. 1990.** Drug addiction and drug abuse. En: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Goodman. Gilman AG, Rall T, Nies AS. Eds. Pergamon Press, New York, pp. 549-553.
- Jaggar SI, hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS. 1998.** The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain* 76: 189-199.
- Jaksic Y, Wagner DA, Burke JF, Young VR. 1991.** Proline metabolism in adult male burned patients and healthy control subjects. *Am. J. Clin. Nutr* 54: 408-413.
- Jamshidi N, Taylor DA. 2001.** Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Brith. J. Pharmacol* 134: 1151-1154.
- Jan TR, Kaminski NE. 2001.** Role of mitogen-activated protein kinases in the differential regulation of interleukin-2 by cannabinoil. *J. Leukoc. Biol* 69: 841-849.

- Járai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, y col. 1999.** Cannabinoid-induced mesenteric vasodilatation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14136-14141.
- Järbe TUC, DiPatrizio NV. 2005.** Δ^9 -THC induced hyperphagia and tolerance assessment: interactions between the Cb1 receptor agonist Δ^9 -THC and the CB1 receptor antagonist SR-141716 (rimonabant) in rats. *Behav. Pharmacol* 16: 373-380.
- Järbe TUC, Ross T, DiPatrizio NV, Pandarinathan L, Makriyannis A. 2006.** Effects of the CB1R agonist WIN 55,212-2 and the CB1R antagonists SR-141716 and AM-1387: Open-field examination in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav* 85: 243-252.
- Jarivalla RJ, Sabin R, Lawson S, Herman ZS. 1990.** Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytate. *J. Appl. Nutr* 42: 18-28.
- Jbilo O, Ravinet-trilloi C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, peleraux A, Penarier G, Soubrie P, Le Fur G, Galiegue S, Casellas P. 2005.** The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB. J* 19: 1567-1569.
- Joanne A, harrold JA, Williams G. 2003.** The cannabinoid system: a role in both the homeostatic and hedonic control of eating. *Br. J. Nutri* 9: 729-734.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath T, Kalra PS. 1999.** Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine. Rev* 20: 68-100.
- Kalra SP, Kalra PS. 2004.** NPY and cohorts in regulating appetite, obesity and metabolic syndrome: bebeficial effects of gene therapy. *Neuropeptides* 38: 201-211.
- Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, y col. 2002.** Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem* 277: 19049-19055.
- Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R, Nagao M. 2004.** Overview of mammalian zinc transporter. *Cell. Mol. Life. Sci* 61: 49-68.
- Kaplan SL, Pitot HC. 1970.** The role of the liver in regulation of amino acid protein metabolism. En: *Mammalian Protein Metabolism*. Munro HN. Ed. Academic Press, New York, Vol. 4, pp. 387-443.
- Karler R, Calder LD, Sangdee P, Turkanis SA. 1984.** Interaction between delta 9-tetrahydrocannabinol and kindling by electrical and chemical stimuli in mice. *Neuropharmacology* 23: 1315-1320.
- Kass-Wolff JH. 2004.** Calcium in women: Healthy bones and much more *J. Obs. Gyn. Neonat. Nur* 33: 21-33.
- Kathmann M, Weber B, Zimmer A, SchilckerE. 2001.** Enhanced acetylcholine release in the hippocampus of cannabinoid CB1 receptor-deficient mice. *Br. J. Pharmacol* 132: 1169-1173.
- Kato J, Saito M. 1980.** Circadian rhythmic changes in blood urea of rats and its relation to food intake. *Nutr. Rep. In* 21: 101-105.
- Kaup SM, Behling AR, Choquette L, Greger JL. 1990.** Calcium and magnesium utilización in rats: Effects of dietary butterfat and calcium and of age. *J. Nutr* 120: 266-273.

- Kaushik N, Pietraszewski M, Holst JJ, y col. 2005.** Enteral feeding without pancreatic stimulation. *Pancreas* 31: 353-359.
- Kawano H, Honma S, Honma A, y col. 2002.** Melanin-concentrating hormone neuron system: the Wide Web that controls the feeding. *Anat. Sci. Int* 77: 149-160.
- Kayne LH, Lee DB. 1993.** Intestinal magnesium absorption. *Miner. Electrolyte. Meatb* 19: 210-217.
- Kennedy AR, Todd JF, Stanley SA, Abbott CR, Small CJ, Ghatei MA y col. 2001.** Melanin-concentrating hormone (MCH) suppresses thyroid stimulating hormone (TSH) release, in vivo and in vitro, via the hypothalamus and the pituitary. *Endocrinology* 142: 3265-3268.
- Kevin D, Cashman Phd. 2006.** A prebiotec substance persistently enhances intestinal calcium absorption and increases bone mineralization in young adolescents. *Nutr. Rev* 64 (4): 189-196.
- Kim EK, Miller I, Landree LE, Borisy-Rudin FF, Brown P, Tihan T, Townsend CA, Witters LA, Moran TH, Kuhajda FP, Ronnett GV. 2002.** Expression of FAS within hypothalamic neurons: a model for decreased food intake after C75 treatment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 283: E867-E879.
- King JC, Keen CL. 1994.** Zinc. *En: Modern Nutrition in Health and Disease. (8th Edition)*. Shils ME, Olson JA, Shike M. Ed, PA, USA, Vol 1, pp. 214-231.
- King JC, Turnlund JR. 1989.** Human zinc requirements. *En: Zinc in Human Biology*. Mills CF. Ed. Springer-Verlag, New York, pp. 335-350.
- Kirkham TC, Williams CM. 2001.** Synergistic effects of opioid and cannabinoid antagonists on food intake. *Psychopharmacology* 153: 267-270.
- Kirkham TC, Williams CM. 2004.** Endocannabinoid receptor antagonists: potential for obesity treatment. *Treat. Endocrinol* 3: 345-360.
- Kirschke CP, Huang L. 2003.** ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem* 278: 4096-4102.
- Kishi T, Aschkenasi CJ, Choi BJ, Lopez ME, Lee CE, Liu H, Hollenberg AN, Friedman JM, Elmquist JK. 2005.** Neuropeptide Y Y1 receptor mRNA in rodent brain: distribution and colocalization with melanocortin-4 receptor. *J. Comp. Neurol* 482: 217-243.
- Kishi T, Elmquist JK. 2005.** Body weight is regulated by the brain: a link between feeding and emotion. *Mol. Psychiatry* 10: 132-146.
- Klein TW, Newtonc, Treidman M. 1998.** Cannabinoid receptors and immunity. *Immunology. Today* 19: 373-381.
- Klein TW. 2005.** Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nature. Rev* 5: 400-411.
- Kobayashi Y, Arai S, Waku K, Sugiura T. 2001.** Activation by 2-arachidonyglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, of p42/44 mitogen-activated protein kinase in HL-60 cells. *J. Neurosci* 18: 1973-1978.
- Koch JE. 2001.** Δ^9 -THC stimulates food intake in Lewis rats: Effects on chow, high-fat and sweet high-fat diets. *Pharmacol. Biochem. Behav* 68: 539-543.

- Köfalvi A, Rodríguez RJ, Ledent C, Mackie K, Vizi ES, Cunha RA, Sperlág B. 2005.** Involvement of cannabinoid receptors in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J. Neurosci* 25: 2874-2884.
- Köfalvi A, Vizi ES, Ledent C, Sperlág B. 2003.** Cannabinoids inhibit the release of [³H] glutamate from rodent hippocampal synaptosomes via a novel CB₁ receptor-independent action. *Eur. J. Neurosci* 18: 1973-1978.
- Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K. 2001.** Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trend. Endocrinol. Metab* 12: 118-122.
- Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, y col. 2004.** Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J. Physiol. Pharmacol* 55: 137-54.
- Koo WWK, Tsang RC. 1993.** Calcium, magnesium, phosphorus, and vitamin D. En: *Nutritional needs of the preterm infant. Scientific basis and practical guidelines.* Tsang RC, Lucas A, Uauy R, Zlotkin S. Eds. Baltimor: Williams and Wilkins, pp.135-155.
- Koob GF. 1996.** Drug addiction: The Yin and Yang of hedonic homeostasis. *Neuron* 16: 893-896.
- Koura Y, Ichihara A, Tada Y, Kaneshiro Y, Okada H, Temm CJ, Hayashi M, Saruta T. 2004.** Anandamide decreases glomerular filtration rate through predominant vasodilation of efferent arteriales in rat kidneys. *Am. Soc. Nephrol* 15: 1488-1494.
- Kouri EM, Pope HG JR, Lukas SE. 1999.** Changes in aggressive behavior during withdrawal from long-term marijuana use. *Psychopharmacology* 143: 302-308.
- Kouri EM, Pope HG JR. 2000.** Abstinence symptoms during withdrawal from chronic marijuana use. *Psychopharmacology* 8: 483-492.
- Krebs HA. 1964.** The metabolic fate of amino acids. En: *Mammalian protein metabolism.* Munro HN, Allison JM. Eds. Academic Press, New York, Vol. 1, pp. 125-176.
- Krebs MF. 2001.** Bioavailability of dietary supplements and impact of physiologic state: infants, children and adolescents. *J. Nutr* 131: 1351S-1354S.
- Kreitzer AC, Regehr WG. 2001.** Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *J. Neurosci* 21: RC 174.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS y col. 1998.** Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393: 72-76.
- Krowicki ZK, Moerschbaecher JM, Winsauer PJ, Digavalli SV, Hornby PJ. 1999.** Δ⁹-tetrahydrocannabinol inhibits gastric motility in the rat through cannabinoid CB₁ receptors. *Eur. J. Pharmacol* 37: 187-196.
- Kulkarni-Narla A, Brown DR. 2000.** Localization of CB₁-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system. *Cell. Tissue. Res* 302: 73-80.
- Kumar R. 1990.** Vitamin D metabolism and mechanisms of calcium transport. *J. AM. Soc. Nephrol* 1: 30-42.
- Kumar R. 1991.** Vitamin D and calcium transport. *Kidney. Int* 40: 1177-1189.

