



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
P R E S E N T A (N)

Dictaminadores:



Facultad de Estudios Superiores
IZTACALA

Los Reyes Iztacala, Edo de México,



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Quiero agradecer el apoyo de la DGAPA, que mediante el Programa UNAM-PAPIIT IN232120 financió la beca y los materiales para la realización de esta investigación.

Agradezco a la institución que me albergó, y me brindó la oportunidad de formarme profesionalmente.

También agradezco el apoyo, paciencia, compañía, y consejo de familiares, amigos, colegas y profesores, que me acompañaron en este proceso, y motivaron a culminar este proyecto.

En especial al Dr. Erick, director de esta tesis, quien me invitó a participar en el laboratorio, me integró en el equipo y me confió diferentes experimentos para enriquecer mi formación profesional. Gracias por el apoyo, la paciencia y la confianza.

Otra persona fundamental en la realización de esta tesis fue Felipe, quien en muchas ocasiones se detuvo a ayudarme, ensañarme, corregirme o simplemente a acompañarme en las actividades del laboratorio. Muchas gracias por tu paciencia, ayuda y confianza.

Al Dr. Juan Manuel, sin su dirección en el grupo de investigación, probablemente este y otros proyectos no serían posibles.

Por último y no menos importantes, mis compañeros de laboratorio, porque compartimos muchas horas, con lo que eso implica, apoyarnos en los proyectos profesionales, pero también acompañarnos en los temas personales.

“La ciencia, muchacho, está hecha de errores, pero de errores útiles de cometer, pues poco a poco conducen a la verdad”

Julio Verne

Resumen

En modelos animales con roedores, que se les ha inducido obesidad experimentalmente o que reportan comportamientos similares a los atracones, se han observado alteraciones del tono endocannabinoide en áreas cerebrales particulares. Tal es el caso de la corteza cingulada anterior (CCA), que contribuye en la evaluación del valor reforzante de los estímulos y con ello participa en la regulación de la alimentación hedónica, esta región expresa receptores a cannabinoides CB2 (rCB2). Dado lo anterior, hipotetizamos que la señalización cannabinoide mediada por rCB2 modula algunos de los procesos conductuales y motivacionales de la alimentación no homeostática. Así, el objetivo de esta tesis fue evaluar la contribución de los rCB2 de la CCA en ratas sobre la regulación del consumo de alimento palatable, mediante una tarea operante en la que se evaluaron cambios en la motivación (puntos de ruptura, 1 y 8 horas postinyección) por el alimento palatable (solución de sacarosa al 10%) de los sujetos tratados con un agonista selectivo de los rCB2 (GW838972A, 0.25µg/µl). Nuestro principal hallazgo muestra que los cannabinoides en la CCA contribuyen con la regulación de la alimentación no homeostática vía rCB2, ya que la activación intra-CCA de estos receptores disminuye la motivación por el alimento palatable 8 horas después de la administración del fármaco.

Palabras clave: receptores CB2, corteza cingulada anterior, regulación de la alimentación hedónica, motivación.

Abstract

In rodent animal models, researchers who experimentally induced obesity or binge-like behavior have reported alterations of endocannabinoid tone in particular brain areas. Some of these areas include regions that contribute to hedonic eating regulation, for instance, the anterior cingulate cortex (ACC), which participate to the evaluation of the reinforcing value of stimuli. This region express CB2 cannabinoid receptors (rCB2). We hypothesized that rCB2-mediated cannabinoid signaling modulates some of the behavioral and motivational processes of non-homeostatic feeding. Consequently, the present thesis aimed to evaluate the contribution of rCB2s in the ACC of rats on the palatable food consumption regulation. We employed an operant task in which we assessed changes in motivation (breakpoints, 1 and 8 hours post-injection) for palatable food (10% sucrose solution) of subjects treated with a selective rCB2 agonist (GW838972A, 0.25 μ g/ μ l). Our main finding indicates that cannabinoids in the ACC contribute to the regulation of non-homeostatic feeding via rCB2 since intra-ACC activation of these receptors reduces motivation for palatable food 8 hours after drug administration.

Key words: CB2 receptors, anterior cingulate cortex, regulation of hedonic eating, motivation.

Índice

1.	Introducción	1
1.1	Conducta alimentaria y motivación por el alimento palatable	1
1.1.1	Conducta alimentaria y su regulación	1
1.1.2	Evaluación de la motivación con tecnología conductual.....	4
1.1.3	Circuito de la recompensa y la alimentación	7
1.2	Sistema cannabinoide.....	12
1.2.1	Ligandos cannabinoideos	13
1.2.1.1	Endocannabinoideos	13
1.2.1.2	Fitocannabinoideos	16
1.2.1.3	Cannabinoideos sintéticos.....	19
1.2.2	Metabolismo de los endocannabinoideos	20
1.2.2.1	Síntesis y transporte.....	20
1.2.2.2	Degradación	23
1.2.3	Receptores a cannabinoideos y sus mecanismos de transducción.....	25
1.3	Cannabinoideos y conducta alimentaria.....	32
1.3.1	Participación cannabinoide en la regulación alimenticia homeostática.....	33
1.3.2	Participación cannabinoide en la regulación de las propiedades reforzantes del alimento	40
1.4	Corteza cingulada anterior	44
1.4.1	Participación de la corteza cingulada anterior en la regulación emocional	44

1.4.2	Participación de la corteza cingulada anterior en la conducta alimenticia	47
1.4.3	Receptores CB2 en la corteza cingulada anterior	49
2.	Planteamiento del problema	51
2.1	Objetivo general.....	53
2.2	Objetivos específicos	53
2.3	Hipótesis.....	53
3.	Método.....	54
3.1	Sujetos.....	54
3.2	Dietas	54
3.3	Aparatos	55
3.4	Entrenamiento conductual	55
3.5	Cirugía esterotáxica	57
3.6	Fármacos.....	58
3.7	Histología.....	58
3.8	Análisis estadístico	59
4.	Procedimiento.....	61
4.1	Protocolo experimental	61
5.	Resultados.....	69
5.1	Establecimiento del paradigma operante para evaluar la motivación por el alimento palatable en ratas por medio de programas de reforzamiento de razón fija y progresiva.....	69
5.2	Evaluación de la motivación por el alimento palatable en ratas que recibieron la administración intra-CCA del agonista selectivo de los rCB2, GW405833.....	73

5.3	Evaluación del consumo libre de agua con la activación farmacológica de los CB2 en la CCA en ratas.....	75
6.	Discusión y conclusiones.....	78
6.1	Discusión.....	78
6.1.1	Consideraciones sobre los procedimientos operantes para evaluar la motivación.....	80
6.1.2	Limitaciones.....	82
6.2	Conclusiones.....	82
6.3	Perspectiva y sugerencias.....	82
7.	Referencias.....	84

1. Introducción

1.1 Conducta alimentaria y motivación por el alimento palatable

1.1.1 *Conducta alimentaria y su regulación*

La alimentación es una actividad elemental para la vida del ser humano. Se lleva a cabo mediante la búsqueda, selección, preparación e ingestión de los alimentos. A este conjunto de actividades se le conoce como conducta alimentaria (Cárdenas et al., 2014).

La conducta alimentaria es particular para cada individuo y se ve influenciada por diferentes factores, biológicos, psicológicos, sociales y ambientales. Entre los factores biológicos se encuentra la homeostasis, que mantiene el equilibrio energético general a través de diferentes mecanismos como la regulación de la ingesta o del gasto energético, involucrando, señales de hambre/saciedad, tasa metabólica, termogénesis, entre otros. Un sitio clave en esta regulación es el hipotálamo, que censa la información periférica (niveles de glucosa, ácidos grasos, u hormonas como grelina, leptina, insulina, péptido YY, entre otros) y central (liberación de proopiomelanocortina (POMC), proteína relacionada a Aguti (PRAg), neuropéptido Y (NPY), entre otros) con base en el nivel energético genera una respuesta conductual y endócrina adecuadas (Liu y Kanoski, 2018; Simpson y Bloom, 2010).

La motivación es otro factor que influye sobre la conducta alimentaria y se define como el impulso o causa que lleva al organismo a realizar una acción o serie de acciones orientadas a un objetivo, en este caso la alimentación. Se involucra en conductas anticipatorias, como la búsqueda, selección y preparación del alimento, así como en las consumatorias, que es la ingestión del alimento o bebida. Su correlato neuroanatómico se ubica en el sistema límbico, que regula el estado emocional y su consecuente respuesta conductual a partir de evaluar señales periféricas y centrales censadas por estructuras como el área tegmental ventral (ATV), el núcleo accumbens (NAc) y la corteza prefrontal (CPF) (Beltrán, 2017; Delgado, 1998; Mesurado, 2018).

Otro factor biológico es el hedónico, que hace referencia a la sensación placentera en respuesta al alimento, que en términos conductuales representa una recompensa a la ingestión del mismo, sin embargo, no todos los alimentos generan el mismo nivel de placer. Estos cambios en la recompensa asociada al sabor pueden deberse a las propiedades del alimento, las preferencias del sujeto, su nivel de saciedad, entre otros. Las estructuras involucradas en la valoración de las propiedades reforzantes del estímulo, son las del circuito corticolímbico, CPF, amígdala, ATV, NAc, estriado ventral e hipocampo, los cuales median componentes del *agrado* y el *deseo* (Cota et al., 2006; Simpson y Bloom, 2010).

Entre los factores exclusivamente psicológicos se encuentran las características individuales que describen las diferencias entre una persona y otra, en su forma de pensar, sentir y actuar; resultado de la interacción entre la biología del individuo y su entorno, por lo que pueden modificarse a través del tiempo. Esta categoría agrupa conceptos como: personalidad, creencias, preferencias, actitudes, estilos de afrontamiento, autopercepción, aprendizaje social, entre otros (Abbott, et al., 2018; López, 2018).

Estos factores influyen en la conducta alimentaria e inclusive se les relaciona con el origen y evolución de conductas anómalas relacionadas. Vázquez- Arévalo, et al. (2014), reportaron que quienes presentaban algún trastorno de la conducta alimentaria (TCA), obtenían puntuaciones significativamente mayores en factores como la motivación para adelgazar, la insatisfacción corporal, la identificación de la interocepción y la desconfianza personal. Referente a la personalidad, Keller y Siegrist (2015) mencionan que esta tiene efectos directos e indirectos en los estilos de alimentación y en la elección de alimentos, por lo que influye en la adherencia a una dieta equilibrada o desequilibrada. También se ha reportado una influencia de las emociones, Macht (2008) menciona que las características emocionales (valencia, intensidad) y las características individuales pueden mediar cambios en la alimentación, los cuales podrían agruparse en las siguientes categorías: control emocional en la elección de

alimentos, la supresión emocional de la ingesta alimenticia, el deterioro de los controles cognitivos de la alimentación, la alimentación como regulador de las emociones, y la modulación de la alimentación congruente con las emociones. Centrándose en otros factores, Fleta y Sarría (2012) hacen una recopilación de diversas investigaciones que muestran lo relevante que son la percepción y las expectativas sobre la conducta alimentaria, demostrando que existe una relación entre el color, sabor, textura, presencia de defectos o daños en los alimentos, y la aceptación o rechazo de los mismos.

Otro gran grupo de factores que influyen directamente en la conducta alimentaria, son los factores sociales y ambientales. Las comidas suelen ser acontecimientos sociales e inclusive parte central de eventos importantes o celebraciones, de acuerdo a las costumbres locales. Los hábitos alimenticios tienen una herencia cultural transmitida y modificada por cada generación. La familia juega un rol principal, ya que suele ser el primer grupo social con el que la persona tiene contacto, y por lo tanto en donde aprende por instrucción directa y/o por observación, el ritual de selección, preparación, e ingestión de los alimentos. Dentro del círculo social, un factor de influencia puede ser la religión, que en algunos casos incluyen leyes dietéticas en sus dogmas. Otro factor decisivo para la elección y adquisición de la dieta e incluso más relevante que la disponibilidad y la preferencia de alimentos es el económico, que a su vez se relaciona con el manejo y almacenamiento de los alimentos, así como con el valor social que se le asignó. Los factores ajenos a la comunidad son los ambientales, que incluyen la geografía y el clima, que favorecen la producción de ciertos alimentos y con ello su disponibilidad y costo (Fleta y Sarría, 2012).

En lo descrito anteriormente, se planteó un panorama general para considerar lo complejo que es la conducta alimentaria por la amplia gama de conductas que se pueden adoptar, pero también por la gran cantidad de factores que influyen y se entrelazan en la gestión de conductas relacionadas con la alimentación, mismos que se complejizan al ser

dinámicos y circunstanciales. El estudio de un factor en específico podría revelar nueva información, favoreciendo una mayor comprensión del fenómeno en general y de su complejidad.

1.1.2 Evaluación de la motivación con tecnología conductual

La motivación comprende los factores que impulsan a un organismo a realizar una acción o serie de acciones orientadas a un objetivo (Beltrán, 2017), es una respuesta compleja a estímulos externos e internos con componentes no visibles que sólo son experimentados por el sujeto. Estas características dificultan su estudio directo, por lo que una alternativa para su investigación es centrarse en los efectos conductuales producidos por la manipulación de variables que suponen una influencia en la motivación. En consecuencia, dentro de la perspectiva conductual, se define a la motivación como, el conjunto de condiciones que permiten que el reforzador sea efectivo (Reynolds, 1968), por ejemplo, la privación es parte de las condiciones motivacionales que permiten que el alimento funja como reforzador y por lo tanto su valor reforzante puede cambiar cuando el sujeto se encuentre saciado.

Dentro de la investigación conductual se han desarrollado paradigmas en modelos animales que favorecen un mayor control de las variables, lo que a su vez permite el diseño y/o modificación de modelos controlados dependiendo el objetivo de estudio o el concepto a evaluar cómo, el valor reforzante del estímulo, los aspectos cognitivos, el procesamiento de estímulo-contexto, entre otros componentes relacionados a la motivación. El empleo de estos modelos ha favorecido la comprensión de los procesos neurobiológicos que subyacen a la motivación, evaluar el efecto de lesiones en áreas cerebrales puntuales, o la administración de fármacos a nivel sistémico o central para modificar la actividad de un neurotransmisor específico, ha permitido conocer parte de la implicación de un determinado sistema de neurotransmisión en un núcleo o circuito cerebral, así como su influencia en los componentes relacionados con la motivación. Esta información es relevante en la investigación de la

capacidad adictiva de una sustancia y las posibles estrategias terapéuticas para evitar y/o tratar su dependencia. Estos modelos presentan la desventaja de no poder extrapolar directamente sus resultados a humanos, aunque su aporte sigue siendo valioso por la similitud desde el punto de vista comportamental, farmacológico y neurobiológico (Bradshaw y Killeen, 2012; García, et al., 2017).

Uno de los modelos más populares en la investigación conductual es el de autoadministración, ya que permite evaluar el valor reforzante del estímulo bajo la manipulación de las variables relevantes y con ello las características que modelan patrones en el abuso de sustancias, permitiendo conocer mejor la neurobiología del reforzamiento. Se ha implementado con una diversidad de metodologías, como la de acceso libre a la sustancia, que brinda información sobre el potencial reforzante del estímulo bajo ciertas modificaciones farmacológicas, contextuales o con lesiones puntuales en el sujeto, así como la preferencia por un reforzador. Otro tipo de metodología condiciona la entrega de un reforzador a la realización de actividades específicas, para lograrlo hay diversos diseños de programas operantes de tipo, concurrente, segundo orden, ensayos discretos, razón fija, razón progresiva, entre otros (García et al., 2017; Richardson y Roberts, 1996).

Los programas de razón suponen el entrenamiento del sujeto para realizar un trabajo operante, especifican el número de respuestas que debe emitir para obtener el reforzador, cuando se solicita siempre el mismo número de respuestas se le conoce como razón fija (RF) (Bradshaw y Killeen, 2012; Reynolds, 1968), este tipo de programas pueden evaluar cualitativamente si la sustancia puede actuar como reforzador, pero no puede evaluar la eficacia del refuerzo (Richardson y Roberts, 1996).

Para investigar el efecto reforzante del estímulo, el programa más utilizado es el de razón progresiva (RP), que condiciona la entrega del reforzador a un requerimiento de

respuesta operante que se incrementa sistemáticamente, por lo que cada vez se solicita un mayor esfuerzo para obtener la recompensa, hasta llegar al punto en el que el sujeto ya no responde. El último valor alcanzado de la serie, que es el valor máximo de respuestas que el sujeto estuvo dispuesto a realizar por la recompensa, se le conoce como punto de ruptura y se le considera una medida válida para evaluar la motivación (Bradshaw y Killeen, 2012; García et al., 2017; Richardson y Roberts, 1996).

La elección del modelo dependerá del objeto de estudio y el establecimiento de las características particulares, este debe contemplar el tipo de reforzador, la dosis, los patrones de consumo, la duración de la sesión, las condiciones propias del sujeto como su especie, sexo, período de desarrollo en el que se encuentra, así como las propiedades y factores relacionados a la variable dependiente y al ambiente (García et al., 2017). Es por lo anterior que ningún programa por si solo es sensible a las diferencias cualitativas entre las características de dos experimentos, e incluso el objetivo de un protocolo puede requerir de dos metodologías diferentes (Richardson y Roberts, 1996).