- Kumar R. 1997.** Vitamin D and the kidney. En: *Vitamin D*. Feldman D, Glorieux FH, Pike JW. Eds. Academic Press, San Diego, pp. 275-292.
- Kumar R. 2000.** Tumor-induced osteomalacia and the regulation of phosphate homeostasis. *Bone* 27: 333-338.
- Kumar R. 2002a.** $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 - Not just a calciotropic hormone. *Nephron* 91: 576-581.
- Kumar R. 2002b.** New insight into phosphate homeostasis: fibroblast growth factor 23 and frizzled-related protein-4 are phosphaturic factor derived from tumors associated with osteomalacia. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 11: 547-553.
- Kunos G, Osei-hyiaman D, Wang L, Liu J, Bátkai S. 2002.** Endocannabinoids: novel lipid mediators in the neural control of appetite. En: *Progress in Obesity Research*. Medeiros-Neto G, Halpern A, Bouchard C. Eds. John Libbery Eurotext. Surrey, UK, pp. 826-828.
- Kurbel S, Radic R, Kotromanovic Z, y col. 2003.** A calcium homeostasis model: orchestration of fast acting PTH and calcitonin with slow calcitriol. *Med. Hyp* 61: 346-350.
- Kwong WKI, Seetharam B, Alpers DH. 1982.** Effects of exocrine pancreatic insufficiency in small intestine in the mouse. *Gastroenterology* 74: 1277-1282.
- Laidlaw SA, Kopple JD. 1987.** Newer concepts of the indispensable amino acid. *Am. J. Clin. Nutr* 46: 593-605.
- Lamarck JB. 1985.** Encyclopedi Methodique. Botanique, Paris, vol, pp. 695.
- Landi M, Croci T, Rinaldi-Carmona M, Maffrand JP, Le Fur G, Manara L. 2002.** Modulation of gastric emptying and gastrointestinal transit in rats through intestinal cannabinoid CB1 receptors. *Eur. J. Pharmacol* 450: 77-83.
- Las Naciones Unidas y la Fiscalización del uso indebido de drogas, ONU, Nueva Cork, 1990.**
- Lau T, Schloss P. 2008.** The cannabinoid CB1 receptor is expressed on serotonergic and dopaminergic neurons. *Eur. J. Pharmacol* 578: 137-141.
- Lazarczyk MA, Lazarczyk M, Grzela T. 2003.** Ghrelin: A recently discovered gut-brain peptide. *Int. J. Mol. Med* 12: 279-287.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmetier M. 1999.** Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283: 15-19.
- Lederer ED, Sohi SS, McLeish KR. 2000.** Parathyroid hormone stimulates extracellular signal regulated kinase (ERK) activity through two independent signal transduction pathways: Role of ERK in sodium phosphate cotransport. *J. Am. Soc. Nephrol* 11: 222-231.
- Lee HH, Prasad AS, Brewer GJ, et al. 1989.** Zinc-absorption in human small-intestine. *Am. J. Physiol* 256: G87-G91.

- Lee M, Yang KH, Kaminski NE. 1995.** Effects of putative cannabinoid receptor ligands, anandamide and 2-arachidonyl-glycerol, on immune function in B6C3F1 mouse splenocytes. *J. Pharm. Exp. Ther* 275: 529-536.
- Leibowitz SF, Hoebel BG. 1998.** Behavioral Neuroscience of obesity. En: *Handbook of Obesity*. Bray, Bouchard, James. Eds. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 314-358.
- Leibowitz SF, Wortley KE. 2004.** Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 25: 473-504.
- Leibowitz SF. 1989.** Hypothalamic neuropeptide Y, galanin, and amines: Concepts of coexistence in relation to feeding behaviour. *Ann. NY. Acad. Sci* 575: 221-233.
- Leibowitz SF. 1992.** Neurochemical-neuroendocrine systems in the brain controlling macronutrient intake and metabolism. *Trends. Neurosci* 15: 491-479.
- Lerma A, Planells E, Aranda P, Llopis J. 1995.** Effect of magnesium deficiency on fatty acid composition of the erythrocyte membrana and plasma lipid concentración in rats. *J. Nutr. Biochem* 6,11: 577-581.
- Levin BE, Routh VH. 1996.** Role of the brain in energy balance and obesity. *Am. J. Physiol* 271: R 491-500.
- Li J, Daughters RS, Bullis C, Bengiamin R, Stucky MW, Brennan J, Simone DA. 1999.** The cannabinoid receptor agonist Win 55,212-2 mesylate blocks the development of hyperalgesia produced by capsaicin in rats. *Pain* 81: 25-33.
- Li X, Kaminski NE, Fischer LJ. 2001.** Examination of the immunosuppressive effect of delta 9-tetrahydrocannabinol in streptozotín-induced autoimmune diabetes. *Int. Immunopharmacol* 1: 699-712.
- Li Z, Kong K, Qi W. 2006.** Osteoclast an dits roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. *Biochem. Biophys. Res. Commu* 343: 345-350.
- Lichtman AH, Martin BR. 1991.** Cannabinoid-induced antinociception is mediates by a spinal $\alpha 2$ -noradrenergic mechanism. *Brain. Res* 559: 309-314.
- Lichtman AH, Wiley JL, Iavecchia KL, Neviasser ST, Arthur DB, Wilson DM, Martin BR. 1998.** Effects of SR 141716A after acute or chronic cannabinoid administration in dogs. *Eur. J. Pharmacol* 357: 139-148.
- Licincio J, Mantzoros C, Negrao AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB, y col. 1997.** Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary- adrenal function. *Nat. Med* 3: 575-579.
- Lieverse RJ, Jansen JB, Van de Zwan A. y col. 1993.** Bombesin reduces food intake in lean man by a cholecystokinin-independent mechanism. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 76: 1495-1498.
- Liu M, Doi T, Shen L, Woods SC, Seeley RJ, Zheng S, y col. 2001.** Intestinal satiety protein apolipoprotein AIV is synthesized and regulated in rat hypothalamus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 280: R1382-1387.
- Liu P, Bilkey DK, Darlington CL, Smith PF. 2003.** Cannabinoid CB1 receptor protein expression in the rat hippocampus and entorhinal, perirhinal, postrhinal and temporal cortices: regional variations and age-related changes. *Br. Res* 979: 235-239.

- Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, y col. 2005.** Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Inter. J. Obes* 29: 183-187.
- Loewy B, Marczynski GT, Dingwall A, y col. 1990.** Regulatory interactions between phospholipid synthesis and DNA replication in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol* 172: 5523-30.
- Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP. 2000.** Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288: 2379-2381.
- Lönnerdal B. 1989.** Intestinal absorption of zinc. En: *zinc in Human Biology*. Mills CF. Ed. International Life Science Institute, London, pp. 33-583.
- Lönnerdal B. 2000.** Dietary factors influencing zinc absorption. *J. Nutr* 130: 1378S-1383S.
- López HW, Coudray C, Bellanger J, Younes H, Demigne C, Remesy C. 1998.** Intestinal fermentation lessens the inhibitory effects of phytic acid on mineral utilization in rats. *J. Nutr* 128: 1192-1198.
- Lu QH, Swierczek JS, Zhu XG, y col. 1986.** Central versus peripheral effects of bombesin on the release of gastrointestinal hormones in dogs. *J. Neurosci. Res* 16: 553-559.
- Luiten PG, ter Horst GJ, Steffens AB. 1987.** The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Prog. Neurobiol* 28:1-54.
- Lundqvist T. 2005.** Cognitive consequences of cannabis use: comparison with abuse of stimulants and heroin with regard to attention, memory and executive functions. *Pharmacol. Biochem. Behav* 81: 319-330.
- Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. 2005.** NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310: 683-685.
- Lutheshi G, Gardner J, Rushforth D, Loudon A, Rothwell N. 1999.** Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7047-7052.
- Mac Naughton WK, Van Sickle MD, Keenan CM, Cushing K, Mackie K, Sharkey KA. 2004.** Distribution and function of the cannabinoid-1 receptor in the modulation of ion transport in the guinea pig ileum: relationship to capsaicin-sensitive nerves. *Am. J. Physiol. Gastrointes. Liver. Physiol* 286: G863-G871.
- Maccarrone M, Bisogno T, Valensise H, Lazzarin N, Fezza F, Manna C, Di Marzo V, Finazzi-agró A. 2002.** Low fatty acid amide hydrolase and high anandamide levels are associated with failure to achieve an ongoing pregnancy after IVF and embryo transfer. *Mol. Hum. Reprod* 8: 188-195.
- Maccarrone M, De Felici M, Bari M, Klinger F, Siracusa G, Finazzi-Agró A. 2000b.** Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur. J. Biochem* 267: 2991-2997.
- Mackie K, Devane WA, Hill B. 1993.** Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as partial agonists in N18 neuroblastoma cells. *Mol. Pharmacol* 44: 498-503.