Algunas consideraciones metodológicas para evitar resultados erróneos al trabajar con programas de RP incluyen contemplar las fases del aprendizaje operante, que comienza con la adquisición de la respuesta, en donde se asocia la conducta con el reforzador. En esta etapa, la tasa de respuesta suele ser muy variable, y cuando esta se estabiliza se considera el inicio de la etapa del mantenimiento de la conducta (García et al. 2017). Es común que el entrenamiento de asociación se dé bajo programas de RF, ya que facilitan el aprendizaje y promueven una rápida adhesión a los programas de RP. Otra consideración a contemplar con estos últimos es que brindan un solo dato por variable (el punto de ruptura), así que, elegir una correcta ventana de tiempo sin respuesta o sin reforzamiento como criterio para finalizar la sesión es crucial, ya que si es demasiada corta podría reportarse un punto de ruptura falso, especialmente cuando la tasa de autoadministración es lenta o con un tiempo entre respuestas

amplio, asimismo la elección de la serie de requerimientos de respuesta dependerá del patrón comportamental en las condiciones del experimento, ya que si aumenta rápidamente (exponencialmente), se corre el riesgo de que los valores superiores de la serie al tener un rango amplio entre uno y otro, puedan perder sensibilidad en la evaluación del refuerzo, o si el aumento es demasiado lento, es decir con rangos cortos, el sujeto puede saciarse y comprometer los resultados. También podría reportarse un dato erróneo si al realizar una manipulación farmacológica como variable dependiente, no se empareja la evaluación conductual con el momento de máximo efecto del fármaco, de ser así podría reportarse un efecto no dependiente del mismo. Con relación al análisis estadístico de los resultados, por la naturaleza de las series progresivas en donde las razones finales tienen una mayor varianza que los valores iniciales, también reportaran una mayor desviación estándar, lo que viola los supuestos de homogeneidad de las varianzas que requiere el análisis de varianza (ANOVA), por lo que una solución es utilizar un análisis no paramétrico o realizar el análisis con el número de reforzadores otorgados, sustituyendo el valor del punto de ruptura (Bradshaw y Killeen, 2012; Richardson y Roberts, 1996).

1.1.3 *Circuito de la recompensa y la alimentación*

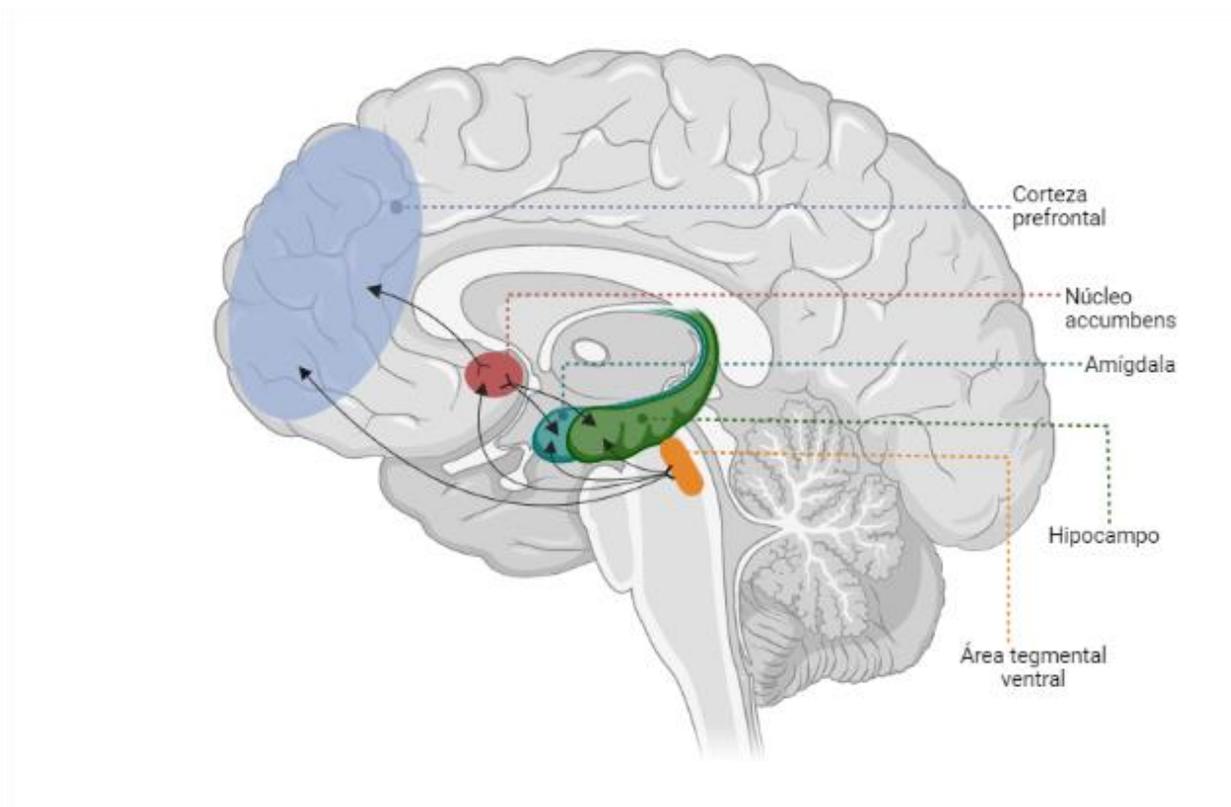
La recompensa es definida como el efecto gratificante de una acción realizada por el sujeto y el sistema responsable de evaluarla es el circuito de la recompensa. Dicho sistema hace un balance de costo-beneficio a partir de integrar la sensación de estímulos externos, de forma que cuando la consecuencia es agradable buscará la forma de obtenerla nuevamente. Al evaluar constantemente la relación estímulo-respuesta promueve la variabilidad de la conducta para hacerla más eficiente, prediciendo la proximidad de la recompensa y favoreciendo los comportamientos que maximizan las posibilidades de obtenerla, una vez establecidas las condiciones necesarias para obtener la recompensa se crean patrones comportamentales, repitiendo las conductas antes reforzadas (Cárdenas et al. 2014; Michel-Chávez, et al., 2015).

Los estímulos que favorecen la repetición de la conducta que la antecedió son conocidos como reforzadores, su poder reforzante proviene de la sensación gratificante que se percibe, que es consecuencia de la activación del circuito de la recompensa. Ejemplos de reforzadores naturales son la alimentación y la conducta sexual, que promueven un beneficio más allá del placer experimentado, que es la supervivencia del individuo y de la especie, sobre todo en ambientes adversos. También existen reforzadores artificiales que son capaces de activar al sistema sin ofrecer una ventaja evolutiva o adaptativa, ejemplo de estos son las drogas (Cárdenas et al., 2014; Cota, et al. 2006; Razón, et al., 2017). Los reforzadores naturales solo funcionan como tal ante un estado instintivo determinado (ej. privación o hambre), mientras que el valor reforzante de los artificiales opera con independencia del estado instintivo (Kupfermann, et al. 2001). Esta posibilidad de siempre activar al sistema puede resultar en un desajuste del mismo, que lleva a la dependencia del reforzador y se relaciona con el deterioro de la capacidad de autocontrol (Razón, et al. 2017).

El circuito de la recompensa involucra estructuras mesocorticolímbicas y los núcleos hipotalámicos (Ver Figura 1). La vía mesolímbica comunica al ATV con estructuras del sistema límbico como el NAc, amígdala e hipocampo; la vía mesocortical comunica al ATV con la CPF (Becoña y Cortés, 2011; Cota et al. 2006; Simpson y Bloom, 2010).

Figura 1

Estructuras mesocorticolímbicas y sus conexiones.



La comunicación clave en este sistema se da entre el ATV y el NAc a través del haz prosencefálico medial de naturaleza dopaminérgica. A su vez, el NAc (especialmente en su región externa) se comunica mediante proyecciones glutamatérgica con la amígdala, el hipocampo y la CPF, permitiendo la comunicación entre el área límbica y las zonas motoras (Becoña y Cortés, 2011; Cárdenas et al., 2014; Cota et al., 2006; Kupfermann et al., 2001; Mesurado, 2018). Diversos autores coinciden en que las estructuras mesolímbicas procesan e integran la información relacionada a la recompensa y la envían a la CPF, donde se procesa para dar lugar al aprendizaje dirigido a metas, mediando la toma de decisiones, que se retroalimenta de la evaluación de estímulos y de la efectividad de la respuesta en alcanzar la

meta, promoviendo la creación de patrones comportamentales (Cárdenas et al., 2014; Cota et al., 2006; Kupfermann et al., 2001; Simpson y Bloom, 2010).

La dopamina (DA) es la principal reguladora en la comunicación de este sistema, el reconocimiento de un reforzador supone la activación de las neuronas dopaminérgicas en el ATV, aumentando la producción de DA en toda la vía mesocorticolímbica, promoviendo así la mediación de la disposición a realizar el esfuerzo requerido para obtener dicho reforzador. También favorece los procesos que otorgan propiedades reforzantes a estímulos neutros, ya que esto facilita en un futuro la obtención de la recompensa, por la localización de estímulos que la acompañan (Kupfermann et al., 2001). Se ha reportado también que ciertas neuronas dopaminérgicas se activan cuando no se recibe la recompensa esperada, señalando un error en la predicción, adjudicada a un estímulo específico (Schultz, 1998 como se citó en Cárdenas et al., 2014).

Aunque la DA es el principal neurotransmisor de este circuito, este no es ajeno a la influencia de otros neurotransmisores o moléculas que podrían influenciar de manera indirecta la regulación de la conducta alimenticia. Por ejemplo, se sabe que las neuronas GABAérgicas (ácido γ -aminobutírico, GABA) relacionadas con el ATV, el NAc, la amígdala y el hipocampo, pueden suprimir la actividad dopaminérgica. También se relaciona a los opiáceos y endocannabinoides (eCBs) por su actividad en el ATV y el NAc, a la serotonina con su acción sobre el hipotálamo, al glutamato que actúa en la CPF, a la noradrenalina al tener actividad en el hipocampo, y a la adenosina que puede antagonizar a la DA (Becoña y Cortés, 2011; Cárdenas et al., 2014; Cota et al., 2006; Razón, et al., 2017).

Diversas investigaciones se han centrado en esclarecer la influencia que tiene el circuito de la recompensa sobre las conductas alimentarias. Szczycka y colaboradores (2001, como se citó en Cota et al., 2006), reportan que la deficiencia de la DA en el estriado provoca hipofagia

en los sujetos hasta niveles críticos, indicando que la alimentación se restituye cuando se restaura la disponibilidad de DA en el caudado putamen y, cuando se restaura adicionalmente en el Nac, la elección de la dieta se basa su palatabilidad. La revisión de Simpson y Bloom (2010) recopila diferentes reportes en los que se describe que los niveles de DA aumentan en el NAc después de la ingestión de alimento palatable, Hernández y Hoebel (1988 como se citó en Simpson y Bloom, 2010) exponen que la expresión dopaminérgica puede regularse por hormonas como la leptina, que disminuye la activación neuronal dopaminérgica en el ATV en cortes *ex vivo* (Hommel et al., 2006, como se citó en Simpson y Bloom, 2010) y la grelina, que al administrarse directamente en el NAc y ATV aumenta los niveles de dopamina y promueve la ingestión de alimentos (Naleid et al., 2005, como se citó en Simpson y Bloom, 2010).

En el trabajo con sujetos obesos se reportó una relación inversamente proporcional entre su índice de masa corporal (IMC) y la expresión del receptor D2 (de DA) en la zona estriatal, lo que implica menor sensibilidad a la recompensa. Esta condición de la baja expresión del receptor también se presenta en sujetos con adicción a drogas, por lo que los investigadores hipotetizan que esto podría explicar la conducta compensatoria de sobreingesta, como estrategia para aumentar la estimulación de la DA (Wang et al., 2001, como se cita en Cota et al., 2006).

Referente a la modificación de la actividad dopaminérgica en regiones ventromediales, Kupfermann y colaboradores (2001), proponen discernir cuidadosamente los resultados, ya que los efectos reportados podrían deberse a una alteración en los procesos sensoriales y/o motores.

1.2 Sistema cannabinoide

El descubrimiento del sistema endocannabinoide (SeCB) fue incidental, el objetivo de las investigaciones era conocer el mecanismo de acción de la *Cannabis sativa*, comprobar los efectos terapéuticos que se le atribuían por evidencia anecdótica, y de ser confirmados, separarlos de la actividad psicotrópica también relacionada a su consumo. Se encontró que los efectos que produce en el organismo, son mediados principalmente por su unión a dos receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés), que se les nombró como receptores a cannabinoides tipo 1 y 2 (rCB1 y rCB2 respectivamente), a partir de este hallazgo, se inició la búsqueda de los ligandos endógenos, denominados endocannabinoides (eCBs) y posteriormente se describieron las enzimas que los sintetizan. Estas moléculas endógenas en conjunto fueron definidas como SeCB, sus receptores pueden relacionarse con moléculas exógenas, de origen vegetal como las provenientes de la *C. sativa L.* denominadas fitocannabinoides (fCBs), o de origen sintético, diseñadas en un laboratorio y conocidas como cannabinoides sintéticos, juntos conforman el sistema cannabinoide (SCB) (Cristino, et al., 2020; Di Marzo y Piscitelli, 2015).

El SCB generó mayor interés cuando se reportaron algunos efectos mediados por su manipulación, además de la relación entre las alteraciones en la señalización, expresión o funcionamiento de alguno de sus elementos y patologías o alteraciones en el buen funcionamiento del organismo. Desde entonces, los componentes del SCB se han propuesto como blancos farmacológicos para el tratamiento de diversas enfermedades y condiciones (Di Marzo, 2018). Sin embargo, el avance en las investigaciones, también reveló la amplia interacción con otros sistemas de neurotransmisión, lo que complejiza la integración de todos los elementos en los mecanismos de acción en los que participa el SCB, dificultando el control de su manipulación (Cristino, et al., 2020; Di Marzo, 2018).

1.2.1 *Ligandos cannabinoides*

1.2.1.1 Endocannabinoides. Son un grupo de ligandos lipídicos que incluyen amidas, ésteres y éteres de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, derivados del ácido araquidónico (AA), por lo que pertenecen a la familia de los eicosanoides, moléculas originadas por la oxidación de ácidos grasos esenciales de 20 carbonos (Di Marzo, 2006). Por su naturaleza lipofílica existe una hipótesis de que no se almacenan en vesículas sinápticas, sino que se sintetizan bajo demanda, lo que explicaría una acción espacio-temporal selectiva, y que posteriormente se degradan. Estas características bioquímicas junto con su modo de producción y liberación, respaldan la hipótesis que los proponen como neuromoduladores (Cota, et al., 2006; Di Marzo, 2018).

El primer eCB en ser caracterizado fue la N-araquidonoiletanolamina (AEA, anandamida), formada a partir de una amida del AA y la etanolamina, su nomenclatura proviene de la palabra sánscrita *ananda* que significa felicidad. Esta molécula es uno de los miembros menos abundantes de su familia, las N- aciletanolaminas (NAE) (Di Marzo, 2018). Fue aislada por vez primera por Mechoulam y colaboradores en 1992, a partir de un extracto lipídico de cerebro de cerdo (Di Marzo, et al., 1998). Se ha encontrado presente en el sistema nervioso central (SNC) y en algunos otros órganos, su alta expresión en zonas cerebrales coincide con la alta densidad de expresión del rCB1, a excepción del tallo cerebral y el tálamo, en donde hay poca presencia del receptor (Berrendero, 2002; Cota, et al., 2006; Romero, 2002).

El 2-araquidonoilglicerol (2-AG), pertenece a la familia de los lípidos 2-acilgliceroles (2-AcG). La mayoría de sus congéneres tienen una expresión menos abundante y parecen tener el único objetivo de mejorar su funcionalidad (Di Marzo, 2018). Esta molécula fue aislada por primera vez en 1995, por dos grupos diferentes, uno a cargo de Mechoulam y el otro encabezado por Sugiura, a partir de tejido del intestino de perro y cerebro de rata

respectivamente. Se considera el eCB más eficaz y probablemente el agonista endógeno con mayor afinidad para el rCB1, con un patrón de localización similar a la AEA, pero en concentraciones mayores (Cota, et al., 2006; Di Marzo, 2006).

Otros eCBs conocidos, pero poco caracterizados son, la O-araquidonoil-etanolamina, conocida también como virodhamina, es un ácido araquidónico unido a etanolamina a través de un enlace éster. Se sabe que su densidad de expresión en ciertas regiones es similar a la de AEA. La N-araquidonoil dopamina (NADA), al administrarse sistémicamente induce hiperalgesia, hipotermia, y reducción de la actividad física espontánea, aunque no se tiene claridad de que receptor media estos efectos. El 2-araquidonil glicerol éter, conocido como éter de noladín, fue aislado en el 2001 por Hanus y colaboradores a partir de tejido de cerebro de cerdo, se le atribuye inducir sedación, hipotermia, inmovilidad intestinal y antinocicepción leve (Cota, et al., 2006). Estos ligandos eCBs se expresan en diferentes sitios del cerebro a diferentes concentraciones y se conoce que pueden ser responsables de respuestas no mediadas por los rCB1 y rCB2, debido a su afinidad con otros receptores (Ver Tabla 1).