- Mackie K. 2006.** Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 46: 101-122.
- Macleod J, Oakes R, Copello A, Crome I, Egger M, Hickman M, Oppenkowski T, Stokes-Lampard H, Davey Smith G. 2004.** Psychological and social sequelae of cannabis and other illicit drug use by young people: a systematic review of longitudinal, general population studies. *Lancet* 363: 1579-1588.
- Magour S, Copher H, Fahndrich C. 1977.** Is tolerance to delta-9-THC cellular or metabolic? The subcellular distribution of delta-9-tetrahydrocannabinol and its metabolites in brains of tolerant and non tolerant rats. *Psychopharmacology* 51: 141-145.
- Mailleux P, Vanderhaeghem JJ. 1993.** Glucocorticoid regulation of cannabinoid receptor messenger RNA levels in rat caudate-putamen. An insitu hybridation study. *Neurosci. Lett* 156: 51-53.
- Malan TP, Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T, Porreca F, Makriyannis A. 2001.** . CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 93: 239-245.
- Maldonado R, Rodríguez de Fonesca F. 2002.** Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlatos. *J. Neurosci* 22: 3326-3331.
- Maldonado R. 2001.** Involvement of different opioid receptors and peptides in cannabinoid dependence. *Br. J. Pharmacol* 134: 196P.
- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R, Feldmann M. 2000.** The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci* 97: 9561-9566.
- Manara L, Croci T, Guagnini F, Rinaldi-Carmona M, Maffrand JP, Le Fur G, Mukenge S, Ferla G. 2002.** Functional assessment of neuronal cannabinoid receptors in the muscular layers of human ileum and colon. *Dig. Liver. Dis* 34: 262-269.
- Mann J. 2001.** Carbohydrates. En: *Present Knowledge in Nutrition* (8th ed). Bowman BA, Russell RM. Eds. Washington, DC: International Life Sciences Institute, pp. 59-71.
- Mansoor O, Beaufrère B, Boirie Y; Ralliere C, Taillandier D, Auroseau E, Schoeffler P, Arnal M, Attaix D. 1996.** Increased mRNA levels for components of the lysosomal Ca²⁺ activated, and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways in skeletal muscle from head trauma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2714-2718.
- Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA. 1999.** Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Tips* 20: 287-294.
- Mao J, Price DD, Lu J, Keniston L, Mayer DJ. 2000.** Two distinctive antinociceptive systems in rats with pathological pain. *Neurosci. Lett* 280: 13-16.
- Mao J, Price DD, Mayer DJ. 1995.** Mechanisms of hyperalgesia and opiate tolerance: a current view of their possible interations. *Pain* 62: 259-274.
- Mariscano G, Lutz B. 2006.** Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J. Endocrinol. Invest* 29: 27-46.
- Martín AA, Martínez-Orgado J. 2000.** Asfixia perinatal en el recién nacido a término. *Pediatría. integral* 5: 391-406.

- Martin BR, Sim-Selley LJ, Selley DE. 2004.** Signaling pathways involved in the development of cannabinoid tolerance. *Trends. Pharmacol. Sci* 25: 325-330.
- Martin BR. 1985.** Characterisation of the antinociceptive activity of intravenously administered delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. In DJ Harvey Ed. *Marihuana 84, Proceedings of the Oxford Symposium on Cannabis* (pp. 685-692). Oxford: IRL Press.
- Martin BR. 1986.** Cellular effects of cannabinoids. *Pharmacol. Rev* 38: 45-75.
- Martín DL, Deluca HF. 1969.** Calcium transport and the role of vitamine D. *Arch. Biochem. Biophys* 134-139.
- Martín M, Ledent C, parmentier M, Maldonado R, Valverde O. 2002.** Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emocional behaviour. *Psychopharmacology* 159: 379-387.
- Martin WJ, Hohmann AG, Walker JM. 1996.** Suppression of noxious stimulus-evoked activity in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus by a cannabinoid agonist: correlation between electrophysiological and antinociceptive effects. *J. Neurosci* 16: 6601-6611.
- Martínez JA, Fruhbeck G. 1996.** Regulation of energy balance and adiposity: a model with new approaches. *J. Physiol. Biochem* 52: 255-258.
- Martínez JA. 2000.** Body-weight regulation: causes of obesity. *Proc. Nutr. Soc* 59: 337-345.
- Martínez V, Taché Y. 2000.** Bombesin and the brain- gut axis. *Peptides* 21:1617-1625.
- Martínez-orgado J, Fernández-Frutos B, González R, Romero E. Urigüen L, Romero J, et al. 2003.** Neuroprotection by the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 in an in vivo newborn rat model of acute severe asphyxia. *Mol. Brain. Res* 114: 132-139.
- Martínez-Orgado J, Fernandez-Frutos B, Gonzalez R, y col. 2005.** Neuroprotective effect of L-arginine in a newborn rat model of acute severe asphyxia. *Biol. Neonat* 88: 291-298.
- Marx SJ. 2000.** Medical progress - Hyperparathyroid and hypoparathyroid disorders. *New. Engl. J. Med* 343 (25): 1863-1875.
- Mascolo N, Izzo AA, Ligresti A, Costagliola A, Pinto L, Cascio MG, Maffia P, Cecio A, Capasso F, Di Marzo V. 2002.** The endocannabinoid System and the molecular basis of paralytic ileus in mice. *FASEB. J* 16: 973-975.
- Massa F, Marsicano G, Hermann H, Cannich A, Krisztina M, Cravatt BF, Ferri GL, Sibaev A, Lutz B. 2004.** The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J. Clin. Invest* 113: 1202-1209.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, y col. 1997.** Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med* 3: 1029-1033.
- Mataix FJ, Llopis J. 2002.** Minerales. En *Nutrición y Alimentación Humana*. Mataix FJ. Ed, Madrid, pp. 215-223.
- Mataix FJ, Sánchez de Medina F. 2002.** Proteínas. En *Nutrición y Alimentación Humana*. Mataix FJ. Ed, Madrid, pp. 105.

- Mathison R, Ho W, Pittman QJM, Davison LS, Sharkey KA. 2004.** Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br. J. Pharmacol* 142: 1247-1254.
- Matseshe JW, Philips SF, Malagelada JR, McCall GT. 1980.** Recovery of dietary iron and zinc from the proximal intestine of healthy man: studies of different meals and supplements. *Am. J. Clin. Nutr* 33: 1946-1953.
- Matsuda L.A, Lolait S.J, Brownstein M.J, Young A.L, and Bonner T.I. 1990.** Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-564.
- Matsunaga T, Iwawaki Y, Watanabe K, Yamamoto I, Kageyama T, Yoshimura. 1995.** Metabolism of Δ^9 -tetrahydrocannabinol by cytochrome P-450 isozymes purified from hepatic microsomes of monkeys. *Life. Sci* 56: 2089-2095.
- Mayer J. 1953.** Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *N. Engl. J. Med* 249: 13-16.
- Maykut MO. 1985.** Health consequences of acute and chronic marijuana use. *Pr. Neuropsychophar. Biol. Psychiatry* 9: 209-238.
- Mazzari S, Canella R, Petrelli L, Barcolongo G, Leon A. 1996.** N-(2-hydroxyethyl) hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur. J. Pharmacol* 300: 227-236.
- Mc Cance RA, Walsham CM. 1984.** The digestibility and absorption of the calories, proteins, purines, fat and calcium in wholemeal wheaten bread. *Br. J. Nutr* 2: 26-41.
- Mc Vey DC, Schmid PC, Schmid HH, Vigna SR. 2004.** Endocannabinoids induce ileitis in rats via the capsaicin receptor (VR1). *J. Pharmacol. Exp. Ther* 304: 713-722.
- McLaughlin PJ, Winston KM, Limebeer CL, Parker LA, Makriyannis A, Salamone JD. 2005.** The cannabinoid CB1 antagonist AM 251 produces food avoidance and behaviours associated with nausea but does not impair feeding efficiency in rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 180: 286-293.
- McLaughlin PJ, Winston KM, Swezey L, Wisniecki A, Abeeman J, Tardif DJ, Betz AJ, Ishiwari K, Makriyannis A, Salamone JD. 2003.** The cannabinoid CB1 antagonists SR 141716A and AM 251 suppress food intake and food-reinforced behaviour in a variety of tasks in rats. *Behav. Pharmacol* 14: 583-588.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. 1995.** Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptor. *Biochem. Pharmacol* 50: 83-90.
- Mechoulam R, Devane WA, Breuer A, Zahalka J. 1991.** A random walk through a cannabis field. *Pharmacol. Biochem. Behav* 40: 461-464.
- Mechoulam R, Devane WA, Glaser R. 1992.** Cannabinoid geometry and biological activity. En: *Marihuana/Cannabinoid: Neurobiology and Neurophysiology*. Bartke A, Murphy LL. Eds. CRC Press, Boca Raton, FL, vol IV, pp.1-43.
- Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V. 1998.** Endocannabinoids. *Eur. J. Pharmacol* 359: 1-18.
- Mechoulam R, Lichtman AH. 2003.** Stout guards of the central nervous system. *Science* 302: 65.

- Mechoulam R, panikashvili D, Shohami E. 2002.** Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. *Trends. Mol. Med* 8: 58-61.
- Mechoulam R. 1970.** Marihuana chemistry. *Science* 168:1159-1166.
- Mechoulam R. 2005.** Plant cannabinoids: a neglected pharmacological treasure trove. *Br. J. Pharmacol* 146: 913-915.
- Meister B. 2000.** Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam. Horm* 59: 265-304.
- Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL. 1998.** An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature* 395: 381-383.
- Michl T, Jovic M, Heinemann A, et al. 2001.** Vagal afferent signaling of a gastric mucosal acid insult to medullary, pontine, thalamic, hypothalamic and limbic, but not cortical, nuclei of the rat brain. *Pain* 92: 19-27.
- Milagro FI, Martínez JA. 2000.** Effects of the oral administration of a beta3-adrenergic agonist on lipid metabolism in alloxan-diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol* 52: 851-856.
- Milne DB, Canfield WK, Mahalko JR. 1984.** Effect of oral folic acid supplements on zinc, copper, and iron absorption and excretion. *Am. J. Clin. Nutr* 39: 535-539.
- Missoula R. 2005.** Plant cannabinoids: a neglected pharmacological treasure trove. *Br. J. Pharmacol* 146: 913-915.
- Molina-Holgado F, Rubio-Araiz A, Garcia-Ovejero D, Williams RJ, Moore JD, Arévalo-Martín A, Gómez-Torres O, Molina-Holgado E. 2007.** CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Euro. J. Neuro* 25: 629-634.
- Monteleone P, Matias I, Martiadis V, y col. 2005.** Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa. *Neuropsychopharmacology* 30: 1216-1221.
- Moran TH, Katz LF, Plata-Salaman CR, y col. 1998.** Disordered food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A receptors. *Am. J. Physiol* 274: R618-625.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. 2006.** Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443: 1010-1038.
- Moya M. 1998.** Patología del metabolismo mineral. En: *Compendio de pediatría*. Cruz Hernández M, Crespo Hernández M, Brines Solares J, Jiménez González R. Eds. EXPAXS, Barcelona, pp.270.
- Munro S, Thomas K, Abu-shaar M. 1993.** Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61-65.
- Murer H. 2002.** Functional domains in the renal type IIa Na/Pi cotransporter. *Kidney. Int* 62: 375-382.
- Nakazato M, Murakami N, date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, y col. 2001.** A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409: 194-198.