Tabla 1.*Objetivos moleculares y localización de algunos endocannabinoides*

Cannabinoides endógenos	Acción en CB1 y CB2	Efecto en canales TRPs	Efecto en PPARs y GPCRs huérfanos	Efecto en otros receptores y canales iónicos	Localización
AEA	•CB1 (+) # •CB2 (+) #	•TRPV1 (+) •TRPM8 (-)	•GPR55 (+)* •PPAR γ (+)	•CaV3s (-) •VR1 (+)	Hipocampo, corteza, cuerpo estriado, tallo cerebral, tálamo y ganglios basales. Piel, intestino, hígado, bazo, riñón, testículos, timo
2-AG	•CB1 (+) •CB2 (+)	•TRPV1 (+)	•GPR55 (+)* •PPAR γ (+)	•A2A de adenosina •5TH1A •GABA-A (+)	Patrón de expresión similar a AEA, con niveles de concentración superiores
Virodhamida	•CB1 (+) # •CB2 (+)	-	-	-	Hipocampo, corteza, cerebelo, tronco encefálico, cuerpo estriado
NADA	•CB1 (+) #	•VR1 (+)	-	-	Cuerpo estriado, hipocampo, cerebelo Bazo, riñón, corazón, piel
Éter de noladín	•CB1 (+)	-	-	-	No se ha confirmado su localización

Nota. (+) Agonista, (-) Antagonista, *Posiblemente, # Actividad parcial sobre el receptor.

(Berrendero, 2002; Cota et al., 2006; Cristino et al., 2020; Di Marzo, 2018).

1.2.1.2 Fitocannabinoides La *Cannabis sativa*, mejor conocida como marihuana, ha sido utilizada por el ser humano desde hace varios siglos. Civilizaciones antiguas ya la empleaban con fines medicinales y religiosos, posteriormente su uso fue recreacional, convirtiéndose en una de las drogas de abuso más consumidas actualmente en el mundo. Contiene más de 400 compuestos químicos, de los cuales más de 100 se consideran fCBs, en su mayoría no psicotrópicos, con una expresión en diferentes proporciones según la variedad de la planta. Algunos de los principales efectos que produce son mediados por los receptores a cannabinoides (rCBs), aunque hay evidencia de que participan otros receptores (Ver Tabla 2) (Berrendero, 2002; Cristino et al., 2020; Di Marzo, 2018).

En su mayoría, los fCBs presentan estructuras tricíclicas de ciclohexano, tetrahidropirano y benceno con 21 carbonos. Son hidrofóbicos y por lo tanto solubles en lípidos, lo que explica su fácil permeabilidad en las membranas (González, et al., 2002).

Tabla 2.*Objetivos moleculares propuestos para algunos Fitocannabinoides*

Fito-cannabinoide	Acción en CB1 y CB2	Efecto en canales TRPs	Efecto en PPARs y GPCRs huérfanos	Efecto en otros receptores y canales iónicos	Efecto en enzimas y transportadores
THC	•CB1 (+) •CB2 (+) #	•TRPV2 (+)	•GPR55 (+) •GPR18 (+)	-	-
CBD	Modulador alostérico negativo CB1	•RPV1 (+) •TRPV2 (+) •TRPV3 (+)* •TRPA1 (+) •TRPM8 (-)	•PPAR γ (+) •GPR55 (-) •GPR3 (-)* •GPR6 (-)* •GPR12 (-)*	•CaV3s (-) •CaV1s (-) •5-HT1A (+) •GABAAR (+)* •A2A	•FAAH (-) •ENT (-) • Transporte de eCB a través de la membrana (-)
CBG	•CB2 (+) #	•TRPV1 (+) •TRPV2 (+) •TRPA1 (+) •TRPM8 (-)	•PPAR γ (+)	•ADRA2 (+)* •5-HT1A (-)*	• Transporte de eCB a través de la membrana (-)
THCV	•CB1 (-)# •CB2 (-)#	•TRPV1 (+) •TRPM8 (-) •TRPA1 (+) •TRPV2 (+) •TRPV3 (+)a •TRPV4 (+)	-	-	-

Nota. (+) Agonista, (-) Antagonista, *Posiblemente, # Actividad parcial sobre el receptor.

(Cristino et al., 2020; Di Marzo, 2018).

El primer fCB en ser caracterizado fue el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC o THC) por Gaoni y Mechoulam en 1964. Es considerado el principal responsable de las propiedades psicoactivas del consumo de la planta, dichos efectos se ven potenciados por su metabolito, el 11-hidroxi-THC (11-OH-THC), un compuesto psicoactivo. Por su parte, el cannabidiol (CBD) es considerado prácticamente desprovisto de propiedades psicoactivas y capaz de reducir los efectos oxidativos en las neuronas, lo que le atribuye un papel neuroprotector, que aunado a otras características lo ha convertido en un blanco de estudio con fines terapéuticos (Berrendero, 2002; Di Marzo, 2018; González, et al., 2002). Otros fCBs conocidos son cannabicromeno (CBC), cannabigerol (CBG), cannabicitrol (CBL), cannabitrilol (CBT), ácido cannabidiólico (CBDA), cannabidivarina (CBDV), cannabigerovarina (CBGV), Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), Δ^9 - tetrahidrocannabivarina (THCV), entre otros (Di Marzo y Piscitelli, 2015; Di Marzo, 2018; González, et al., 2002).

La actividad de estas moléculas en el organismo podría afectar el metabolismo y función de sus congéneres. Por ejemplo, el CBD promueve la permanencia del THC en el organismo, potencia sus efectos analgésicos y bloquea los excitatorios (González, et al., 2002), pero también de otras moléculas endógenas, como las enzimas responsables de la síntesis y degradación de eCBs (Ver Tabla 2) (Di Marzo y Piscitelli, 2015). Gracias a esta influencia sobre el SCB, actualmente fármacos botánicos derivados de la *C. sativa L.* se comercializan como tratamiento de diferentes enfermedades y condiciones, entre las que se encuentran el dolor neuropático, la espasticidad subyacente a la esclerosis múltiple, la caquexia relacionada al cáncer y SIDA, o las náuseas inducidas por quimioterapia, además de estudiarse su potencial uso terapéutico en enfermedades inflamatorias, autoinmunes, entre otras (Cristino et al., 2020; Di Marzo, 2018).

1.2.1.3 Cannabinoides sintéticos Son moléculas de diseño con principal actividad sobre los rCBs, pueden clasificarse como cualquier ligando, de acuerdo al tipo de interacción que promueva en el receptor al que se una. Si estimulan la actividad del receptor se les conoce como agonistas, por el contrario, si bloquean esta actividad se le considera antagonistas y, aquellas capaces de producir efectos contrarios a los mediados por la activación, son conocidos como agonistas inversos (Pazos y Mato, 2002).

Los agonistas sintéticos tienen una afinidad diferente para cada receptor, pueden clasificarse, de acuerdo a su estructura química, aquellos análogos a los fCBs se dividen en clásicos y no clásicos, los primeros comparten la característica de una estructura dibenzopirana, como el 11-hidroxi- Δ^8 -THC-dimetilheptilo (HU-210), el 11-hidroxi-hexahidrocannabinol-dimetilheptilo (HU-243), la nabilona y el THC sintético (dronabinol). Los agonistas no clásicos son moléculas con estructuras bi o tricíclicas, que carecen del anillo de pirano, algunos de ellos son el CP55,940, el CP55,244 y el CP50,556 (levonantradol). Los aminoalquilindoles, son compuestos cannabimiméticos derivados de la pravadolina que tienen alta afinidad por el rCB1 y rCB2, su principal representante es el WIN55,212-2. Por último, los eicosanoides, son compuestos derivados del AA como la araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA) y la araquidonilciclopropolamida (ACPA), afines principalmente a los rCB1 (Cota, et al., 2006, Di Marzo, 2018; González, et al., 2002; Pazos y Mato, 2002).

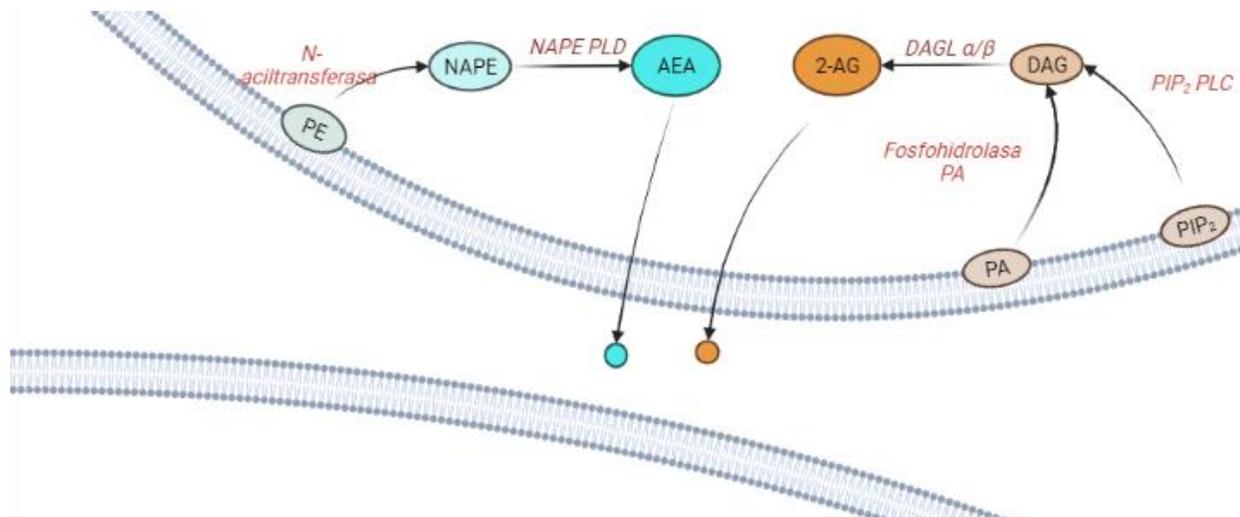
Dentro del grupo de los cannabinoides antagonistas, se encuentra el SR141716-A con una alta selectividad por los rCB1. A partir de su estructura se han desarrollado otras moléculas antagonistas como el AM251 y el AM281. Respecto al antagonismo de los rCB2 se contempla al SR144528, el 6-iodopravadolina (AM630) y el 6'-azidohept-2'-ino- Δ^8 -THC (O-1184), algunos de estos compuestos actúan como agonistas inversos (Berrendero, 2002; Pazos y Mato, 2002).

Los cannabinoides sintéticos son una herramienta en la investigación del SCB, han servido como recurso farmacológico para la investigación de mecanismos de acción, así como

para realizar el mapeo de la distribución de los rCB1, principalmente mediante agonistas marcados radioactivamente (Pazos y Mato, 2002). Actualmente algunos de estos compuestos se comercializan con fines clínicos y algunos otros se encuentran aún en proceso de aprobación. Sin embargo, también son de interés para el comercio ilegal de los psicotrópicos, especialmente algunos agonistas ultra potentes para los rCB1, sin embargo, su consumo se ha relacionado con efectos secundarios a menudo peligrosos (Di Marzo, 2018).

1.2.2 Metabolismo de los endocannabinoides

1.2.2.1 Síntesis y transporte Con el descubrimiento y caracterización del SeCB, comenzó la investigación por conocer su papel fisiológico, así como sus mecanismos de síntesis y degradación (Di Marzo, et al., 1998). Los procesos metabólicos más estudiados de los eCBs son de la AEA y el 2-AG, que, aunque comparten objetivos moleculares, difieren en sus vías de regulación. La síntesis de ambos se da por hidrólisis de fosfolípidos de membrana, facilitados por la remodelación de la membrana celular. Su producción se estimula por el aumento en la concentración iónica de Ca^{++} intracelular, ya que las enzimas involucradas son dependientes de Ca^{++} (Ver Figura 2) (Cristino, et al., 2020; Soria-Lara, et al., 2019).

Figura 2*Síntesis de AEA y 2-AG*

Nota. Adaptado de “Endocannabinoids in body weight control” (p. 3), por Horn, et al., 2018, *Pharmaceuticals*, 11.

La vía de síntesis de AEA la comparte con sus congéneres e involucra dos reacciones, primero el fosfatidil etanolamina (PE, por sus siglas en inglés), un fosfolípido de membrana, por acción de la N-acetiltransferasa se convierte en N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE, por sus siglas en inglés), que posteriormente es hidrolizado por la fosfolipasa D selectiva de NAPE (NAPE-PLD, por sus siglas en inglés) dando como resultado una NAE, la molécula específica NAPE precursora de AEA es el N-araquidonil fosfatidiletanolamina (NArPE, por sus siglas en inglés) que tiene baja disponibilidad en comparación con sus congéneres. Lo anterior podría explicar los bajos niveles de expresión de la AEA frente a otras NAEs. Otra vía alternativa, sugerida por investigaciones *in vitro* es la condensación directa del AA y etanolamina, cuando se encuentran a altas concentraciones (Di Marzo, 2006, Horn et al., 2018; Soria-Lara, et al., 2019).

La síntesis de 2-AG no se realiza por una única vía, ya que se han planteado como posibles sustratos los glicerofosfolípidos, triacilgliceroles y sn-1,2-diacilgliceroles (diacilgliceroles, DAG), cada uno por vías diferentes. Los DAGs se consideran los principales sustratos para la síntesis de 2-AG, especialmente aquellas que contienen 2-araquidonato. Los DAGs pueden sintetizarse a partir de dos sustratos, el fosfoinositol-bisfosfato (PIP 2) y el ácido fosfatídico (PA), ambos fosfolípidos de membrana, que se catalizan por acción de la fosfolipasa-C selectiva a PIP2 (PIP2 PLC) y de la fosfohidrolasa selectiva de PA respectivamente. La conversión de DAG a 2-AG se da por medio de la lipasa diacilglicerol DAGL, que pueden ser del tipo α o β , caracterizadas por una alta selectividad a los DAGs frente a fosfolípidos, monoacilglicéridos, triacilgliceroles y amidas de ácidos grasos. La expresión de la tipología de la enzima y su localización parecen estar mediados por el desarrollo biológico, ya que DAGL $_{\beta}$ se presenta en el cerebro durante las primeras etapas del desarrollo, preferentemente en axones neuronales, mientras que DAGL $_{\alpha}$ se localiza en posición complementaria a los rCB1, es decir en la postsinapsis del cerebro adulto, esta información apoya la hipótesis de la participación autocrina en axones y el tipo de comunicación retrógrada en el cerebro adulto (Cristino, et al., 2020; Di Marzo, 2006; Soria-Lara, et al., 2019).

La síntesis de los eCBs se da a nivel intracelular, así que para poder llegar al sitio de unión del receptor y activarlo, deben atravesar la membrana celular. Inicialmente, se pensaba que por el carácter lipofílico de los endocannabinoides y su adherencia a las proteínas de unión, su paso por la membrana era mediante difusión pasiva, posteriormente con base en algunas características del recorrido, se propuso otra hipótesis, la existencia de un transportador membranal bidireccional, aunque aún no se tiene certeza de su existencia (Di Marzo, 2006; Horn, et al., 2018).

1.2.2.2 Degradación Los eCBs se caracterizan por tener un efecto localizado y transitorio, así que una vez que activaron al receptor, son rápidamente captados y degradados intracelularmente por diferentes enzimas (Ver Figura 3). En el caso de la AEA, es por la amida hidrolasa de ácido graso (FAAH), que como su nombre lo indica hidroliza el grupo amida, separando el ácido araquidónico y la etanolamina. Esta enzima se localiza mayoritariamente en la postsinápsis y reconoce como sustratos a una gran variedad de aminas de ácidos grasos, como otras NAEs, amidas primarias, N-acilaminoácidos, N-aciltaurinas e inclusive se sabe que puede hidrolizar ésteres de ácido graso como el 2-AG y la virodhamina. Pareciera que esta es la única vía catabólica de la AEA, o al menos la principal, ya que su distribución tisular y celular se encuentran relacionadas, al cesar su actividad los niveles de AEA aumentan, mientras que los del 2-AG no presentan cambios mayores (Di Marzo, 2006; 2018; Soria-Lara, et al., 2019).

La principal vía de degradación del 2-AG, involucra a la lipasa monoacilglicerol (MAGL) que cataliza la molécula generando AA y glicerol, suele localizarse presinápticamente. Reconoce como sustrato a casi cualquier ácido graso insaturado de cadena larga esterificado al glicerol. Se plantea que los efectos de MAGL representan sólo el 50% de la actividad hidrolizante total del 2-AG, por lo que se considera la participación de otras esterasas (Di Marzo, 2006, 2018).

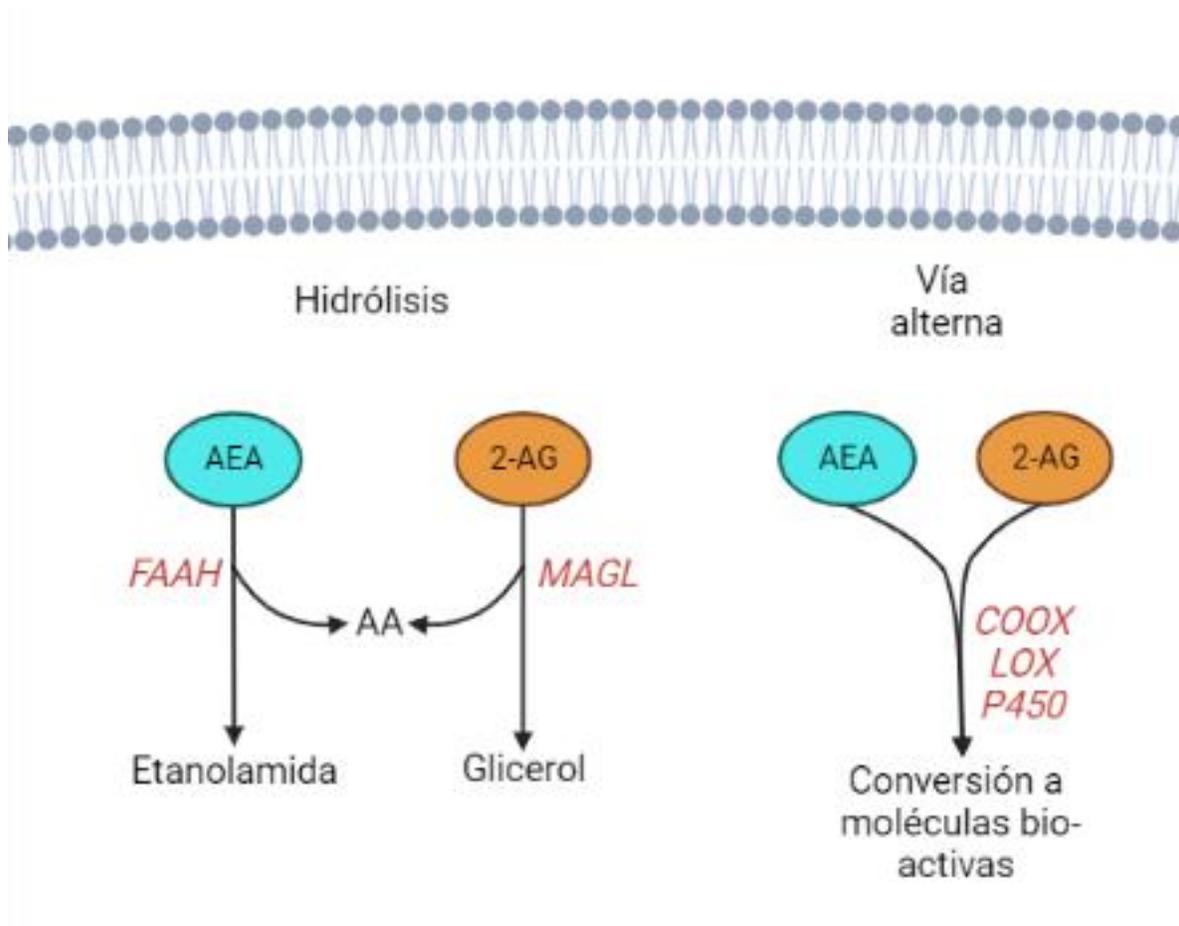
A estas enzimas involucradas en la síntesis y degradación se les considera como las principales responsables de la modulación del tono eCB. Sin embargo, su actividad puede verse influenciada por moléculas endógenas, como la leptina y el óxido nítrico (NO), u exógenas como los antagonistas sintéticos de actividad enzimática (Cota, et al., 2006; Di Marzo, 2006, 2018).

Adicional a estas vías de degradación, la AEA y el 2-AG pueden ser reconocidos por algunas enzimas de la cascada de araquidonato, como ciclooxigenasa-2 (COX-2), 12 y 15 lipoxigenasas y algunas oxigenasas de citocromo p450. El catabolismo por acción de la COX-2

da como resultado moléculas de la familia de los prostanoïdes, que pueden ser afines a receptores novedosos y aún por caracterizar, pero que se han relacionado por inducir respuestas proinflamatorias y pronociceptivas. La COX-2 podría ser el principal regulador de la AEA en regiones como el hipocampo. Por otra parte, algunos de los metabolitos cannabinoides obtenidos a partir de lipoxigenasas son capaces de unirse a los rCBs, aunque con baja afinidad, y a receptores TRPV1 y PPAR α , e inclusive inhibir FAAH. La mayoría de estas moléculas no son sustrato de FAAH o MAGL (Cristino, et al., 2020; Di Marzo, 2006, 2018).

Figura 3

Vías de degradación de AEA y 2-AG



Nota. Adaptado de "Endocannabinoids in body weight control" (p. 3), por Horn, et al., 2018, *Pharmaceuticals*, 11.

1.2.3 Receptores a cannabinoides y sus mecanismos de transducción

El SCB activa la transducción intracelular mediante el proceso, receptor (rCB1 o rCB2) → acoplador (GPCR) → efector (canales iónicos o segundos mensajeros) y así transmite la

información al interior de la célula, favoreciendo una respuesta adecuada ante el estímulo (Díaz-Laviada, 2002).

El primer rCB en ser descubierto fue el rCB1, categorizado a través de métodos radiométricos por Dacane y colaboradores en 1988. Fue identificado y clonado a partir de tejido de rata por Matsuda y su equipo en 1990 y un año después fue identificado en tejido humano por el equipo de Gerard. Posteriormente se descubrió al rCB2, identificado y clonado por primera vez por Munro y colaboradores en 1993 (Cota, et al., 2006; Pazos y Mato, 2002).

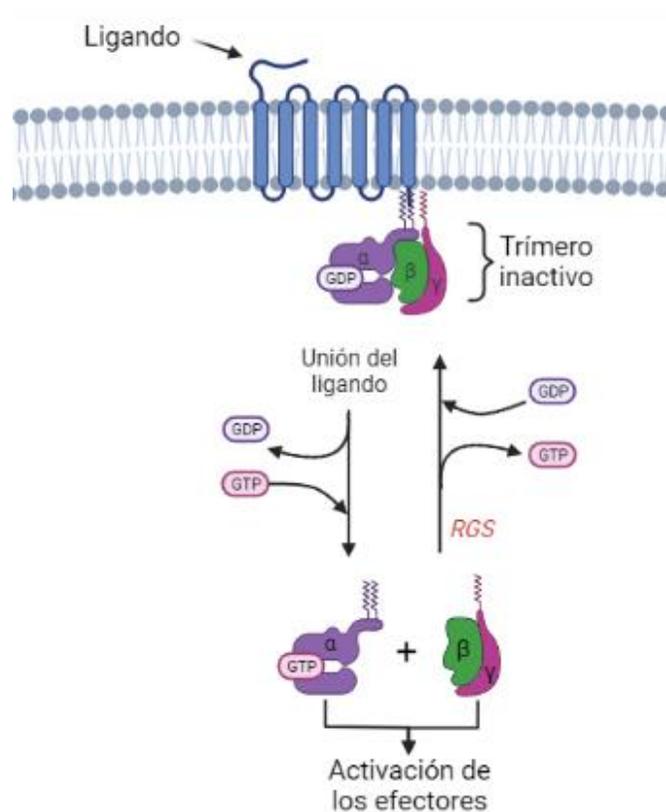
Los rCB1 y rCB2 pertenecen a la súper familia de GPCR, proteínas de membrana, caracterizadas por presentar una estructura de siete dominios transmembranales, con un extremo N-terminal extracelular, en donde suele encontrarse la zona de unión del ligando y un extremo C-terminal al interior de la célula, próximo a la proteína G heterotrimérica (formada por las subunidades α , β , y γ) responsable de la activación de efectores. Esta proteína G tiene actividad GTPasa, la subunidad α es la responsable de unirse para hidrolizar trifosfato de guanosina (GTP, por sus siglas en inglés) y liberar difosfato de guanosina (GDP, por sus siglas en inglés) (Ver Figura 4) (Ortega-Gutiérrez, 2013; Pazos y Mato, 2002).

La activación del receptor implica la unión de un ligando en el dominio extracelular que modifica la posición de las hélices transmembrana e interaccionar con la proteína G, produciendo que la subunidad α libere el GDP, al que estaba unido y aumente su afinidad con el GTP. Al unirse estas dos moléculas, se disocian del dímero $\beta\gamma$, así como del propio receptor, la subunidad α unida al GTP y el dímero $\beta\gamma$ activan sus respectivas vías de señalización independientes. Esta activación se detiene por acción de las proteínas reguladoras de la señalización de las proteínas G (RGS por sus siglas en inglés) induciendo la actividad GTPasa de la subunidad α , que tras hidrolizar al GTP, queda unida a GDP lo que aumenta la afinidad por el dímero $\beta\gamma$, al volver a re-asociarse con la proteína G heterotrimérica queda inactiva y

lista para comenzar un nuevo ciclo. La amplificación de la señal se ve favorecida, porque la interacción con un receptor puede activar simultáneamente a más de una proteína G (Díaz-Laviada, 2002; Ortega-Gutiérrez, 2013).

Figura 4

Ciclo de activación/inactivación de las proteínas G heterotriméricas



Nota. Adaptado de "Papel de las subunidades alfa de proteínas G en los procesos morfogénicos de hongos filamentosos de la división Ascomycota" (p.3), por García-Rico y Fierro (2017), *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(1).

Existen diferentes familias de proteínas G heterotriméricas que se caracterizan por la subunidad α que poseen, y cada una produce efectos celulares diferentes. Por otro lado, el dímero $\beta\gamma$ induce su propia cascada de señalización independientemente del tipo de subunidad α asociada, ambos mediante efectores particulares (Ortega-Gutiérrez, 2013). Los efectores pueden ser de dos tipos, canales iónicos que regulan la distribución de iones intracelulares y así promueven o inhiben la excitabilidad de la célula o por actividad enzimática que forman nuevas moléculas llamadas segundos mensajeros, que a su vez activan nuevas enzimas o proteínas, formándose una cascada de señalización (Díaz-Laviada, 2002).

La mayoría de los receptores cannabinoides se acoplan a proteínas $G\alpha_{i/o}$, que inhiben la adenilil ciclasa (AC), hormona que cataliza la conversión de adenosín trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés) a monofosfato de adenina cíclico (AMPC, por sus siglas en inglés), por lo que la concentración de este último disminuye afectando la capacidad de fosforilación de las quinasas que tienen funciones sobre el metabolismo celular y la expresión génica, además estimula la vía de las quinasas activadas por mitógeno (MAPK) que están involucradas con la regulación de proliferación y diferenciación celular. Respecto a la influencia de los receptores cannabinoides sobre algunos canales iónicos, se encuentran los canales de Ca^{++} , mayoritariamente presinápticos, que al modular su concentración intracelular, regulan la expulsión de sustancias por exocitosis, como la liberación de neurotransmisores. También pueden regular algunos tipos de canales de K^+ preferentemente en posición postsináptica, que se conocen por modular la excitabilidad de la membrana (Ver Figura 5), aunque se piensa que la activación de los rCB2 no modifica la actividad de los canales de Ca^{++} y K^+ (Berrendero, 2002; Cota, et al., 2006; Díaz-Laviada, 2002; Pazos y Mato, 2002). En menor cantidad se ha descrito la interacción con proteínas $G\alpha_s$, que estimula a la AC, lo que promueve el incremento en la producción de AMPC intracelular (Díaz-Laviada, 2002). Cada efector gatilla una cascada de transducción diferente y en ocasiones simultánea que dificulta la comprensión de las

señales subsecuentes y sus efectos. La actividad de estos efectores promueve la hipótesis del papel de los eCBs como neuromoduladores (Cota, et al., 2006; Díaz-Laviada, 2002).

El rCB1, es considerado posiblemente el GPCR de siete dominios transmembranales más abundante en el cerebro de los mamíferos, el mapeo de su distribución revela una alta expresión en el SNC, en regiones como el hipocampo, la corteza, la amígdala, los ganglios basales, el cerebelo, mientras que en la periferia se expresa en órganos como el pulmón, bazo, corazón, próstata, útero, ovarios, endotelio vascular y células del músculo liso principalmente (Berrendero, 2002; Cota, et al., 2006; Romero, 2002). Su expresión o ausencia en diferentes zonas del cerebro, se asocia con algunos efectos producidos por el consumo o administración de cannabinoides exógenos. Por ejemplo, su expresión en áreas del hipocampo y la corteza cerebral podrían explicar alteraciones reportadas sobre el aprendizaje, memoria, además de las propiedades anticonvulsivas (Berrendero, 2002).

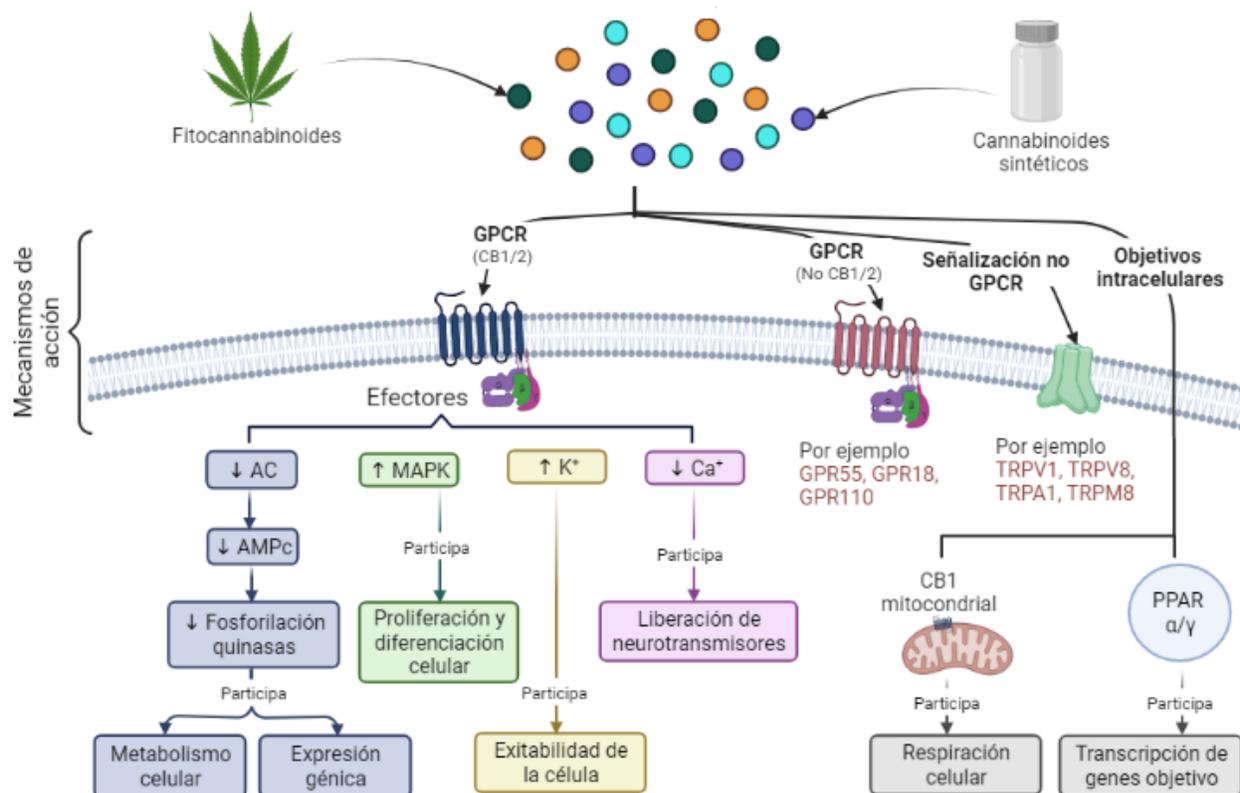
Hay evidencia de que la actividad de los receptores cannabinoides probablemente estimula la proliferación y diferenciación de células madre progenitoras adultas, así como la participación en el metabolismo en tejido cerebral al inhibir el transporte protónico en el cuarto dominio de la membrana externa de la mitocondria. La mayoría de los efectos que pueda mediar, dependerán en gran medida de la región anatómica del tejido donde se exprese, así como del tipo de célula. Algunas de las funciones localizadas que se le atribuyen son: inhibir canales de Ca^{++} dependientes de voltaje, promover la liberación vesicular de GABA o glutamato cuando se encuentran en la presinapsis de neuronas inhibitoras o excitatorias respectivamente. También se les considera capaces de mediar la autoinhibición en interneuronas corticales cuando se expresan en la postsinapsis. Su presencia en astrocitos del hipocampo sugiere su participación en la regulación de la plasticidad sináptica y su expresión en el mismo tipo de células, pero en el hipotálamo podría regular la señalización de leptina (Cristino, et al., 2020). Inicialmente por su posible potencial terapéutico y su alta densidad de

expresión dentro del SNC fue el blanco principal de las investigaciones del SCB, pero ha sido muy difícil su manipulación, por la presencia de efectos adversos (Cristino et al., 2020; Di Marzo, 2018).