- Nakazi M, Bauer U, Nickel T, Kathmann M, Schilcker E. 2000.** Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol* 361: 19-24.
- Need AG, Kemp A, Giles N, Morris HA, Horowitz M, Nordin BE. 2002.** Relationship between intestinal calcium absorption, serum vitamin D metabolites and smoking in postmenopausal women. *Osteop. Inter* 13: 83-88.
- Negrete JC. 1984.** Clinical psychiatric complications of cannabis use: an update. *Marihuana 84* Proceeding of the Oxford Symposium on Cannabis, Oxford, pp. 581-592.
- Nijijima A, Meguid MM. 1995.** An electrophysiological study on amino acid sensors in the hepato-portal system in the rat. *Obes. Res* (3 Supp) 5: 741S-745S.
- Nijenhuis WA, Oosterom J, Adan RA. 2001.** AgRP (83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol. Endocrinol* 15: 164-171.
- Núñez Domínguez LA, Gurpegui Fernández de Legaria M. 2002.** Cannabis-induced psychosis: a cross-sectional comparison with acute schizophrenia. *Act. Psych. Scand.* 105: 173-178.
- Núñez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, Gonzalez S, Tolon RM, Romero J. 2004.** Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 15: 208-213.
- Nyíri G, Cserép C, Szabadits E, MacKie K, Freund TF. 2005.** CB₁ cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience* 136: 811-822.
- Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, and Rossetti L. 2003.** Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat. Med* 9: 756-761.
- Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. 2001.** Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29: 729-738.
- Ohta A, Ohtsuki M, Baba S, Adachi T, Sakata T, Sakaguchi E. 1995.** Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. *J. Nutr* 125: 2417-2424.
- Oltmans G. 1983.** Norepinephrine and dopamine levels in hypothalamic nuclei of the genetically obese mouse (ob/ob). *Brain. Res* 273:369-373.
- Oppert JM. 1997.** Leptine et regulation du poids corporel. *Cah. Nutr. Diét* 32: 217-223.
- Oomura Y. 1990.** Fibroblast growth factor (FGF) and cytokines as feeding suppressants. 1990. *Int. J. Obes;* 14 Suppl 3: 105-12; discussion 112-123.
- Orosco M, Rouch C, Daugé V. 2002.** Behavioural responses to ingestion of different sources of fat: Involvement of serotonin? *Behav. Br. Res* 132:103-109.
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G. 2005.** Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest* 115: 1298-1305.
- Pallauf J, Pietsch M, Rimbach G. 1998.** Dietary phytate reduces magnesium bioavailability in growing rats. *Nutr. Res* 18 (6): 1029-1037.

- Palou A, Bonet ML, Picó C, Rodríguez AM. 2004.** Nutrigenómica y obesidad. *Rev. Med. Univ. Navarra* 48: 236-248.
- Palou A, Bonet ML, Pico C, Serra F. 2004a.** Nutrientes, genes y obesidad. En: *Nutrición y Metabolismo en Transtornos de la Conducta Alimentaria*. Miján A. Ed. Glosa, Barcelona, pp. 191-211.
- Palou A, Bonet ML, Serra F. 2002.** Study on Oesity and Fncional Foods in Europe. Luxembourg: European Comission, Directorate General for Research, pp. 411.
- Palou A, Pico C, Bonet M. 2004b.** Avances en obesidad. Avance en Nutrición SENBA 2003. Madrid, Edición Sanitaria, en prensa.
- Palou A, Pico C, Serra F. 2004c.** Food safety and functional foods in the European Union: Obesity as a paradigmatic example for novel food development. *Nutr. Rev* 62: S169-S181.
- Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, y col. 2001.** An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury . *Nature* 413: 527-531.
- Parekh AB, Putney JW. 2005.** Store-operated calcium channel. *Physiol. Rev* 85: 757-810.
- Parikh SJ, Yanovski JA. 2003.** Calcium intake and adiposity. *Am. J. Clin. Nutr* 77: 281-287.
- Parker LA, Mechoulam R. 2003.** Cannabinoid agonists and antagonists modulate lithium-induced conditioned rejection reactions in a rat model of nausea. *Psychopharmacology* 166: 156-162.
- Pellet PL, Young VR. 1992.** The effects of different levels of energy intake on protein metabolism and of different levels of protein intake on energy metabolism: a statistical evaluation from the published literature. En: *Protein and Energy Interactions*. Scrimshaw N, Schürch B. Eds. Waterville Valley, International Dietary Energy Consultancy Group, pp. 81121.
- Peng JB, Brown EM, Hediger MA. 2003.** Apical entry channels in calcium-transporting epithelia. *News. Physiol. Sci* 18: 158-163.
- Pérez-Reyes M, Timmons MC, Lipton M, Davis KH, Wall ME. 1972.** Intravenous injection in man of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Science* 177: 633-635.
- Pertwee R and Griffin G. 1995.** A preliminary investigation of the mechanisms underlying cannabinoid tolerance in the mouse vas deferens. *Eur. J. Pharmacol* 272: 67-72.
- Pertwee R, Stevenson LA, Griffin G. 1993.** Cross-tolerance between delta-9-tetrahydrocannabinol and the cannabimimetic agents, CP 55,940, WIN 55,212-2 and anandamide. *Br. J. Pharmacol* 110: 1483-1490.
- Pertwee R. 1974.** Tolerance to the effect of delta-9-tetrahydrocannabinol on corticosterone levels in mouse plasma produced by repeated administration of cannabis extract or delta-9-tetrahydrocannabinol. *Br. J. Pharmacol* 51: 391– 397.
- Pertwee RG .2000 .** Cannabinoid receptor ligands : clinical & neuropharmacological considerations relevant to future drug discovery and development. *Exp. Opin. Invest. Drug* 9: 1-19.
- Pertwee RG, Fernando SR, Nash JE, Coutts AA. 1996a.** Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptor in guinea-pig small intestine. *Br. J. Pharmacol* 118: 2199-2205.

- Pertwee RG, Fernando SR. 1996.** For the presence of cannabinoid CB1 receptor in urinary bladder. *Br. J. Pharmacol* 118: 2056-2058.
- Pertwee RG, Joedigwe G, Hawksworth GM. 1996b.** Further for the presence of cannabinoid CB1 receptor in mouse vas-deferens. *Eur. J. Pharmacol* 296: 169-172.
- Pertwee RG, Stevenson LA, Elrick dB, Mechoulam R, Corbett AD. 1992.** Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse vas deferens and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine. *Br. J. Pharmacol* 105: 980-984.
- Pertwee RG. 1997.** Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther* 74: 129-180.
- Pertwee RG. 2001.** Cannabinoid receptor and pain. *Prog. Neurobiol* 63: 569-611.
- Pertwee RG. 2002.** Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol. Ther* 95: 165-174.
- Pertwee RG. 2005.** Cannabidiol as a potential medicine. En: *Cannabinoids as Therapeutics*. Mechoula R. Ed. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 47-65.
- Peterlik N, Wasserman RH. 1978.** Effect of vitamin D on transepithelial phosphate transport in chicken intestine. *Am. J. Physiol* 244: E379-88.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, y col. 1998.** Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci* 18: 9996-10015.
- Pickel VM, Chan J, Kash TL, Rodriguez JJ, Mackie K. 2004.** Compartment-specific localization of cannabinoid CB1 and mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 127: 101-112.
- Pinto L, Izzo AA, Cascio MG, Bisogno T, Hospodar-Scott K, Brown DR, Macolo N, Di Marzo V, Capasso F. 2002.** Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. *Gastroenterology* 123: 227-234.
- Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodríguez de Fonseca F. 2000.** The endocannabinoid System as a target for therapeutic drugs. *Tren. Pharmacol. Sci* 21: 218-224.
- Planells E, Aranda P, Perán F, Ilopis J. 1993.** Changes in calcium and phosphorus absorption and retention during long-term magnesium deficiency in rats. *Nutrition. Res* 13: 691-699.
- Plum L, Schubert M, Bruning JC. 2005.** The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends. Endocrinol. Metab* 16: 59-65.
- Pocai A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, y col. 2005.** Hypothalamic K (ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 434: 1026-1031.
- Pope HG Jr, Gruber AJ, Turgelun-Todd D. 1995.** The residual neuropsychological effects of cannabis: the current status of research. *Drug. Alc. Dep* 38: 25-34.
- Porter AC, Felder CC. 2001.** The cannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther* 90: 45-60.
- Powell SR. 2000.** The antioxidant properties of zinc. *J. Nutr* 130: 1447S-1454S.