El rCB2 ha sido menos investigado, por lo tanto, se desconoce mucho de su fisiología celular y molecular. Durante un tiempo se consideró que sólo se expresaba a nivel periférico, por su alta presencia en células del sistema inmune y en órganos como el bazo y las amígdalas sublinguales. (Berrendero, 2002; Cota, et al., 2006; Romero, 2002). Posteriormente se encontró su presencia en células neuronales y no neuronales del cerebro, sus mecanismos de acción aún no están bien definidos y, aunque actualmente se plantea que su participación principal es la modulación inmune, no se descarta una actividad reguladora en otros procesos. Se ha hipotetizado que su activación tiene efectos opuestos a los del rCB1 y que sus niveles de expresión en neuronas sanas son bajos. También se ha relacionado su expresión alterada con distintas enfermedades como esclerosis múltiple y Alzheimer, estos hechos lo promovieron como un objetivo prometedor para el tratamiento de diferentes enfermedades (Cristino, et al., 2020; Di Marzo, 2018). Se sabe que al igual que su congénere el rCB1, la activación del rCB2 estimula la neurogénesis en la vida adulta. Adicionalmente, se ha propuesto su implicación en la regulación en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y, respecto a su función en regiones puntuales, se ha sugerido que su activación postsináptica en las regiones CA2 y CA3 del hipocampo reduce la excitabilidad neuronal. La información obtenida hasta la fecha requiere ser validada, ya que en ocasiones la solidez de los estudios realizados está en duda por las herramientas farmacológicas utilizadas, que posteriormente demuestran baja selectividad para el receptor (Cristino, et al., 2020).

Figura 5

Mecanismos de acción y efectores del SCB



Nota. Adaptado de “Endocannabinoids in body weight control” (p. 3), por Horn, et al., 2018, *Pharmaceuticals*, 11.

Los eCBs también generan efectos no mediados por receptores a cannabinoides (Ver Figura 5). Existe evidencia de su interacción con receptores ionotrópicos como es el primer y segundo miembro de la subfamilia V, el primer miembro de la subfamilia A y el miembro 8 de la subfamilia M, de los canales catiónicos potenciales del receptor transitorio vaniloide (TRPV1, TRPV2, TRPA1 y TRPM8 respectivamente). También se sugiere la actividad de los CBs en algunos GPCRs huérfanos, como el GPR55, GPR18 y GPR110, así como su afinidad al

receptor activado por proliferador de peroxisomas del tipo α y γ (PPAR α y PPAR γ respectivamente), parte de esta información no ha sido validada *in vivo* debido a la falta de ligandos radiomarcados de alta afinidad para estos receptores (Cristino et al., 2020; Di Marzo, 2018).

También se sabe que los CBs son capaces de estimular a gases por medio de la óxido nítrico sintasa constitutiva (cNOS) que promueve la formación de NO, un radical libre, que a bajas concentraciones actúa como mensajero intracelular, mientras que a concentraciones altas estimula la liberación de radicales libres que pueden generar daño oxidativo. La cNOS generalmente produce pequeñas cantidades de NO y parece tener la capacidad de inhibir la óxido nítrico sintasa de inducción (iNOS), que se relaciona con la producción de NO por periodos prolongados, lo que favorece su acumulación y promueve su oxidación. Los eCBs también pueden activar a la fosfolipasa A2 (PLA2) y la PLD, ambas relacionadas con la producción de AA y que ejercen diversos efectos a partir de su interacción con otras enzimas, canales y receptores que pueden no estar relacionados con el SCB (Di Marzo, et al., 1998; Díaz-Laviada, 2002).

1.3 Cannabinoides y conducta alimentaria

La actividad cannabinoide participa en la regulación de la conducta alimenticia mediante dos circuitos diferentes, uno de ellos el homeostático, regulando el gasto energético y/o la señalización de hambre/saciedad. El otro circuito regula la información hedónica, participando en la valoración de las propiedades reforzantes del alimento.

1.3.1 Participación cannabinoide en la regulación alimenticia homeostática

El primer registro en la literatura sobre la relación entre la actividad del SCB y la regulación de la ingesta de alimentos, describía anecdóticamente un efecto orexigénico posterior al consumo de *C. sativa L.*, con preferencia por alimentos hipercalóricos y/o palatables. Investigaciones posteriores confirmaron este hallazgo mediante la administración de cannabinoides endógenos y exógenos que favorecieron la sobreingesta (Williams, et al., 1998; Williams y Kirkham, 1999), efecto que se previno con la co-administración del antagonista de los rCB1. Este hecho fue crucial para que la investigación se centrara principalmente en la participación de estos receptores sobre la regulación alimentaria (Williams y Kirkham, 1999).

Las investigaciones realizadas encontraron que la participación de los rCB1 en la regulación del comportamiento alimenticio podría ser diferente dependiendo de la disponibilidad del alimento, aunque se han presentado datos contradictorios, Onaivi, y colaboradores (2008), reportaron que bajo condiciones *ad libitum* el bloqueo de los rCB1 no muestra efecto en la supresión alimenticia, mientras que Ting y su equipo (2015) observaron que solo mediante administraciones sistémicas de altas concentraciones del antagonista AM251, se observa una reducción en el consumo acumulado de alimento. Sin embargo, ambos grupos de investigación coinciden en que el bloqueo del rCB1 bajo condiciones de privación suprime la ingesta acumulada, efecto que es dosis dependiente y que no es sensible a las características de la dieta. Otro dato que agrega información a este respecto es que, al usar ratones genéticamente modificados para disminuir la expresión total del rCB1, se encuentra un incremento significativo en la ingesta de alimento alto en grasas, en contraste con los sujetos heterocigotos que sí expresan al receptor, este efecto desenmascara la participación de este receptor para censar las señales de saciedad en el balance energético (Guegan, et al., 2013).

La divergencia en los resultados antes mencionados podría deberse en parte a las condiciones específicas de la disponibilidad del alimento, al tipo de alimento y al fármaco

administrado. Por su parte Escartín-Pérez y colaboradores (2009) reportaron el efecto en la elección de macronutrientes, después de administrar sistémicamente el agonista ACEA sugiriendo que el rCB1 participa en la preferencia por tipo de alimento en condiciones *ad libitum*, encontraron una preferencia por carbohidratos, además cambios en la microestructura de la secuencia de saciedad conductual, aumentando el tiempo de alimentación y demorando el proceso de saciedad, efecto que se previno con el bloqueo de los rCB1.

Este receptor también participa en la modulación del gasto energético, como lo revela el reporte de Ravinet-Trillou y colaboradores (2004), en el que sometieron a un modelo de obesidad inducido por dieta (OID) a ratones transgénicos con el rCB1 disminuido, observaron que la ausencia de estos receptores prevenía el desarrollo de la obesidad a diferencia de los controles que si lograban desarrollarla. Parte de la explicación de este efecto, es la participación regulatoria de los rCB1 en la liberación de hormonas implicadas en la alimentación, en ese mismo experimento evaluaron los niveles de insulina plasmática, encontrando que los sujetos que recibieron el tratamiento con el antagonista de los rCB1 tenían niveles más bajos con respecto a los controles, en condiciones del modelo OID. Otro dato que abona la relación del receptor sobre la regulación endócrina en la alimentación, es el efecto de administrar grelina, la señal fisiológica del apetito, vía intra-cerebro-ventricular (icv) en rata, los sujetos disminuyeron significativamente su ingesta de alimento estándar con el bloqueo sistémico de los rCB1 (Ting, et al., 2015).

A nivel central los rCB1 han mostrado tener una modulación puntual en los diferentes elementos de la conducta alimentaria. Al respecto, Werner y Koch (2003) reportaron que la administración icv del antagonista selectivo AM281, disminuyó de forma dosis dependiente la ingesta de alimento inducida por privación.

También se ha buscado investigar su función en zonas centrales relacionadas con la regulación homeostática, aquellas que integran la información energética para dar una respuesta conductual que puede ser endócrina y/o nerviosa, por ejemplo, el hipotálamo. Los rCB1 a este nivel modulan positivamente la ingesta de alimento (Jamshidi y Taylor, 2001), cuando se bloquea a estos receptores en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), se retarda la expresión de la saciedad conductual (Cruz-Martínez, et al., 2010). Paralelamente se ha reportado que al emplear ratones *knock out* (KO) condicionales del rCB1 (disminución de la expresión exclusivamente en el cerebro anterior), se previene el desarrollo de los parámetros metabólicos de un modelo OID, que incluyó peso corporal, acumulación de grasa, niveles de hormonas plasmáticas como leptina, insulina, glucosa, ácidos grasos libre, triglicéridos y colesterol (Quarta, et al., 2010).

Se ha reportado que en modelos de ratones transgénicos KO-CB1 tras una exposición crónica de 12 semanas a una dieta alta en grasas (HFD, por sus siglas en inglés), se observa un incremento significativo en los niveles de ARN mensajero (ARNm) del rCB1 en hígado y tejido adiposo marrón a diferencia de sus hermanos heterocigotos (Quarta, et al., 2010). A nivel central en el hipocampo, aumenta significativamente los niveles de la expresión del rCB1 y sus ligandos endógenos, AEA y 2-AG, así como la expresión de la molécula catabólica DAGL- α (Massa, et al., 2010). En conjunto esto nos señala que una dieta hipercalórica promueve una señalización cannabinoide mejorada que puede resultar en sobre-ingesta de alimentos.

Parte de estos cambios también se han reportado por una exposición de solo 10 días a una HFD, como, una mayor ingesta calórica acumulada y cantidad de tejido adiposo, en comparación con los controles alimentados con una dieta estándar, adicionalmente se reportó un retardo en la expresión de la saciedad (Díaz-Urbina, et al., 2018). Respecto a la actividad cannabinoide en estas condiciones de exposición corta a la HDF, ya se observa un aumento en los niveles de 2-AG en el hipotálamo e hígado, efectos que fueron bloqueados con un inhibidor

de la DAGL- α (Bisogno, et al., 2013). Esto confirma que la relación entre la actividad cannabinoide alterada y la dieta se da desde periodos corto de exposición a dietas hipercalóricas.

Sin embargo, regresando al efecto orexigénico observado con la activación de los rCB1 del hipotálamo, además de los circuitos neuronales en esta región, se da una comunicación intracelular con múltiples cascadas de señalización, que involucra a diferentes neurotransmisores y biomoléculas con participación directa o indirecta en la regulación del comportamiento alimentario.

Al respecto, los resultados de Cruz-Martínez y colaboradores (2018), reportaron que la activación del rCB1 del PVN aumenta la liberación de [3 H]GABA y disminuye la liberación de [3 H]5-HT, efecto celular que es consecuente con un efecto hiperfágico. Cuando se evaluó la participación de los receptores a 5-HT (1A, 1B, 2A y 2C), se logró desenmascarar la modulación antagónica, por un lado, los autores mencionan que los rCB1 que se encuentran expresados en las neuronas glutamatérgicas modulan su liberación negativamente, lo que desencadena que se dejen de activar receptores glutamatérgicos que se expresan posiblemente en las proyecciones 5-HTérgicas, que a su vez pueden activar tanto a receptores acoplados a proteínas Gq (5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}) y G_i (5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}) distribuidas en neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas, lo que ayuda a explicar porque al activar los rCB1 producen el efecto hiperfágico, que no puede ser prevenido por la activación de todos los receptores 5-HT, pero sí por la activación selectiva de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}.

Por último, es necesario mencionar que existen otras moléculas que participan directamente en la modulación homeostática. Tal es el caso de las neuronas liberadoras de POMC y los receptores opioides, en conjunto son capaces de prevenir los efectos hiperfágicos que produce la activación farmacológica de los rCB1 (Koch, et al., 2015).

Otra región del encéfalo que se ha involucrado en la regulación alimentaria es el hipocampo. Dentro de sus múltiples funciones, este núcleo envía información proveniente de hormonas orexogénicas (motilina, grelina, y CCK) y señales periféricas. Massa y su equipo (2010), reportaron que para su modelo tuvieron bien caracterizada la disminución genética total del rCB1, como consecuencia hay un decremento en la ingesta calórica, lo que concuerda con un peso corporal más bajo respecto a los controles que no se puede explicar por la dieta, además de encontrar resistencia a la obesidad en su modelo OID, cuando evaluaron por microscopia fluorescente la expresión del rCB1 en las subestructuras del hipocampo, CA1, CA2, CA3 y giro dentado (GD), en la capa del *estrato radiatum* del hipocampo, encontraron que una HFD es capaz de modificar positivamente la densidad de expresión de este receptor. Los autores asocian lo observado a las interneuronas GABAérgicas, efecto que relacionaron con el aumento de la síntesis de 2AG y AEA, así como cambios en la amplitud de corrientes inhibitorias postsinápticas, evento que es concordante con una disminución en la actividad de la MAGL α , principal molécula encargada de metabolizar a la 2AG. En conjunto, este reporte muestra la participación de los rCB1 del hipocampo expresados en las interneuronas GABAérgicas en la modulación de la conducta alimentaria y como los componentes energéticos modifican la distribución de estos receptores, que a su vez modifican las características electrofisiológicas de estas neuronas.

En conjunto con lo hasta aquí expuesto con respecto a la participación de los rCB1 en la regulación de la alimentación metabólica, la señalización en el interior de las neuronas promueve la motivación por el alimento, lo que garantiza su búsqueda en situaciones de déficit calórico, mientras que, en condiciones de disponibilidad de alimento, participa en la regulación del balance energético y ante señales específicas es capaz de retardar la saciedad. Su activación, es crucial para el desarrollo de sobrepeso, obesidad, y síndrome metabólico, en modelos animales de alimentación con dietas hipercalóricas. Se ha reportado que parte de

estos efectos son mediados por su actividad en el hipotálamo, que involucra la participación de otros neurotransmisores u hormonas plasmáticas también relacionadas con la regulación alimenticia.

Ahora bien, en el caso de los rCB2 y su función en la regulación de la conducta alimentaria se cuenta con poca información debido a que se investigaron tardíamente en comparación con su análogo. Sin embargo, de lo que se ha descrito, se sabe que la respuesta mediada por este receptor podría estar asociada al ajuste del balance energético y el tipo de alimento. La evidencia aún está en discusión, los datos acerca de su participación en la regulación de la ingesta alimentaria son contradictorios. Al respecto, Onaivi y colaboradores (2008), reportaron que en condiciones de disponibilidad de alimento la administración sistémica del agonista inverso AM630, disminuye el consumo de alimento, sin embargo, bajo condiciones de privación la promueve, mientras que Ting y su equipo (2015) reportaron un aumento dependiente de dosis en el consumo de ingesta acumulada de 24h en condiciones *ad libitum* de alimento y agua, pero no así en sujetos privados que se les administró el mismo fármaco.

La participación de estos receptores parece ser diferente según el aporte energético de la dieta, los sujetos sometidos a una dieta estándar (SD) reportaron una disminución en la ganancia de peso corporal por la activación de los rCB2 (Ignatowska, et al., 2011), efecto que concuerda con lo reportado en sujetos KO del rCB2, los cuales aumentaron la ingesta de alimento estándar, peso corporal, cantidad del tejido adiposo (blanco y marrón) y tamaño de los adipocitos. En conjunto los sujetos desarrollaron obesidad con el avance de los días de exposición a la dieta. Otro dato relevante, es que cuando se administró un tratamiento de 40 días con el antagonista selectivo SR144528 a un grupo de ratones *wild type* (WT), se encontraron tendencias a desarrollar los desajustes encontrados en los sujetos KO de los rCB2, incluyendo un efecto hipoglucémico (Agudo, et al., 2010).

En el mismo experimento de Agudo, y colaboradores, (2010) emplearon un esquema de alimentación con una HFD. Los ratones KO-rCB2 tuvieron una reducción de peso corporal con respecto a los controles alimentados con la misma dieta, pero un incremento significativo con los sujetos KO y WT alimentados con la dieta estándar, además de prevenir la formación de tejido adiposo y una adecuada respuesta en la prueba de tolerancia a la insulina, que en conjunto muestra que la ausencia de los rCB2 tiene un efecto protector en las alteraciones metabólicas de la dieta.

Con el descubrimiento de la expresión del rCB2 en el SNC, se abrió la posibilidad de investigar su participación a este nivel. En los primeros reportes, Werner y Koch (2003), encontraron un efecto orexigénico mediado por la administración del AM630 icv, desde la cuarta y hasta la sexta hora posterior a las administraciones. Otra forma de evaluar su participación es la modificación génica en los niveles de expresión del receptor. Romero-Zerbo y colaboradores (2012), trabajaron con ratones que sobre-expresaban esta proteína, específicamente en los núcleos ventromedial (VMN) y arqueado (ARC) del hipotálamo, dejando intacta la expresión del rCB1 total y del rCB2 periférico. Estos sujetos bajo condiciones de privación disminuyeron su ingesta de alimento y peso corporal y dicha disminución en el peso se correlacionó positivamente con alteraciones en la disponibilidad del ARNm de neuropéptidos (POMC, NPY y galanía) en el VMN y ARC del hipotálamo, lo que originó hiperglucemia crónica e intolerancia a la glucosa. Los autores describieron una relación con la caída del rCB2 y los neuropéptidos del hipotálamo para tener un desgaste en la expresión de rCB1 y rCB2 en el páncreas, lo que promovió una disminución de glucagón en plasma.

Esta información sugiere que la señalización del rCB2 total podría participar en la regulación de la ingesta de alimento, la acumulación de grasa y peso corporal, en dietas estándar disminuyendo los parámetros antes mencionados y en dietas hipercalóricas promoviendo el aumento en los mismos. Indirectamente, el rCB2 participa en alteraciones

metabólicas relacionadas con la obesidad, parte de estos efectos podrían estar mediados por su actividad central que parece modular las señales de hambre/saciedad mediante el procesamiento periférico de información endócrina y energética, por señales como la concentración basal de glucosa y los niveles de POMC, NPY y galanina en el hipotálamo, que se relacionan con la expresión de rCBs periféricos.

Hasta este punto se ha revisado parte principal de la literatura con datos que muestran la participación de los rCB1 y rCB2 en el gasto energético y su modulación en la conducta alimentaria. Ahora se revisará como diferentes configuraciones de elementos palatables en la dieta, pueden modificar la conducta alimentaria, que a su vez modifican la comunicación cannabinoide que incluye los niveles de eCBs y la expresión de los rCBs, para promover la aparición de conductas alimenticias patológicas (atracones e impulsividad).

1.3.2 Participación cannabinoide en la regulación de las propiedades reforzantes del alimento

El comportamiento alimentario no sólo se regula por las señales homeostáticas, sino que también contempla elementos de la regulación hedónica, como lo es la palatabilidad de los alimentos. El procesamiento de las propiedades reforzantes de los estímulos se lleva a cabo en las estructuras cerebrales del circuito de la recompensa. La investigación de la actividad cannabinoide en estas estructuras involucran al NAc, al respecto Cortés-Salazar y colaboradores (2014) observaron que la administración de agonistas de los rCB1 en la corteza del NAc (NAcS por sus siglas en inglés) promueve la alimentación aún en el periodo de luz, donde la ingesta basal es por naturaleza baja. Mahler y su equipo (2007), también reportaron un incremento en la ingesta de alimento, el número y duración acumulada de los episodios de ingesta atribuido a la administración de AEA en NAcS en sus dos porciones en comparación con el grupo control. Adicionalmente, la activación de los rCB1 en la porción dorsal del NAcS, aumentó significativamente el número de gesticulaciones categorizadas como hedónicas al

consumir sacarosa, en comparación con la activación de la porción ventral del mismo núcleo. Es pertinente mencionar que en esta última porción también incrementaron las gesticulaciones con respecto a la condición control. En el análisis de la curva de gradientes de concentración reportaron un efecto similar a una *u* invertida, planteando que las dosis altas de AEA parecen suprimir las reacciones de agrado, adicionalmente se reportó que esta administración no generó cambios en las reacciones aversivas por un alimento no apetecible. Esta información concuerda con la disminución significativa en el consumo de alimento palatable, después de la administración intra-NAc del agonista inverso de los rCB1, Rimonabant, reportada por Guegan, y colaboradores (2013). Respecto a la actividad del rCB1 en el NAcS y de la CPF medial (CPFm), los autores mencionan que en estas estructuras se amplifican las señales hedónicas de la información sensorial reforzante, lo que ayudaría a explicar la sobre-ingesta de alimento exclusivamente palatable, retrasando la expresión de saciedad.

Los cambios conductuales reportados por Guegan y su equipo (2013) involucran procesos en la comunicación celular donde propusieron la participación central de los rCB1. En sus resultados destacan que los sujetos KO de los rCB1 decrementaron las respuestas en los periodos de tiempo fuera, considerados en su modelo como una conducta de búsqueda por alimento palatable, los sujetos KO-rCB1 no lograron ser sensibles a las características hedónicas del alimento palatable a diferencia de los controles. En el análisis de la arquitectura conductual, ante la privación al 90% en RF1 y hasta el incremento del requerimiento de respuesta a RF5 en condición *ad libitum*, los sujetos KO-rCB1 disminuyeron significativamente la tasa de respuestas en comparación a los controles, además de relacionarse con la morfología de las neuronas espinosas medianas del NacS y *core*, mostrando un decremento en la expresión de las espinas delgadas en comparación con los controles. Estos cambios morfológicos no se presentaron en el grupo que recibía la misma cantidad de alimento palatable sin someterse al trabajo operante, ni con otro tipo de reforzador, lo que sugiere que

se requiere de la arquitectura conductual entre la contingencia de las respuestas y los reforzadores. Con esta evidencia teorizaron los autores que los rCB1 del NAc, modulan la comunicación celular que modifica el comportamiento, promoviendo la motivación de acuerdo a las características hedónicas y no por el contenido calórico de los alimentos, mediante cambios en la plasticidad estructural en áreas del sistema corticolímbico, que al modificarse la estructura de las espinas dendríticas también se modifica la comunicación en el circuito.

Las investigaciones clínicas en humanos han permitido evaluar bajo diferentes condiciones la expresión de los eCBs en plasma, en una configuración experimental se evaluó el tipo de alimento con el IMC. En sujetos sanos, la exposición a una dieta palatable aumenta significativamente los niveles de grelina y 2-AG, respecto a lo evaluado por la exposición al alimento isocalórico no palatable, lo que sugiere que estas moléculas modulan la recompensa y favorecen la conducta motivada, es decir que a mayor secreción logran anular la señal de saciedad y mantienen a la persona alimentándose por las propiedades hedónicas del alimento. Bajo esas mismas condiciones se observó una disminución en los niveles de AEA, y otras NAEs (Monteleone, et al., 2012). Cuando se realizó la evaluación en sujetos obesos, se reportó un incremento significativo en los niveles de 2-AG, que se correlacionó con el placer subjetivo reportado al consumir alimento palatable, además de encontrar la disminución de los niveles de AEA posterior a la exposición a la comida, seguida de un retorno a valores iniciales e inclusive un ligero aumento contrario a la disminución en pacientes normopeso, lo que sugiere una respuesta amplificada del SeCB, los niveles de ambas moléculas fueron significativamente mayores bajo el alimento palatable en comparación con dietas isocalóricas no palatables (Monteleone, et al., 2016).

La alteración del SeCB en sujetos obesos y obesos mórbidos se ha relacionado con alteraciones en la capacidad olfativa, que se ve reducida en comparación con las personas normopeso, lo que sugiere una alteración en la percepción del sabor, esencial para la

evaluación hedónica del alimento, que podría aumentar la búsqueda de las propiedades reforzantes en el consumo de alimentos palatables. Pastor y colaboradores (2016), reportaron que la capacidad olfativa correlacionó negativa y significativamente con el IMC, el porcentaje de grasa corporal y la concentración de 2-AG y de otros 2-AcG como el 2-linolil-glicerol (2-LG) y el 2-oleilglicerol (2-OG) plasmáticos en ayuno, así como con los niveles de triglicéridos y glucosa, que podrían afectar las señales de saciedad.

Sin embargo, la actividad del SeCB no solo es relevante en el desarrollo de la obesidad y los trastornos metabólicos asociados. Mediante la evaluación de las propiedades reforzantes de los estímulos, se le ha relacionado con TCAs. Monteleone y colaboradores (2005) obtuvieron muestras de sangre tomadas en ayuno de pacientes con anorexia nerviosa (AN) y encontraron un aumento en los niveles de AEA y una disminución en los de leptina, mientras que en pacientes con infra peso sin diagnóstico de AN, se reportaron niveles disminuidos de AEA y otras NAEs (Pastor, et al., 2016), lo que sugiere que el incremento en los niveles de AEA refuerza el comportamiento de inanición en personas con ese trastorno.

Los niveles elevados de AEA y leptina en plasma en ayuno, también se han relacionado con el trastorno por atracón (TPA), lo que podría favorecer la ingesta hipercalórica (Monteleone, et al., 2005). Adicionalmente, en pacientes con diagnóstico de TPA se observó un aumento en los niveles de AEA después de consumir su alimento favorito, mientras que los niveles de 2-AG disminuyeron progresivamente (Monteleone, et al., 2017), contrario a lo reportado en sujetos sin diagnóstico de TCAs (Monteleone, et al., 2012).

1.4 Corteza cingulada anterior

La corteza cingulada (CC) es una estructura límbica que se divide en tres regiones, anterior, media y dorsal. La corteza cingulada anterior (CCA) procesa la información ejecutiva sobre los posibles resultados (recompensa/castigo) de una conducta mediante la información proveniente de la corteza orbitofrontal (COF). Por su parte, la corteza cingulada media (CCM) integra la información proveniente de la CCA y de la corteza cingulada posterior (CCP). Esta última se involucra principalmente en el control y orientación propioceptiva.

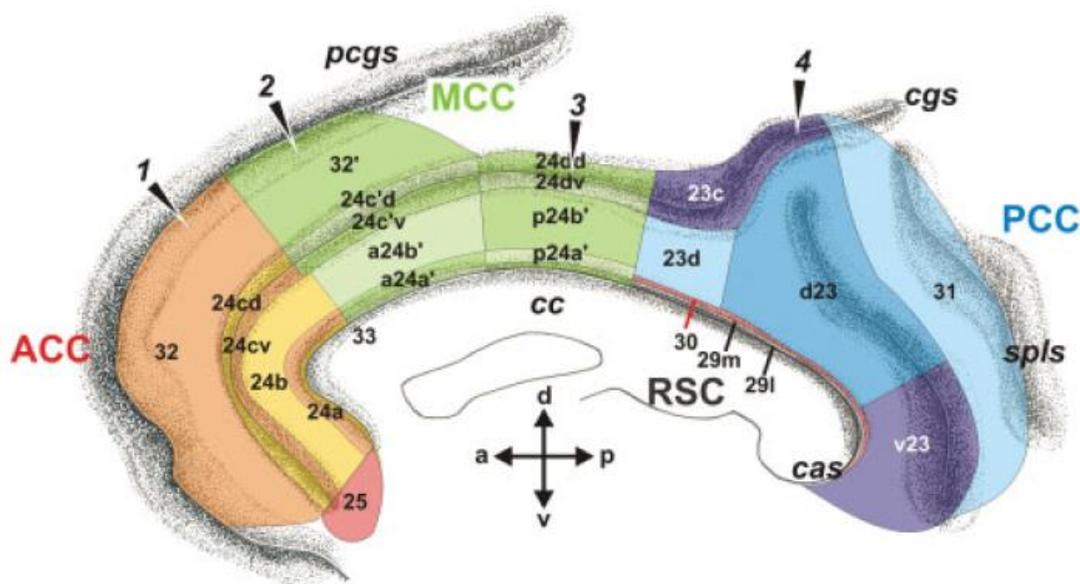
En conjunto la CC modula la actividad de regiones ejecutivas del cerebro (atención y movimiento), anticipando y señalando objetivos motivacionalmente relevantes, codificando valores de recompensa, señalando errores e influyendo en la respuesta motora. De esta manera participa en la asociación acción-resultado, para favorecer la selección de acciones óptimas considerando costo-beneficio y así poder producir acciones dirigidas a un objetivo. Adicionalmente, proporciona un puente que une las áreas neocorticales con el hipocampo, lo que permite recordar la información en la memoria episódica (Rolls, 2008, 2019).

1.4.1 Participación de la corteza cingulada anterior en la regulación emocional

La CCA ocupa el tercio anterior de la corteza cingulada y se divide principalmente en tres áreas, la pregenual (32 a.B.), subgenual (25 a.B.), estas subáreas con terminación *genu* hace referencia a la rodilla del cuerpo calloso, y la tercera área se subdivide en 24a, 24b, 24cv, 24cd. a.B (Ver Figura 6). Tiene conexiones con otras áreas límbicas, recibe información de la COF y la amígdala, envía eferentes a la CCM, CPFm, ganglios basales, estriado ventral, hipotálamo, ínsula, sustancia gris pericueductual del mesencéfalo, núcleo del tracto solitario, núcleo motor dorsal del vago y núcleo caudado (Rolls, 2008, 2019).

Figura 6

Regiones de la corteza cingulada



Nota. Los surcos, calloso, cingulado (cgs), paracingulado (pcgs) y esplenio se abrieron para mostrar áreas dentro de ellos. Las áreas CCA (33, 25, 24a, 24b, 24cv, 24cd y 32 áreas de Brodmann, a.B.) están representadas en rojo; áreas CCM (33, a24a', a24b', a24c'v, a24c'd, p24a', p24b', 24dv, 24dd) en verde; áreas CCP (23d, 23c, d23, v23, 31) en azul; y áreas RSC (29l, 29m, 30) en gris. Adaptado de "Receptor architecture of human cingulate cortex: evaluation of the four-region neurobiological model". (p. 2345), por Palomero-Gallagher, et al., 2009, *Human brain mapping*, 30(8).

Como otras áreas límbicas, la CCA se le relaciona con las emociones que podrían definirse como estados resultantes de recompensas y castigos (Rolls, 2008). Las regiones involucradas en la regulación emocional participan en el procesamiento de la recompensa o, dicho de otro modo, las respuestas emocionales son resultado de una recompensa o castigo

(Rolls, 2019). Se considera que la modulación de las respuestas emocionales intensas se da en una organización jerárquica de arriba hacia abajo, desde la corteza a áreas subcorticales. Se ha registrado una actividad preferente en la CPFm y la CCA durante la ejecución de una tarea con demanda cognitiva, frente a la actividad reportada en la amígdala; específicamente, se le ha relacionado a la CCA con el procesamiento emocional de tareas con alta demanda cognitiva (Phan, et al., 2002). Las lesiones en este núcleo deterioran la capacidad de las ratas para inhibir y redirigir el comportamiento en pruebas que demandan alterar la estrategia de ejecución, pero conservan la capacidad de adaptar su comportamiento después de experimentar el conflicto, lo que sugiere que la CCA participa en la modulación de la selección de conductas, inhibiendo y/o re-direccionándolas (Brockett, et al., 2020). También se ha reportado que la lesión de esta región en roedores perjudica el aprendizaje asociativo, afectando la selección de estímulos discriminativos y la expectativa sobre el reforzador, mientras que en humanos en evaluaciones de imagenología de pacientes diagnosticados con daño a este nivel mostraron apatía social, vocalización disminuida y cambios en el procesamiento emocional (Rolls, 2008, 2019).

La zona ventral de la CCA participa en la valoración del estímulo reforzante, mientras que la zona dorsal procesa el costo de las acciones necesarias para obtener la recompensa y su probabilidad, incluyendo las representaciones de las acciones requeridas para su ejecución. En conjunto, los elementos antes mencionados de la conducta motivada son reunidos en el proceso de aprendizaje conducta-respuesta, favoreciendo la planeación de acciones futuras dirigidas a una meta, ya sea para recibir una recompensa o evitar un castigo, en función de las experiencias almacenadas en la memoria episódica y en el costo del requisito conductual. Este procesamiento es constantemente evaluando, por ello es susceptible a la devaluación del objetivo, al error o a las condiciones de incertidumbre (Rolls, 2019). De esta manera se modula la actividad en las regiones de la CCP, vinculada con la guía del comportamiento, permitiendo

la rápida adaptación de la conducta como respuesta a cambios repentinos del entorno (Brockett, et al., 2020).

La información del valor de las conductas ejecutivas, como el objetivo, expectativa y resultado, es procesado por la COF. Posteriormente, la parte media de la COF envía información de la recompensa a la zona pregenual, mientras que su región lateral envía información de los estímulos aversivos a la región supracallosa (Rolls, 2008, 2019). También se ha relacionado la hipoactividad de la zona subgenual con la inducción de la tristeza por recuerdos y no por un estímulo actual, lo que sugiere que esta subregión se involucra con el procesamiento cognitivo y se ha encontrado que en pacientes con depresión clínica se ve aumentada la actividad de esta región ante el tratamiento farmacológico (Phan, et al., 2002).

1.4.2 Participación de la corteza cingulada anterior en la conducta alimenticia

La modulación del valor de la recompensa de un estímulo sensorial es una forma importante de controlar la conducta motivada, misma que a su vez está regulada por emociones. En el caso del comportamiento alimentario son cruciales las áreas cerebrales donde se evalúa el agrado y el valor afectivo de los estímulos olfativos, gustativos y visuales. La representación del sabor de la comida se procesa en la corteza gustativa primaria, estas áreas continúan con su funcionamiento basal incluso en estado de saciedad, por lo que siempre es susceptible de activación. Esta información se retransmite a la COF, donde se valora la recompensa y modulan las respuestas del gusto, a su vez, se envía esta información a la CCA en donde se rastrea y calcula la posible influencia de reforzadores, aprendizaje, y reversión (Rolls, 2008).

Diferentes reportes en los que se evalúa la actividad metabólica de la corteza cerebral en humanos con técnicas de imagenología, señalan que el área 32 de la CCA (pregenual) se relaciona con estímulos orales somatosensoriales agradables, es decir relacionados a la

recompensa. La activación de estas neuronas aumenta con el tipo de sabor preferentemente dulce, como de sacarosa, glucosa o jugo de frutas, también con el sabor a glutamato monosódico y quinina o con ciertas texturas grasosas. Esta región presenta un procesamiento de estímulos específico, por ejemplo, si se alimentan hasta la saciedad de un alimento con un sabor específico, disminuirán su respuesta solo ante ese sabor (Rolls, 2008). En cambio, la zona subgenual es la que se ha relacionado con el procesamiento de estímulos desagradables (Rolls, 2019).