- Powley TL, Opsahl CH, Cox JE, Weingarten HP. 1980.** The role of hypothalamus in energy homeostasis. En: *Handbook of the hypothalamus*. Part A: Behavioral Studies of the Hypothalamus Morgane PJ, Panksepp J. Eds. *Marcel Dekker, Inc, New York*, pp. 211-298.
- Pritchard LE, Turnbull AV, White A. 2002.** Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: Impact on melanocortin signalling and obesity. *J. Endocrinol* 172: 411-421.
- Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, y col. 1996.** A role for melaninconcentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380: 243-247.
- Quamme GA, de Rouffignac C. 2000.** Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney. *Front. Biosci* 1: D694-D711.
- Quamme GA. 1993.** Magnesium homeostasis and renal magnesium handling. *Miner. Electrolyte. Metab* 19: 218-225.
- Ramos AYA, Fernández RJ. 2000.** Cannabinoides: propiedades químicas y aspectos metabólicos. *Addicciones* 12: 41-56.
- Rasmussen, H. 1986.** The calcium Messenger system. *N. Engl. J. Med* 314: 1094-1101 (partI) 314:1164-1170 (part II).
- Ravinet-Trilloi C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, Soubrie P. 2003.** Antiobesity effect of SR141716A, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 284: R345-R353.
- Ravinet-Trilloi C, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrie P. 2004.** CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord* 46: 640-648.
- Rayssiguier Y, Mazue A, Durlach J. 2001.** Advances in magnesium research, nutrition and health. *John Libbey and Company Limited, London, UK*.
- Reeds PJ, Burrin DC, Davis TA, et al. 2000.** Protein nutrition of the neonate. *Proc. Nutr. Soc* 59: 87-97.
- Reeds PJ, Davis TA, Fiorotto ML. 1991.** Nutrient partitioning: an overview. En: *The Science of Food Regulation*. Bray GA, Ryan DH. Eds. LSU Press, Baton Rouge, pp. 103-120.
- Reeds PJ, Hachey DL, Patterson BW, y col. 1992.** VLDL apolipoprotein B-102, a potential indicator of the isotopic labelling of the hepatic protein synthetic precursor pool in humans: studies with multiple stable isotopically labeled amino acids. *Nutrition* 122: 457-467.
- Reidelberger RD. 1992.** Abdominal vagal mediation of the satiety effects of exogenous and endogenous cholecystokinin in rats. *Am. J. Physiol* 263 (6): R1354-R1358.
- Rice AS. 2001.** Cannabinoid and pain. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2: 399-414.
- Richards MP, Cousins RJ. 1976.** Metallothionein and its relationship to the metabolism of dietary zinc in rats. *J. Nutr* 106: 1591-1599.
- Richardson JD, Kilo S, Hargreaves KM. 1998.** Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain* 75: 111-119.

- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Marauni J, Neliat G, Caput D, Ferrara P, Soubriere P, Breliere JC, Le fur G. 1994.** SR 141716, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *Fed. Eur. Bioch. Soc* 350: 240-244.
- Rizzoli RH, Fleisch H, Bonjour JP. 1977.** Role of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on intestinal phosphate absorption in rats with a normal vitamin D supply. *J. Clin. Invest* 60: 639-647.
- Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ. 2001.** Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J. Neurosci* 21: 109-116.
- Robbe D, Alonso G, Manzoni OJ. 2003.** Exogenous and endogenous cannabinoids control synaptic transmission in mice nucleus accumbens. *Ann. NY. Acad. Sci* 1003: 212-225.
- Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ. 2002.** Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8384-8388.
- Rodgers RJ, Evans PM, Murphy A. 2005.** Anxiogenic profile of AM 251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naïve and plus-maze-experienced mice. *Behav. Pharmacol* 16: 405-413.
- Rodgers RJ, Ishii Y, Halsford JC, Blundell JE. 2002.** Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides* 36: 303-325.
- Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Martín-Calderón JL, Gorriti MA & Navarro M. 1998.** Role of the endogenous cannabinoid System in the regulation of motor activity. *Neurobiol. Disease* 5: 403-501.
- Rodríguez de Fonseca F, Fernández-Ruiz JJ, Murphy L, Eldridge JC, Steger RW, Bartke A. 1991.** Effects of Delta9-tetrahydrocannabinol exposure on adrenal medullary function: Evidence of an acute effect and development of tolerance in chronic treatments. *Pharmacol. Biochem. Behav* 40: 593-598.
- Rodríguez de Fonseca F, Gorriti MA, fernández-Ruiz JJ, Palomo T, Ramos JA. 1994.** Downregulation of rat brain cannabinoid binding sites alter chronic delta-9-tetrahydrocannabinol treatment. *Pharmacol. Biochem. Behav* 47: 33-40.
- Rodríguez F, Cebeira M, Ramos JA, Martín M, Fernández-Ruiz JJ. 1994b.** Cannabinoid receptor in rat brain areas: sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes alter gonadectomy and sex steroid replacement. *Life. Sci* 54: 159-170.
- Rodríguez F, Gorriti MA, Fernández-Ruiz JJ, Palomo T, Ramos JA. 1994a.** Down-regulation of rat brain cannabinoid binding sites alter chronic D9-tetrahydrocannabinol treatment. *Pharmacol. Biochem. Behavior* 74: 33-40.
- Rodríguez U, Carrillo E, Soto E. 2005.** Cannabinoides: Neurobiología y usos médicos. *Elementos* 60: 3-9.
- Rodríguez VM, Macarulla MT, Echevarría E, Portillo MP. 2003.** Lipolysis induced by leptin in rat adipose tissue from different anatomical locations. *Eur. J. Nutr* 42: 149-153.
- Rogers PJ, Blundell JE. 1994.** Reanalysis of the effects of phenylalanine, alanine, and aspartame on food intake in human subjects. *Physiol. Behav* 56: 247-250.

- Rogers RD, Robbins TW. 2001.** Investigating the neurocognitive deficits associated with chronic drug misuse. *Curr. Opin. Neurobiol* 11: 250-257.
- Romero J, Berrendero F, Manzanares J, Pérez A, Corchero J, Fuentes A, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA. 1998.** Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol. *Synapse* 30: 298-308.
- Romero J, de Miguel R, Garcia-Palomero E, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA. 1995.** Time course of the effects of anandamide, the putative endogenous cannabinoid receptor ligand, on extrapyramidal function. *Brain. Res* 694: 223-232.
- Romero J, García L, Cebeira M, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA. 1995.** Changes in rat brain cannabinoid binding sites alter acute or chronic exposure to their endogenous agonist, anandamide or to D9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacol. Biochem. Behav* 51: 731-737.
- Romero J, Garcia-Palomero E, Castro JG, Garcia-Gil L, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ. 1997.** Effects of chronic exposure to D9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several rat brain regions. *Mol. Brain. Res* 46: 100-108.
- Ronesi J, Gerdeman GL, Lovinger DM. 2004.** Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport. *J. Neurosci* 24: 1673-1679.
- Rossi M, Choi SJ, O'Shea D, Miyoshi T, Ghatei MA, Bloom SR. 1997.** Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding but chronic administration has not affect on body weight. *Endocrinology* 138: 351-355.
- Rowe PSN, de Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ, Oudet CL. 2000.** MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics* 67: 54-68.
- Rowland NE, Mukherjee M, Robertson K. 2001.** Effects of the cannabinoid receptor antagonist SR141716A alone and in combination with dexfenfluramine or naloxone, on food intake in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 159: 111-116.
- Rubin H. 2005.** Magnesium: the missing element in molecular views of cell proliferation control. *Bioessays* 27: 311-320.
- Rubino T, Forlani G, Vigano D, Zippel R, Parolaro D. 2004.** Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic Δ^9 -tetrahydrocannabinol treatment. *Mol. Cell. Neurosci* 25: 355-362.
- Rubino T, Forlani G, Vigano D, Zippel, Parolaio D. 2005.** Ras/ERK signalling in cannabinoid tolerance: from behaviour to cellular aspects. *J. Neurochem* 93: 984-991.
- Rubino T, Masi P, Patrini G, Venier I, Giagnoni G, Parolaro D. 1994.** Chronic CP 55,940 alters cannabinoid receptors mRNA in the rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroreport* 5: 2493-2496.
- Rubino T, Vigano D, Massi P, y col. 2000.** Changes in the cannabinoid receptor binding, G protein coupling, and cyclic AMP cascade in the CNS of rats tolerant to and dependent on the synthetic cannabinoid compound CP55, 94. *J. Neuro* 75: 2080-2086.
- Rude RK. 1998.** Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *J. Bone. Miner. Res* 13: 749-758.