Como se comentó anteriormente, el valor de un estímulo puede cambiar dependiendo del estado de motivación en el que se encuentre el sujeto, así, consumir agua cuando el sujeto previamente reportó sed, también correlaciona con la actividad de esta región del cerebro (Rolls, 2019). Sin embargo, en el caso de la textura de la grasa y el sabor de la sacarosa su valor recompensante proviene de señales sensoriales que indican la presencia de un valor energético elevado en una fuente de alimento (Rolls, 2008).

También se ha vinculado la función de la CCA con el sentido del olfato. Se reporta que la región más anterior se correlaciona con olores agradables, mientras que la región medial-posterior lo hace con olores desagradables (Rolls, 2008, 2019). Se encontró que la estimulación conjunta del olfato y el sabor promueven activaciones más intensas que por separado (Rolls, 2008) y que se relaciona linealmente el agrado subjetivo con la actividad por la percepción del sabor, la vista, y/o el olfato (Rolls, 2019). Además, se incluye un componente cognitivo, ya que el mismo olor promueve el aumento estadísticamente significativo de la actividad de esta región cuando se le etiquetó como queso cheddar, a diferencia de cuando tenía la etiqueta de olor corporal (Rolls, 2008).

Con base a la evidencia mostrada hasta este punto es posible vincular la actividad metabólica de la CCA con el proceso complejo de aprendizaje relacionado a la representación

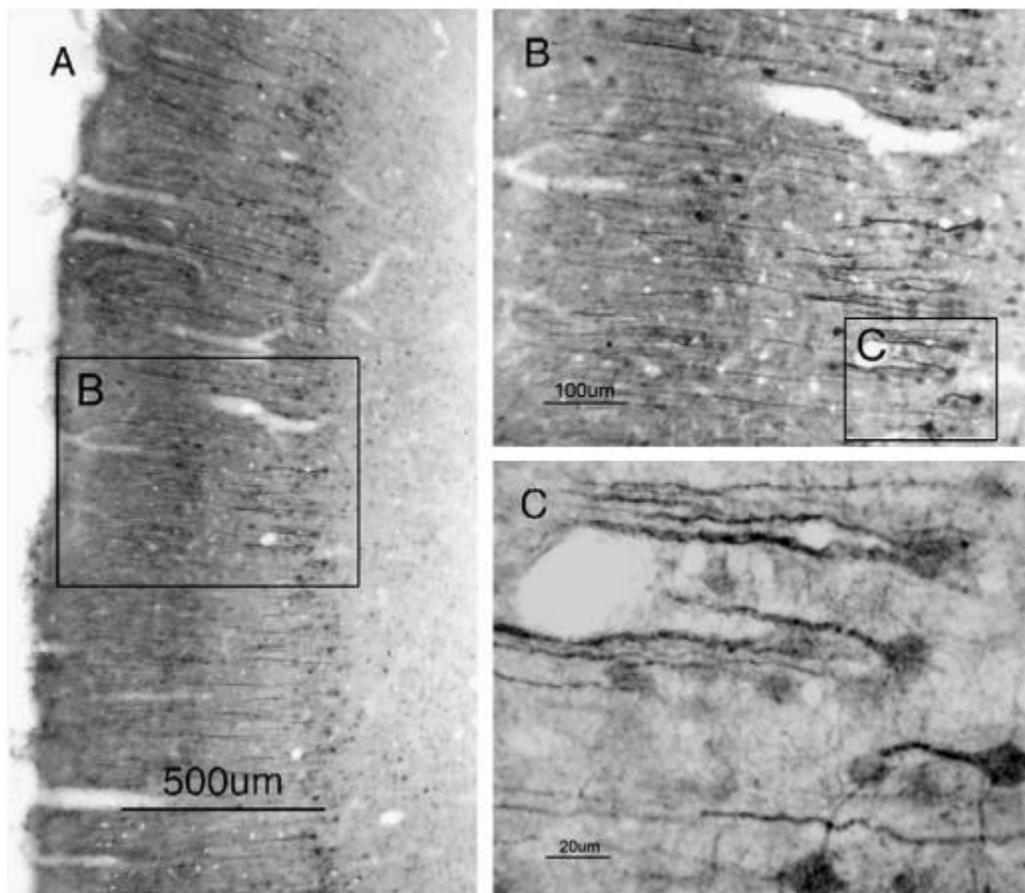
del valor de los estímulos gratificantes, la consideración en el costo de respuesta y su consecuente toma de decisiones, para poder evaluar los resultados obtenidos, particularmente en contextos donde se da la conducta alimenticia (Brockett, et al., 2020; Rolls, 2008, 2019), debido a que su activación se explica por el sabor, independientemente del hambre y se correlaciona con el agrado subjetivo (Rolls, 2008).

1.4.3 Receptores CB2 en la corteza cingulada anterior

Por medio de análisis con técnicas de inmunohistoquímica y de tinción inmunopositiva se reveló la presencia de los rCB2 en células gliales y en los somas y dendritas apicales de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza orbital, visual, motora y auditiva del encéfalo de rata adulta (Ver Figura 7) (Gong, et al., 2006).

Figura 7

Presencia de los rCB2 en la corteza.



Nota: Localización de rCB2 en la corteza, (A) vista de bajo aumento y (B y C) vista de mayor aumento. Adaptado de "Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain." (p. 16), por Gong, et al., 2006. *Brain Research*, 1071(1).

2. Planteamiento del problema

El sobrepeso y la obesidad constituyen serios retos de salud en México, ya que, a pesar de los esfuerzos de los últimos años, su prevalencia continúa en aumento en el país. La última Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2021) reportó la expresión de estas condiciones a edades cada vez más tempranas, el 6.5% de los bebés menores de un año ya presenta sobrepeso u obesidad, mientras que en los infantes de uno a cinco años el 8.3% se encuentran en la misma situación; respecto a los niños mayores y adolescentes, se reportó que más de la tercera parte de cada grupo presentaba sobrepeso u obesidad (37.4% entre 5 y 11 años, y 42.9% de 12 a 19 años), aunque la cifra más alarmante fue que el 72.4% de los mexicanos mayores de 20 años padece una de estas condiciones. Otro tema de alarma es que la presencia de sobrepeso u obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de patologías crónicas degenerativas como, la diabetes tipo 2 (considerada la primera causa de muerte en México) (Secretaría de Salud, 2016), para la hipertensión arterial, dislipidemias, enfermedades cardiovasculares, osteoarticulares, ciertos tipos de cáncer, incluso también para el desarrollo de un cuadro severo de COVID-19. En conjunto estas enfermedades merman la calidad de vida de quienes lo padecen y generan una fuerte carga económica al sistema de salud, el cual podría estar en riesgo por tema de sostenibilidad, si es que la prevalencia del sobrepeso y la obesidad siguen en aumento (Kánter, 2021).

Pese a que se han implementado diversas políticas de salud como tratamiento y prevención, los resultados no han sido favorables, ya que el número de casos sigue en aumento. Por lo anterior, resulta necesaria una mejor comprensión de las causas fundamentales del comportamiento que promueve la ganancia de peso excesivo, para favorecer la aplicación de medidas adecuadas que lleven a una solución del problema.

El SCB es considerado un potencial blanco terapéutico, ya que se ha mostrado que existe una relación entre la alteración de este sistema y los patrones de comportamiento que

favorecen la alimentación hedónica y la sobreingesta, resultando con frecuencia en una mayor acumulación de tejido adiposo, aumentando las probabilidades de padecer sobrepeso u obesidad. Aunque inicialmente las investigaciones clínicas se centraron en el tratamiento con el agonista inverso de los rCB1, Rimonabant, su venta fue suspendida poco después debido a la evaluación del riesgo/beneficio, ya que aunque reportaba una reducción en el peso corporal, la circunferencia de cintura, así como mejoras en el control glucémico y en el perfil lipídico, también originaba serios efectos secundarios adversos, principalmente psiquiátricos como ansiedad, depresión, agitación, irritabilidad, agresividad, insomnio e ideación suicida (Moreira y Crippa, 2009). Este hecho fomentó la búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas eficaces y seguras, una de ellas la investigación de los rCB2, que ha reportado participar en los procesos de regulación de la ingesta alimenticia.

Investigar la participación de los rCB2 en un área anatómica clave para la regulación del comportamiento alimentario, particularmente de sus componentes hedónicos y reforzantes, es de gran interés para comprender mejor uno de los factores que contribuyen con la ingestión de alimento hipercalórico que puede incrementar la ganancia de peso corporal. La evidencia de las relaciones funcionales entre la CCA con el circuito de la recompensa y la regulación emocional, además de la expresión de los rCB2, permite hipotetizar que la actividad de estos receptores es relevante para la regulación emocional mediante la evaluación del valor motivacional del estímulo alimentario. En consecuencia, en este trabajo se proponen los siguientes:

2.1 Objetivo general

Evaluar la participación de los rCB2 en la CCA de rata sobre la motivación por alimento palatable y el consumo libre de agua.

2.2 Objetivos específicos

1. Establecer un paradigma operante para evaluar la motivación por el alimento palatable en ratas por medio de programas de reforzamiento de razón fija (RF) y progresiva (RP).
2. Evaluar la motivación por alimento palatable mediante la activación farmacológica con el agonista selectivo de los rCB2 el GW405833 intra-CCA en ratas.
3. Evaluar el consumo libre de agua posterior a la activación farmacológica de los rCB2 en la CCA en ratas.

2.3 Hipótesis

La activación farmacológica de los rCB2 intra-CCA disminuirá la motivación por el alimento palatable, además de disminuir el consumo libre de agua.

3. Método

3.1 Sujetos

Se utilizaron 40 ratas macho de la cepa *Wistar* ingenuas experimentalmente, con un peso inicial de entre 190-220 g, de las cuales 23 recibieron algún tipo de tratamiento farmacológico, y de estas, 15 se integraron en el análisis estadístico por acertar en el sitio intra-CCA, 12 más fallecieron antes de terminado el modelo y, por último, se usaron 5 ratas para estandarizar las coordenadas estereotáxicas para las cirugías. Los sujetos fueron proporcionados por el Bioterio General de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Se alojaron individualmente en cajas habitación, en el bioterio del laboratorio de Neurobiología de la Alimentación de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria de Ciencias de la Salud y Educación, las condiciones de mantenimiento fueron los estándares para la especie, con una temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, en un ciclo de luz/oscuridad de 12 x 12 horas apagándose las luces a las 9:00 pm. Los sujetos tuvieron libre acceso al alimento estándar y agua corriente durante el período de habituación y en los días de descanso, una vez comenzado el modelo se restringió el acceso al alimento o agua previo a las sesiones de entrenamiento conductual como se indica más adelante. Los procedimientos experimentales de este estudio cumplieron con lo señalado en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) que contiene las especificaciones técnicas para la producción, cuidado, y uso de animales de laboratorio.

3.2 Dietas

La dieta estándar de laboratorio fueron pellets para roedores desarrollados por *Labdiet*, modelo 5010 *Autoclave rodent diet*, con una composición dietética de 23% de proteína cruda, 4.5% de grasa cruda, 6.0% de fibra cruda, 8.0% de ceniza y 12.0% humedad, con un aporte calórico total de 4.17 kcal/g.

Los estímulos reforzantes que se emplearon en las sesiones de entrenamiento conductual inicialmente fueron pellets de sacarosa con sabor a chocolate (*Dustless Precision Pellets*®, 45 mg, *Sucrose, Chocolate flavor, Bio-Ser, Product #F0025*) con una composición dietética de 0.2% de proteína, 0.6% de grasa, 1.5% de ceniza, <5% de humedad y 94.3% de carbohidratos, con un aporte calórico total de 3.83 kcal/g, aunque debido a su desabasto por la dificultad en su importación durante la contingencia sanitaria por el SARS-CoV-2, fueron reemplazados por una solución de sacarosa al 7.5% preparada en el laboratorio cada reforzador era una gota de 20 µL, con un aporte calórico de 4 cal/g.

3.3 Aparatos

El entrenamiento y evaluación de la conducta motivada por el alimento palatable, se realizó en cajas operantes tipo Skinner en la configuración para rata (Modelo ENV-022V, *Med Associates*®) fabricadas en aluminio y acrílico, con atenuación de luz y sonido, equipadas con ventiladores para proporcionar aire fresco y ruido blanco, iluminación general, dos palancas retractiles, sobre las cuales se encuentran dos luces que se emplearon como estímulos discriminativos y dispensadores automatizados de alimento sólido y líquidos ubicados entre las dos palancas. Se registraron automáticamente las respuestas de las ratas y los reforzadores otorgados en cada ensayo al interior de la caja, a través de una interfaz conectada a un computador en el que se le cargó el *software* MED-PC-IV® que ejecutaba los diseños experimentales y registraba las entradas y salidas, previamente se diseñaron los programas.

3.4 Entrenamiento conductual

Para desarrollar el aprendizaje asociativo entre el estímulo discriminativo, la emisión de la respuesta (operante) y el estímulo reforzante, se realizó una fase de pre-entrenamiento. Las

primeras dos sesiones en la que los sujetos interactuaron por primera vez con la caja operante, estuvieron en un programa de *operante libre* durante 30 minutos, la rata podía explorar el lugar, mientras el programa mostraba aleatoriamente los estímulos incondicionados de encender y apagar la luz general, las luces asociadas a las palancas, expulsar y retraer las palancas, el tono, además de la emisión del estímulo reforzante, el pellet o gota de agua azucarada. Este procedimiento ayudó a formar las contingencias entre los estímulos incondicionados, la operante, y el reforzador, en caso de que alguna rata no estableciera la asociación entre estímulos, se le entrenaba por un máximo de 2 sesiones en un programa de moldeamiento por *aproximaciones sucesivas*, este procedimiento se realizó sin el uso del programa MED PC-IV®, se descartaron del estudio a las ratas que pasado este periodo de entrenamiento no establecieron el aprendizaje asociativo. El estímulo discriminativo para la emisión de la operante, fue la luz sobre la palanca activa.

En la fase de entrenamiento conductual se sometieron a los sujetos a tres programas de reforzamiento, con requerimientos distintos, todas las sesiones se realizaron 4 horas después de iniciado el ciclo de luz, los experimentos se llevaron a cabo de lunes a viernes manteniendo el registro del peso corporal así como el consumo de alimento y agua, para motivar a las ratas a trabajar en el entrenamiento se les mantuvo privadas de agua desde el domingo y hasta el jueves, al 90% de su peso corporal con respecto al mantenimiento *ad libitum* de los días de descanso.

El primer programa fue el de razón fija 1 (RF1). En este se requirió de una sola respuesta para la entrega de un reforzador, los sujetos se mantuvieron en el programa hasta alcanzar la estabilidad en la tasa de respuesta, determinada en nuestro modelo con una variabilidad de máximo el 20% por tres días consecutivos. Los animales que demoraban más tiempo que el promedio del grupo en alcanzar la estabilidad de respuesta, pasaban una o dos sesiones bajo el programa RF3, en donde se le requerían 3 respuestas por un reforzador, posteriormente pasaría al de RF5 que demandaba 5 respuestas para la entrega del reforzador,

y se presentó hasta por 5 sesiones, dependiendo de la estabilidad en la conducta de la rata y del grupo. Alcanzados estos objetivos conductuales los sujetos fueron sometidos a una cirugía esterotáxica.

Posterior al tiempo de recuperación post cirugía, se retomó el entrenamiento, considerando el repertorio conductual, solo se dedicó una sesión al programa RF1, otra más al de RF3, para pasar al de RF5 donde se requirió la estabilidad en la emisión de la respuesta. En la parte final del entrenamiento, se aplicó un programa de RP, en donde la demanda de respuestas solicitadas para brindar un reforzador crece progresivamente en cada ensayo de la misma sesión, siguiendo una secuencia logarítmica que se derivó de la siguiente ecuación:

$$\text{Razón de respuestas (redondeada al entero más cercano)} = [5e^{(\text{número de ensayo} \times 0.2)}] - 5.$$

La serie resultante es 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, 268, 328, 402, 492, 603... (Richardson y Roberts, 1996). El criterio para finalizar la sesión de RP fue que el animal no recibiera un reforzador por 6 minutos, las ratas se mantuvieron en este programa por 3 sesiones antes de pasar a la fase de evaluación farmacológica con administraciones intra-CCA.

3.5 Cirugía esterotáxica

Las ratas fueron profundamente anestesiadas con ketamina y xilacina (112.5 mg/kg y 22.5 mg/kg i.p.), para implantarles estereotáxicamente una cánula de microinyección (23 G, 13 mm de longitud), intra-CCA con las coordenadas anteroposterior +2.7 mm, lateromedial -0.4 mm con relación a Bregma, y dorsoventral -1.5 mm con relación a la duramadre. Posterior a la cirugía se les administró Enroxil ® penicilina benzatinica (300,000 µl/Kg im) para prevenir infecciones y como parte de los cuidados post-operatorios se administraron dos dosis

adicionales con un día de descanso entre cada aplicación. El periodo de recuperación fue variable, bajo el criterio de alcanzar el peso corporal reportado antes de la cirugía, con un mínimo de 3 días posteriores a la misma, durante este tiempo se mantuvo a las ratas en condiciones *ad libitum* de agua y alimento además de descansarlas de las sesiones de entrenamiento operante.