- Sacco O, Silvestri M, Sabatini F, Sale R, Defilippi AC, Rossi GA. 2004.** Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodelling in the airways. *Peadiatr. Respir. Rev* 5(Suppl A): S35-S40.
- Sainsbury A, Cooney GJ, Herzog H. 2002.** Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best. Prac. Res. Clin. Endocrinol. Metab* 16: 623-637.
- Saito H, Kusano K, Kinoshita M, y col. 2003.** Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na⁺-dependent phosphate co-transport activity and 1 α , 25 dihydroxyvitamin D₃ production. *J. Biol. Chem* 278: 2206-2211.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, y col. 1998.** Orexins and orexin receptors : a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behaviour. *Cell* 92: 573-585.
- Sakuri Y, Ohta H, Shimazoe T, Kataoka Y, Fujiwara M, Ueki S. 1985.** Δ^9 - Tetrahydrocannabinol elicited ipsilateral circling behaviour in rats with unilateral nigral lesion. *Life. Sci* 37: 2185-3292.
- Samanin R, Garattini S. 1996.** Pharmacology of ingestive behaviour. *Therapie* 51: 107-115.
- Sandström B, Almgren A, Kivisto B, et al. 1989.** Effect of protein level and protein-source on zinc-absorption in humans. *J. Nutr* 119: 48-53.
- Sandström B. 1995.** Considerations in estimates of requirements and critical intake of zinc - adaption, availability and interactions. *Analyst* 120: 913-915.
- Sandström B. 1997.** Bioavailability of zinc. *Eur. J. Clin. Nutr* 51: S17-S19.
- Sañudo-Peña MC, Tsou K, Walker JM. 1999.** Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life. Sci* 65: 703-713.
- Sanz ML. 2006.** *Proteínas en Nutrición Artificial. Nutrición Enteral.* Edikamed, Madrid.
- Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, y col. 2000.** Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspect. *Clin. Chim. Acta* 294: 1-26.
- Savinainen JR, Saario SM, Niemi R, Jarvinen T, Laitinen JT. 2003.** An optimized approach to study endocannabinoid signaling: evidence against constitutive activity of rat brain adenosine A1 and cannabinoid CB1 receptors. *Br. J. Pharmacol. Sci* 22: 565-572.
- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE. 1997.** Cannabinoid receptors CB1 and CB2 : a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol. Applic. Pharmacol* 142: 278-287.
- Schiavi SC, Kumar R. 2004.** The phosphatonin pathway: New insights in phosphate homeostasis. *Kidney. Int* 65: 1-14.
- Schiavi SC, Moe OW. 2002.** Phosphatonins: a new class of phosphate-regulating proteins. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 11: 423-430.
- Schick RR, Reilly WM, Roddy DR, Yaksh TL, Go VL. 1987.** Neuronal Cholecystokinin-like immunoreactivity is postprandially released from primate hypothalamus. *Brain. Res* 418: 20-26.

- Schick RR, Samsami S, Zimmermann JP, Eberl T, Endres C, Schusdziarra V, Classen M. 1993.** Effect of galanin on food intake in rats: involvement of lateral and ventromedial hypothalamic sites. *Am. J. Physiol* 264: R355-R361.
- Schilcker E, Kathmann M. 2001.** Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends. Pharmacol. Sci* 22: 565-572.
- Schilcker F, Timm J, Zentner J, Göthert M. 1997.** Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 356: 583-589.
- Schlicker E, Redmer A, Werner A, Kathmann M. 2003.** Lack of CB1 receptors increases noradrenaline release in vas deferens without affecting atrial noradrenaline release or cortical acetylcholine release. *Br. J. Pharmacol* 140: 323-328.
- Schneeman BO. 1982.** Pancreatic and digestive function. En: *Dietary Fiber in Health and Disease*. Vahouny GV, Kriklchevsky D. Eds. Plenum Press, New York, pp. 73-83.
- Schroeder JJ, Cousins RJ. 1990.** Interleukin-6 regulates metallothionein gene-expression and zinc-metabolism in hepatocyte monolayer-cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3137-3141.
- Schwartz MW, Baskin DG, Kaiyala KJ, Woods SC. 1999.** Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Am. J. Clin. Nutr* 69: 584-596.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P. 1997.** Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46: 2119-2123.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. 2000.** Central nervous system control of food intake. *Nature (Lond)* 404: 661-671.
- Schweigel M, Martens H. 2000.** Magnesium transport in the gastrointestinal tract. *Front. Biosci* 1: D666-D677.
- Seeley RJ, Woods SC. 2003.** Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. *Nat. Neurosci* 4: 901-909.
- Segowa H, Kaneko I, Takahashi A, y col. 2002.** Growth-related renal type II NaPi cotransporter. *J. Biol. Chem* 277: 19665-19672.
- Semple DM, McIntosh AM, Lawrie SM. 2005.** Cannabis as a risk factor psychosis: systematic review. *J. Psychopharmacology* 19: 187-194.
- Seoane LM, Tovar SA, Caminos JE, Nogueiras R, Diéguez C. 2004.** Ghrelin: un péptido regulador de la ingesta. *Rev. Esp. Pbes* 2: 31-42.
- Seufert J. 2004.** Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 1: 152-158.
- Seve M, Chiminenti F, devergnas S, Favier A. 2004.** In silico identification and expression of SLC30 family genes: an expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. *BMC. Genomics* 23: 32-40.

- Shahkhalili Y, Murest C, Meirim I, y col. 2001.** Calcium supplementation of chocolate: effect on cocoa butter digestibility and blood lipids in humans. *Am. J. Clin. Nutr* 73: 246-52.
- Shawn CB. 2004.** Cannabinoid receptor antagonists and obesity. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 5(4): 389-394.
- Shearman LP, Rosko KM, Fleischer R, wang J, Xu S, Tong XS, Rocha BA. 2003.** Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM 251 in mice. *Behav. Pharmacol* 14: 573-582.
- Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA. 1996.** Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J. Neurosci* 16: 4322-4334.
- Shills ME. 1988.** Magnesium in health and disease. *Ann. Rev. Nutr* 8: 429-436.
- Shils ME. 1984.** Magnesium. En: *Present Knowledge in Nutrition*. (5th ed). Olson RE. Ed. The Nutrition Foundation, Washington DC 422.
- Shimada M, Tritos N, Lowell B, Flier J, Maratos-Flier E. 1998.** Mice Lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature (Lond)* 39 :670-674.
- Shimada T, Muzutani S, Muto, y col. 2001.** Cloning and characterization of FGF-23 as a causative factor of tumor induced osteomalacia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6500-6505.
- Shrimpton R. 1994.** Zinc deficiency: is it widespread but under-recognized? *SCN. News* 9: 24-7.
- Simansky NJ. 1996.** Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav. Brain. Res* 73: 37-42.
- Simiand J, Keane M, Keane PE, Soubrie P. 1998.** SR 141716, a CB₁ cannabinoid receptor antagonist, selectively reduces sweet food intake in marmoset. *Behav. Pharmacol* 9: 179-181.
- Simoneau II, Hamza MS, Mata HP, Siegel EM, Vanderah TW, Porreca F, Makriyannis A, Malan TPJr. 2001.** The cannabinoid agonist WIN 55,212-2 Supresses opioid-induced tmesis in ferrets. *Anesthesiology* 94: 882-887.
- Simonin F, Karcher P, Boeuf JJ, Matifas A, Kieffer BL. 2004.** Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J. Neurochem* 89: 766-775.
- Sim-Selly LJ, Martin BR. 2002.** Effect of chronic administration of R-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)-methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4benzoxazinyl]-(1-naphthalaenyl)methanone mesylae (WIN 55,212-2) or Δ^9 -tetrahydrocannabinol on cannabionoid receptor adaptation in mice. *J. Pharamacol. Exp. Therap* 303: 36-44.
- Sindelar D. 1999.** Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. *Diabètes* 48: 1275-1280.
- Sipe JC, waalen J, Gerber A, Beutler E. 2005.** Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Int. J. Obesity* 29: 755-759.
- Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW. 1995.** Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* 44: 147-51.

- Slepchenko BM, Bronner F. 2001.** Modeling of transcellular Ca transport in rat duodenum points to coexistence of two mechanisms of apical entry. *Am. J. Physiol-cell Physiol.* 281: C270-C281.
- Small CJ, Bloom SR. 2005.** The therapeutic potential of gut hormone peptide YY3-36 in the treatment of obesity. *Exp. Opin. Investig. Drug* 14: 647-653.
- Smart D, Gunthorpe M, Jerman J, Nasir S, Gray J, Muir A, Chambers J, Randall A, Davis J. 2000.** The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol* 129: 227-230.
- Smit F, Bolier L, Cujipers P. 2004.** Cannabis use and the risk of later schizophrenia: a review. *Addiction* 99: 425-30.
- Smith KT, Cousins RJ. 1980.** Quantitative aspects of zinc absorption by isolated, vascularly perfused rat intestine. *J. Nutr* 110: 316-32.
- Smith PB, Compton DR, Welch SP, Razdan RK, Mechoulam R, Martin BR. 1994.** The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 270: 219-227.
- Solomon A, De Fanti BA, Martínez JA. 2004.** Control del apetito y peso corporal: la ghrelina y la señalización orexigénica. *Nutr. Clin. Diet. Hosp* 55: 13-27.
- Solomon A, Martínez JA. 2006.** Participación del sistema nervioso y del tracto gastrointestinal en la homeostasis energética. *Rev. Med. Univ. Navarra* 50: 27-37.
- Song Y, Peng X, Porta A, Takanaga H, Peng JB, Hediger MA, Fleet JC, Christakos S. 2003.** Calcium transporter 1 and epithelial calcium channel messenger ribonucleic acid are differentially regulated by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in the intestine and kidney of mice. *Endocrinology* 144: 3885-3894.
- Spina M, Merlo-Pich E, Chan RK, Basso Am, Rivier J, Vale W. 1996.** Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science* 273:1561-1564.
- Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. 1986.** Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7: 1189-1192.
- Stanley S, Wynne K, McGowan B, y col. 2005.** Hormonal regulation of food intake. *Physiol. Rev* 85: 1131-1158.
- Steele RD, Harper AE. 1991.** Proteínas y aminoácidos. En: *Conocimientos Actuales sobre Nutrición*, (6ª ed). Organización Panamericana de la Salud e Instituto Internacional de Ciencias de la Vida. Washington, DC, pp. 78-93.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. 1997.** A second endogenous that modulates long term potentiation. *Nature* 388: 773-778.
- Stella N. 2004.** Cannabinoid signalling in glial cells. *Glia* 48: 267-77.
- Stephen AM, Cummings JH. 1979.** Effects of dietary fibre on fecal bacterial mass. *Gut* 20: A457-A458.

- Stockhorst U, de Fries D, Steingrueber HJ, y col. 2004.** Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiol. Behav* 83: 47-54.
- Store M, Sibaev A, Marsicano G, Lutz B, Schusdziarra V, Timmermans JP, Allescher HD. 2004.** Cannabinoid receptor type 1 modulates excitatory and inhibitory neurotransmission in mouse colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol* 286: G110-G117.
- Stumbles PA. 1999.** Regulation of T helper cell differentiation by respiratory tract dendritic cells. *Immunol. Cell. Biol* 77: 428-433.
- Sugiera T, Kondo S, Kishimoto S, Miyashita T, Nakane S, Kodaka T, Suhara Y, Takayama H, Waku K. 2000.** Evidence that 2-arachidonylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HK-60 cells. *J. Biol. Chem* 275: 605-612.
- Taché Y. 1987.** Central nervous system regulation of gastric acid secretion. En: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Johnson LR. Ed. Raven Press, New York, pp. 911-930.
- Taheri S, Zeitzer JM, Mignot E. 2002.** The role of hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy. *Ann. Rev. Neurosci* 25: 283-313.
- Tappe-Theodor A, Agarwal N, Katona I, Rubino T, Martini L, Swiercz J, Mackie K, Monyer H, Parolaro D, Whistler J, Kuner T, Kuner R. 2007.** A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. *J. Neuro* 27: 4165-4177.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, y col. 1995.** Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.
- Tatemoto K, Mutt V. 1980.** Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature* 285: 417-418.
- Taylor CG, McCutcheon TL, Boermans HJ, DiSilvestro RA, Bray TM. 1997.** Comparison of Zn and vitamin E for protection against hyperoxia-induced lung damage. *Free. Radic. Biol. Med* 22: 543-550.
- Taylor KM, Morgan HE, Johnson A, Hadley LJ, Nicholson RI. 2003.** Structure-function analysis of LIV1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters. *Biochem. J* 375: 51-59.
- Tébar FJ, Garaulet M, Garcia MD. 2003.** Regulation del apetito. *Revista Espanola de obesidad* 1: 13-21.
- Tenenhouse HS, Martel J, Gauthier C, y col. 2001.** Renal expression of the sodium/phosphate transporter gene, Npt2, is not required for regulation of renal 1 α -hydroxylate by phosphate. *Endocrinology* 142: 112-1129.
- Tenenhouse HS, Murer H. 2003.** Disorders of renal tubular phosphate transport. *J. Am. Soc. Nephrol* 14: 240-247.
- Tenenhouse HS. 1997.** Cellular and molecular mechanisms of renal phosphate transport. *J. Bone. Miner. Res* 12: 159-164.

- Tessari P, Zanetti M, Barazzoni R, y col. 1996.** Mechanisms of postprandial protein accretion in human skeletal muscle : insight from leucine and phenylalanine forearm kinetics. *J. Clin. Invest* 98: 1361-72.
- Tessari P. 2000.** Regulation of splanchnic protein synthesis by enteral feeding. En: *Proteins, Peptides and Amino Acids in Enteral Nutrition*. Furst P, Young VR. Eds. Nestec Ltd, Vevy S, karger AC, Basel, pp. 47-61.
- Thomas A, Stevenson LA, Wease KN, Price MR, Baillie G, Ross RA, Pertwee RG. 2005.** Evidence that the plant cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabivarin is a cannabinoid CB₁ and CB₂ receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol* 146: 917-926.
- Thompson G, Fleischman R, Rosenkrantz H, Braude M. 1974.** Oral and intravenous toxicity of delta 9-tetrahydrocannabinol in rhesus monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 27: 648– 665.
- Thorens B, Larsen PJ. 2004.** Gut-derived signalling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 7: 471-478.
- Thornton-Jones Z, Vickers SP, Clifton PG. 2005.** The cannabinoid CB₁ receptor antagonist SR141716A reduces appetitive and consummatory responses for food. *Psychopharmacology* 179: 452-460.
- Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Herman ML. 2001.** Circulating Ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50: 707-709.
- Tso P, Liu M, Kalogeris TJ, Thomson AB. 2001.** The role of apolipoprotein A-IV in the regulation of food intake. *Annu. Rev. Nutr* 21: 231-54.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. 1998.** Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83: 393-411.
- Tsou K, Patrick SL, Walker JM. 1995.** Physical withdrawal in rats tolerant to delta-9-tetrahydrocannabinol precipitated by a cannabinoid receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol* 280: R13-R15.
- Tucci SA, Rogers EK, Korbonits M, Kirkham TC. 2004.** The cannabinoid CB₁ receptor antagonist SR141716A blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. *Br. J. Pharmacol* 143: 520-533.
- Turner CE, Elsohly MA, Boeren EG. 1980.** Constituents of cannabis sativa L, XVII. A review of the natural constituents. *J. Nat. Prod* 43: 169-234.
- Turton MD, O'Shea D, Gunn I, y col. 1996.** A role for glucagons-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379: 69-72.
- Twichell W, Brown S, Mackie K. 1997.** Cannabinoids inhibit N and P/Q type calcium channels in cultured rat hippocamal neurons. *J. Neurophysiol* 78: 43-50.
- Tyler K, Hillard CJ, Greenwood-Van Meerveld B. 2000.** Inhibition of small intestinal secretion by cannabinoids is CB₁ receptor-mediated in rats. *Eur. J. Pharmacol* 409: 207-211.
- Tzavara ET, Davis RJ, Perry KW, Li X, salhoff C, Bymaster FP, Witkin JM, Nomikos GG. 2003.** The CB₁ receptor antagonist SR 141716A selectively increases monoaminergic

neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. *Br. J. Pharmacol* 138: 544-553.

Tzavara ET, Valjent E, Firmo C, Mas M, Beslot F, Dever N, Roques BP, hanoune J, Maldonado R. 2000. Cannabinoid withdrawal is dependent upon PKA activation in the cerebellum. *Eur. J. Neurosci* 12: 1038-1046.

Ueda N, Puffenbarger RA, Yamamoto S, Deutsch DG. 2000. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chem. Phys. Lipids* 108: 107-121.

Urbano G, Aranda P, Vílchez A, Aranda C, Cabrera L, Porres JM, López-Jurado M. 2005. Effects of germination of the composition and nutritive value of proteins in *Pisum sativum*, L. *Food. Chem* 93: 671-679.

Van Campen D, House WA. 1974. Effect of a low protein diet on retention of an oral dose of ⁶⁵Zn and on tissue concentrations of zinc, iron, and copper in rats. *J. Nutr* 104: 84-90.

Van Cromphaut SJ, Dewerschim NM, Hoenderop JGJ, Stockmans I, Van Herck E, Kato S, Bindels RMJ, Collen D, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G. 2001. Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor knock out mice: functional and molecular aspects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98: 13324-13329.

Van den Heuvel E, Muys T, van Dokkum W, Schaafsma G. 1999. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am. J. Clin. Nutr* 69(3): 544-548.

Van der Stelt M, Veldhuis WB, van Haaften GW, et al. 2001b. Exogenous anandamide protects rat brain against acute neuronal injury in vivo. *J. Neurosci* 21: 8765-8771.

Van Gaal LF, Rissanen aM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S. 2005. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 365: 1389-1397.

Van Hoof HJ, de Sevaux RG, van Bealen H, Swinkels LM, Klipping C, Ross HA, Sweep CG. 2001. Relationship between free and total 1,25-dihydroxyvitamin D in conditions of modified binding. *Eur. J. Endocrinol* 144: 391-396.

Van Sickle MD, Oland LD, Mackie K, Davison JS, Sharkey KA. 2003. Delta-9-tetrahydrocannabinol selectively acts on CB1 receptors in specific regions of dorsal vagal complex to inhibit emesis in ferrets. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol* 285: G566-G576.

Vásquez C, Navarro-Polanco RA, Huerta M, Trujillo X, Andrade F, Trujillo-Hernández B, Hernández L. 2003. Effects of cannabinoids on endogenous K⁺ and Ca²⁺ currents in HEK293 cells. *Canada. J. Physiol. Pharmacol* 81: 436-442.

Vastag B. 2003. Experimental drugs take aim at obesity. *JAMA* 289: 1763-1764.

Vaughan CW, McGregor IS, Christie MJ. 1999. Cannabinoid receptor activation inhibits GABAergic neurotransmission in rostral ventromedial medulla neurons in vitro. *Br. J. Pharmacol* 127: 935-940.

Venance L, Maldonado R, Manzini O. 2004. Le système endocannabinoïde central. *Med. Science* 20: 45-53.

- Verdejo-garcía A, López-Torrecillas F, Jiménez CO, Pérez-garcía M. 2004.** Clinical implications and methodological challenges in the study of the neuropsychological correlatos of cannabis, stimulant, and opioid abuse. *Neuropsychol. Rev* 14: 1-41.
- Verty ANA, McGregor IS, Mallet PE. 2003.** A cannabinoid receptor antagonist in non-deprived rats equally suppresses consumption of high carbohydrate, high fat, and normal chow. *Neurosci. Lett* 354: 217-220.
- Verty ANA, Singh ME, McGregor IS, Mallet PE. 2004.** The cannabinoid receptor antagonist SR 141716A attenuates overfeeding induced by systemic or intracranial morphine. *Psychopharmacology* 168: 314-323.
- Verty NA, McGregor SI, Mallet EP. 2005.** Paraventricular hypothalamic CB1 cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology* 49: 1101-1109.
- Vickers SP, Webster LJ, Wyatt A, Dourish CT, Kennett GA. 2003.** Preferential effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716A, on food intake and body weight gain of obese (fa/fa) compared to lean Zucker rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 167: 103-111.
- Victory W, Levenson R, Vander AJ. 1981.** Effect of glucagons on zinc excretion in anesthetized dogs. *Am. J. Physiol* 240: F299-F305.
- Vigna SR. 2003.** Cannabinoids and the gut. *Gastroenterology* 125: 973-975.
- Vizi ES, Katona I, Freund TF. 2001.** Evidence for presynaptic cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenalina release in the guinea-pig. *Lung. Eur. J. Pharmacol* 431: 237-244.
- Volpi E, Mittendorfer B, Wolf SE, Wolfe RR. 1999.** Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction. *Am. J. Physiol* 277: E513-520.
- Volpi N. 1999.** Adsorption of glycosaminoglycans onto coral - a new possible implant biomaterials for regeneration therapy. *Biomaterials* 20: 1359-1363.
- Wachtel SR, Elsohly MA, Ross SA, Ambre J, de Wit H. 2002.** Comparison of the subjective effects of Delta (9)-tetrahydrocannabinol and marijuana in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 161: 331-339.
- Walder K, Filippis A, Clark S, Zimmer P, Collier GR. 1997.** Leptin inhibits insulin binding in isolated rat adipocytes. *J. Endocrinol* 155: R5-R7.
- Walter JM, Hohmann AG. 2005.** Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handb. Exp. Pharmacol* 168: 509-554.
- Walter L, Stella N. 2004.** Cannabinoids and neuroinflammation. *Br. J. Pharmacol* 141: 775-785.
- Wang G, Lee HM, Englander E, Greeley GH. 2002a.** Ghrelin- not just another stomach hormone. *Regul. Pept* 105: 75-81.
- Wang L, Barachina MD, Martinez V, y col. 2000.** Synergistic interaction between CCK and leptin to regulate food intake. *Regul. Pept* 92: 79-85.
- Wang X, Dow-Edwards D, Keller E, Hurd YL. 2003.** Preferential limbic expression of cannabinoid receptor mRNA in the human fetal brain. *Neurosciences*; 118: 681-94.

- Wasserman RH, Smith CS, Brindak ME, de Talamoni N, Fullmer CS, Penniston JT, Kumar R. 1992.** Vitamin D and mineral deficiencies increase the plasma membrane calcium pump of chicken intestine. *Gastroenterology* 102: 886-894.
- Wasserman RH, Taylor AN. 1969.** Some aspects on the intestinal absorption of calcium, with special references to vitamin D. En: *Mineral metabolism. An advances Treatise*. Comar CL, Bronner F. Eds. Academic Press, New York and London, Vol 3, pp. 321-403.
- Wasserman, RH. 1988.** Cellular calcium: Action of hormones. En: *Calcium in Human Biology*. Nordin, BEC .Ed. Springer-Verlag, Oxford, England, pp. 385-419.
- Waterlow JC. 1995.** Whole-body protein turnover in humans-past present and future. *Annu. Rev. Nutr* 15: 57-92.
- Weaver C, Heaney RP. 1999.** Calcium. En: *Modern Nutrition in Health and Disease* (9th ed). Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. Eds. Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins.
- Weaver C. 2001.** Calcium. En: *Present Knowledge in Nutrition* (8th ed). Bowman BA, Russell RM. Eds. Washington, DC: International Life Sciences Institute.
- Weber A, Ni JS, Ling KHJ, Acheampong, ATang-Liu DDS, Burk R, Cravatt BF, Woodward D. 2004.** Formation of prostamides from anandamide in FAAH knockout mice analyzed by HPLC with tandem mass spectrometry. *J. Lipid. Res* 45: 757-763.
- Welch SP, Thomas C, Patrick GS. 1995.** Modulation of cannabinoid-induced antinociception after intracerebroventricular versus intrathecal administration to mice: possible mechanisms for interaction with morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 272: 310: 321.
- Wenger T, Moldrich G. 2002.** The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *Prostagl. Leukot. Essent. Fat. Acids* 66: 301-307.
- Wester PO. 1987.** Magnesium. *Am. J. Clin. Nutr* 45: 1305-1312.
- Westlake TM, Howlett AC, Ali SF, Paule MG, Scallet AC, Slikker W. 1991.** Chronic exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol fails to irreversibly alter brain cannabinoid receptors. *Br. Research* 544: 145-149.
- Widman M, Agurell S, Ehnebo M, Jones G. 1974.** Binding of (+) and (-)-9 d1-tetrahydrocannabinols and (-)-7-hydroxy-d1-tetrahydrocannabinol to blood cells and plasma protein. *J. Pharm. Pharmacol* 26: 914-916.
- Wilding JP. 2002.** neuropeptides and appetite control. *Diabet. Med* 19: 619-627.
- Wiley JL, Burston JJ, Leggett DC, Alekseeva OO, Razdan RK, Mahadevan A, Martin BR. 2005.** CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br. J. pharmacol* 145: 293-300.
- Williams CM, Kirkham TC. 1999.** Anandamide induces overeating: Mediation by central cannabinoid CB₁ receptors. *Psychopharmacology* 143:315-317.
- Williams CM, Kirkham TC. 2002.** Observational analysis of feeding induced by Delta (9)-THC and anandamide. *Physiol. Behav* 76: 241-250.
- Williams G, Cai XJ, Elliott JC, y col. 2004.** Anabolic neuropeptides. *Physiol. Behav* 81: 211-22.

- Williams G, Harrold JA, Cutler DJ. 2000.** The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc. Nutr. Soc* 59: 385-96.
- Williams PL, Moffat AC. 1980.** Identification in human urine of 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-11-oic acid glucuronide: a tetrahydrocannabinol metabolite. *J. Pharma. Pharmacol* 32: 445-448.
- Wilson RI, Nicoll RA. 2001.** Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410: 588-592.
- Wilson RI, Nicoll RA. 2002.** Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296: 678-682.
- Wise RA. 1996.** Addictive drugs and brain stimulation reward. *Ann. Rev. Neurosci* 19: 313-340.
- Wislon RI, Nicoll RA. 2001.** Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410: 588-592.
- Witting A, Stella N. 2004.** Cannabinoid signalling in health and disease. *Curr. Opin. Neuropharmacol* 2: 115-124.
- Womack M, Rose WC. 1947.** The role of proline, hydroxyproline and glutamic acid in growth. *J. Biol. Chem* 171: 37-50.
- Woods SC, Decker E, Vasselli JR. 1974.** Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychol. Rev* 81: 26-43.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte DJr, Schwartz MW. 1998.** Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280: 1378-1383.
- Woods SC, Seeley RJ. 2000.** Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition* 16: 894-902.
- Woods SC. 2004.** Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol* 286: G7-13.
- Xu AW, Kaelin CB, Morton GJ, Ogimoto K, Stanhope K, Graham J, Baskin DG, Havel P, Schwartz MW, Barsh GS. 2005.** Effects of hypothalamic neurodegeneration on energy balance. *Plos. Biol* 3: 2168-2176.
- Xue B, Greenberg AG, Kraemer FB, Zemel MB. 2001.** Mechanism of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) inhibition of lipolysis in human adipocytes. *FASEB. J* 15: 2527-9.
- Yamamoto T, et al. 2001.** Hypophosphatemic rickets accompanying McCune-Albright syndrome: evidence that a humoral factor causes hypophosphatemia. *J. Bone. Miner. Metab* 5: 287-295.
- Yamamoto M, Otani M, Jia DM, y col. 2003.** Differential mechanism and site of action of CCK on the pancreatic secretion and growth in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol* 285: G681-687.
- Yamashita T, Konishi M, Miyake A, Inui K, Itoh N. 2002.** Fibroblast growth factor (FGF-23) inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem* 277: 28265-28270.

- Yokosuka M, Xu B, Pu S, Kalra PS, Kalra SP. 1998.** Neuronal substrates for leptin and neuropeptide Y (NPY) interaction: Hypothalamic sites associated with inhibition of NPY-induced food intake. *Physiol. Behav* 64:331-338.
- Yonekura L, Suzuki H. 2003.** Some polysaccharides improve zinc bioavailability in rats fed phytic acid-containing diet. *Nutr. Res* 23: 343-355.
- Yonekura L, Tamura H, Suzuki H. 2004.** Chitosan and resistant starch restore zinc bioavailability, suppressed by dietary phytate, through different mechanisms in marginally zinc-deficient rats. *Nutr. Res* 24: 121-132.
- Younes H, Coudray C, Bellenger J, Demigné C, Rayssiguier Y, Rémésy C. 2001.** Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br. J. Nutr* 86: 479-85.
- Zaidi M, Inzerillo AM, Moonga BS, y col. 2002.** Forty years of calcitonin. Where are we now? A tribute to the work of Iain Mcintyre. *Bone* 30: 655-663.
- Zalewski PD, Truong-Tran AG, Grosser D, Jayaram L, Murgia C, Ruffin RE. 2005.** Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation: basic mechanisms and clinical targets. *Pharmacol. Therap* 105: 127-149.
- Zemel MB. 1998.** Nutritional and endocrine modulation of intracellular calcium: implication in obesity, insulin resistance and hypertension. *Mol. Cell. Biochem* 188: 129-36.
- Zemel MB. 2001.** Effects of calcium-fortified breakfast cereal on adiposity in a transgenic mouse model of obesity. *FASEB. J* 15: 480-487.
- Zemel MB. 2002.** Regulation of adiposity and obesity risk by dietary calcium: mechanisms and implication. *J. Am. Coll. Nutr* 21: 146S-151S.
- Zemel MB. 2004.** Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. *Am. J. Clin. Nutr* 79: 907S-912S.
- Zerwekh JE. 1979.** Vitamin D-dependent intestinal calcium absorption. *Gastroenterology* 76: 404-411.
- Zhou D and Sherman LP. 2004.** Voluntary exercise augments acute effects of CB₁-receptor inverse agonist on body weight loss in obese and lean mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77: 117-125.
- Zimmer A, Zimmer AM, Hihmann AG, Herkenham M, Bonner TI. 1999.** Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB₁ receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5786-5790.
- Zuardi AW, Shirakawa I, Finkellfarb E, Karniol IG. 1982.** Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta⁹-THC in normal subjects. *Psychopharmacology* 76: 245-250.