3.6 Fármacos

La herramienta empleada para la activación de los rCB2, fue el agonista sintético GW405833 (Clorhidrato de 1-(2,3-diclorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-(3-(morfolin-4-il)etil)-1H-indol) selectivo de los rCB2 ($K_i = 3,6$ nM), para el bloqueo de los rCB2 se utilizó el AM630 (6-yodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il](4-metoxifenil)metanona) agonista inverso selectivo a rCB2 ($K_i = 31,2$ nM), y como control de la actividad de los rCB1 se eligió el AM281 (1-(2,4-Diclorofenil)-5-(4-yodofenil)-4-metil-N-4-morfolinil-1H-pirazol-3-carboxamida) antagonista rCB1 ($K_i = 14$ nM). Todos los compuestos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) y posteriormente diluidos con solución salina al 0.9% (la solución final fue 5% de DMSO). Todos los fármacos fueron adquiridos en *Sigma Chemical Co.* (Toluca, México). Los volúmenes de inyección intra-CCA fueron de 0.5 μ l a un flujo de 0.2 μ l/min, se esperó un minuto adicional por el remanente que pudiera haber quedado. Las soluciones fueron preparadas el mismo día de la administración.

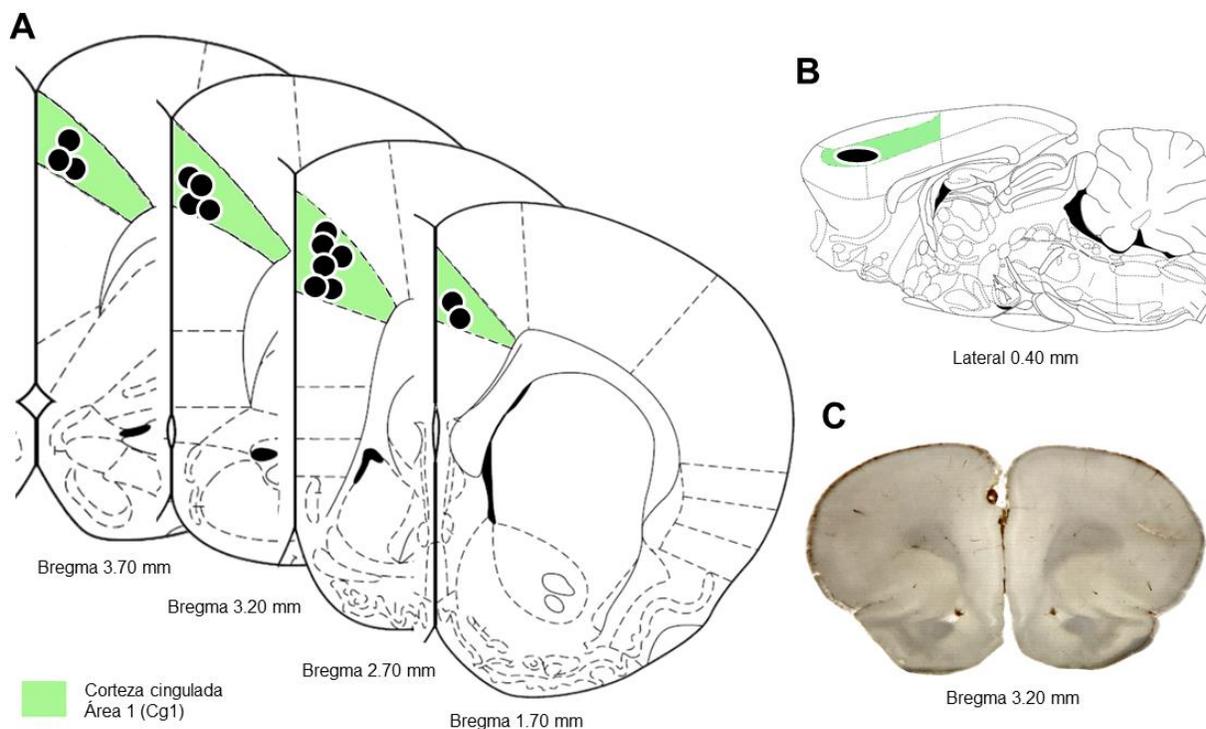
3.7 Histología

Al finalizar las evaluaciones conductuales, las ratas recibieron una dosis letal de pentobarbital sódico, se extrajeron los cerebros y se mantuvieron en formaldehído al 10% por al menos un día, posteriormente se seccionaron coronalmente a 250 μ m, las rebanadas se

examinaron para verificar la posición de la cánula. Los sujetos administrados fuera de la CCA no fueron contemplados en los análisis estadísticos (Ver Figura 8).

Figura 8

Representación esquemática de los sitios de inyección en la CCA.



Nota. A) Representación esquemática de los sitios de inyección intra-CCA en diferentes cortes coronales, B) Representación esquemática del sitio de inyección intra-CCA en un corte sagital, C) Imagen de un corte coronal en donde se observa el sitio de administración. Las zonas en verde representan la corteza cingulada área 1 (Cg1).

3.8 Análisis estadístico

Para determinar la significancia de la diferencia entre los valores del número de sesiones en programas de entrenamiento (RF1 y RF5), los datos conductuales de la

estandarización, evaluación y sus datos normalizados (número de respuestas, número de palanqueos, tasa de respuesta), los registros de consumo libre de agua de la evaluación y el segundo experimento (primera, segunda hora y el consumo acumulado, según el caso), se analizaron mediante una ANOVA de una entrada y cuando fue apropiado se empleó la prueba *post hoc* de Tukey. Mientras que la comparación de resultados conductuales de los dos grupos con intervalo de espera diferentes, del segundo experimento (número de respuestas, número de palanqueos, tasa de respuesta), se evaluaron a través de un ANOVA de dos vías seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni cuando $p < \alpha$. El criterio aplicado para determinar la significancia estadística de las diferencias fue de $\alpha = 5\%$.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa GraphPad-Prism® al igual que las gráficas reportadas en los resultados, mientras que las figuras mostradas en la introducción fueron modificadas mediante BioRender®.

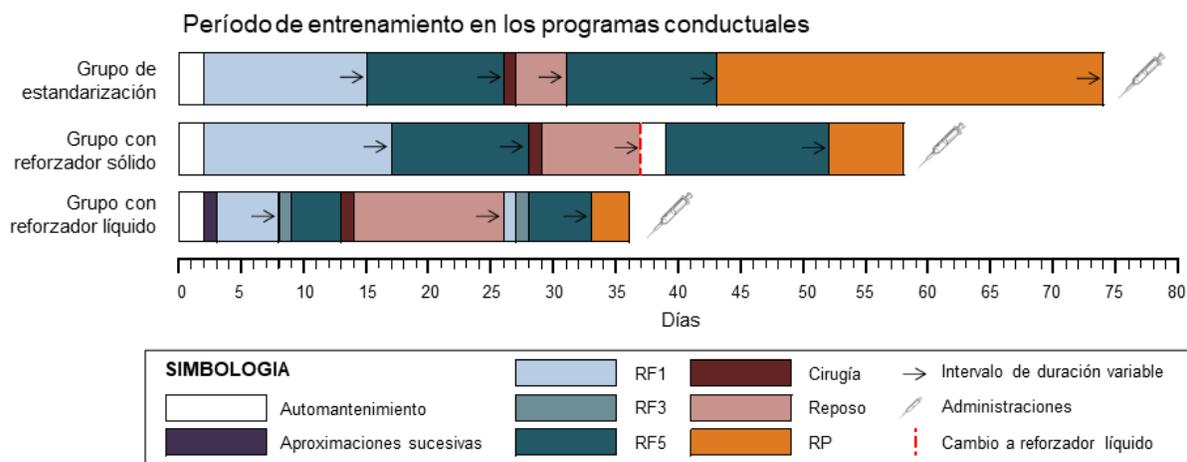
4. Procedimiento

4.1 Protocolo experimental

La investigación consistió de tres fases: 1) *estandarización*, en donde se obtuvieron resultados preliminares, a partir de los cuales se realizaron modificaciones en el protocolo para hacerlo más eficiente, 2) *grupo con reforzador sólido*, el entrenamiento se dio con reforzador sólido, pero debido al desabasto en los insumos, se cambió la naturaleza del reforzador empleado después de la cirugía esterotáxica, con base a los resultado de este grupo se realizaron modificaciones adicionales en la metodología, y por último 3) el *grupo con reforzador líquido*, al que se aplicaron los cambios propuestos. La comparación de los periodos y programas utilizados en cada fase se observa en la figura 9.

Figura 9.

Representación esquemática de las fases en los programas conductuales.



Nota. Comparativo del entrenamiento conductual para cada grupo, el intervalo marcado para cada programa o procedimiento representa el promedio de días que el grupo pasó en cada uno.

Las flechas (→) sobre un período, indican que su duración es variable por algún requerimiento, en el caso de los programas conductuales, la estabilidad del 80% en la conducta y para el tiempo de reposo post-cirugía, el peso corporal reportado antes de la cirugía.

La estandarización de coordenadas para la cirugía esterotóxica, se realizó contemporáneamente al inicio del entrenamiento conductual del primer grupo, se emplearon 5 ratas con un peso entre 250-270 g, anticipando que ese sería el peso aproximado de los sujetos al momento de la cirugía. Las coordenadas iniciales fueron calculadas con *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos y Watson, 1986), se operó a una rata y posteriormente se sacrificó para hacer la revisión histológica del sitio de canulación, se hicieron las correcciones necesarias de acuerdo al mismo atlas, se repitió el procedimiento hasta obtener el resultado deseado. Las coordenadas finales se indican en el apartado de cirugía esterotóxica.

Referente al grupo de *estandarización* de la metodología, constó de 9 ratas machos, se registró su peso corporal diariamente, así como el gramaje del alimento y agua que consumieron, para facilitar la adquisición adecuada de la operante se privó a los animales de alimento sólido, manteniéndolos al 90% de su peso reportado en condiciones *ad libitum*, a excepción del periodo de recuperación post-cirugía con libre acceso.

Las sesiones conductuales de entrenamiento operante se realizaron los 7 días de la semana, se emplearon pellets de sacarosa como reforzador, el proceso inició con 2 sesiones de *operante libre*, seguidas por la aplicación del programa RF1, en donde se requería la estabilidad en la conducta para poder pasar al programa de RF5, en donde nuevamente se requería la estabilidad en la conducta para poder implantar la cánula intra-CCA mediante una cirugía esterotóxica como fue descrita en su apartado. Una vez cumplido el criterio para el periodo de recuperación, los sujetos retomaron las sesiones conductuales bajo el programa RF5, donde se requirió la estabilidad en su conducta, para comenzar con las sesiones del

programa RP, en el cual nuevamente se requirió de la estabilidad en la conducta para poder finalizar el entrenamiento y comenzar con las administraciones.

Esta fase constó de 7 sesiones, comenzaba con la *simulación de la inyección*, que consistía en realizar el proceso de insertar el catéter en la cánula, esperar 3 minutos, sin administrar ninguna solución, retirar el catéter y 15 minutos después comenzar con la prueba conductual, a la siguiente sesión se comenzó con las administraciones programadas siguiendo el orden de un cuadro latino (Ver Tabla 3) con un día de descanso entre cada una, el tiempo de espera entre la administración y el inicio de la prueba operante fue distinta para cada fármaco, en la inyección del vehículo (grupo control) y el agonista se esperó 15 minutos para comenzar con las pruebas operantes, en el caso de los antagonistas (AM630 y AM281) fue un tiempo de espera de 30 min, las co-administraciones se realizaron de la siguiente manera: inyección del antagonista, 15 minutos después se administró el GW405833 y después de 15 minutos adicionales se comenzó con la prueba operante (Ver Figura 10).

Tabla 3.*Cuadro latino*

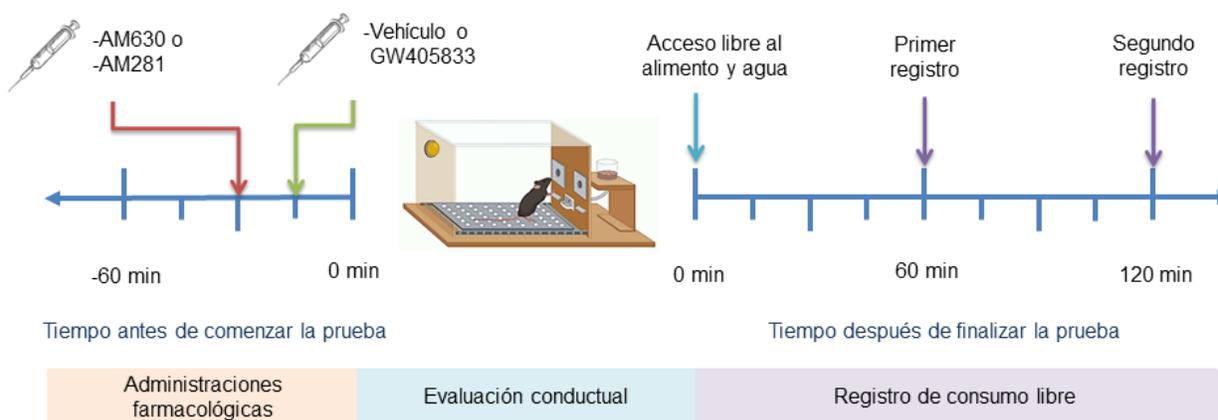
Sujeto	1° Adm.	2° Adm.	3° Adm.	4° Adm.	5° Adm.	6° Adm.
1	AM281 + GW405833	Vh	AM630	AM281	AM630 + GW405833	GW405833
2	GW405833	AM281	Vh	AM281 + GW405833	AM630	AM630 + GW405833
3	Vh	AM630	AM630 + GW405833	GW405833	AM281	AM281 + GW405833
4	AM630 + GW405833	GW405833	AM281 + GW405833	AM630	Vh	AM281
5	AM281	AM630 + GW405833	GW405833	Vh	AM281 + GW405833	AM630

Nota. Representación de la asignación de administraciones con el criterio establecido en el cuadro latino.

Al finalizar la prueba conductual, que tenía una duración variable de acuerdo al desempeño del sujeto, se les llevó a su caja habitación individual y se les dio libre acceso al alimento y agua, previamente se pesaba el alimento y se volvía a pesar una y dos horas posteriores (datos no mostrados) (Figura 10). Una vez que se completaron las administraciones los sujetos fueron sometidos a eutanasia por sobredosis de pentobarbital sódico, y se revisaron histológicamente los sitios de administración, como se describe en su apartado.

Figura 10

Esquema de temporalidad entre la administración, la prueba conductual y los registros de consumo libre.



Nota. Representación de los tiempos de espera entre la administración y el comienzo de la prueba conductual, así como la programación del registro del consumo libre posterior a la sesión operante.

El segundo grupo, nombrado *grupo con reforzador sólido* se compuso por 12 ratas macho, que siguieron el procedimiento de la misma manera que el grupo anterior hasta el tiempo de recuperación post-cirugía, no se pudo retomar el entrenamiento conductual debido al desabasto en los reforzadores sólidos empleados, como alternativa se propuso reemplazarlos por una solución de sacarosa que pudiera ser preparada en el laboratorio. Para ello se evaluó la preferencia del gradiente de concentración de sacarosa, se probaron tres gradientes diferentes (2.5%, 5.0% y 7.5%) dos días cada uno, con un orden creciente de exposición, esto también ayudó a prevenir la neofobia en los sujetos. La concentración preferida fue la de 7.5%

(datos no mostrados), que se eligió como reforzador. Se retomaron las sesiones conductuales, ahora con el reforzador líquido, se comenzó con 2 sesiones de operante libre, posteriormente se aplicó el programa RF5, en donde se buscó la estabilidad en la conducta para poder pasar al programa de RP, en este último se eliminó el requerimiento de estabilidad en la conducta en los sujetos y sólo se les sometió a tres sesiones antes de comenzar las administraciones.

En esta ocasión posterior a la *inyección de simulación*, se programaron cuatro administraciones para cada sujeto, bajo el orden pre-asignado de un cuadro latino, con un día de descanso entre cada una, repitiendo los tiempos de espera entre la administración y el inicio de la prueba operante que se manejaron en el grupo anterior (Figura 10). Los sujetos fueron asignados a uno de dos grupos, ambos recibieron inyección de vehículo y GW405833, el grupo que evaluaba la participación de rCB2, recibió la administración de AM630 y AM630+GW405833, mientras que el grupo de rCB1 recibió AM281 y AM281+GW405833. Como con el grupo anterior, al finalizar la prueba conductual se evaluó el consumo libre, una y dos horas posteriores a su acceso, en esta ocasión de agua. Una vez terminadas las administraciones los sujetos fueron sacrificados y se realizó la revisión histológica de los sitios de administración.

El grupo con reforzador líquido se conformó por 14 ratas macho, en todas las sesiones tuvieron como reforzador la solución de sacarosa al 7.5%, el entrenamiento en los programas de reforzamiento positivo se llevó a cabo como se explica en el apartado con el mismo nombre.

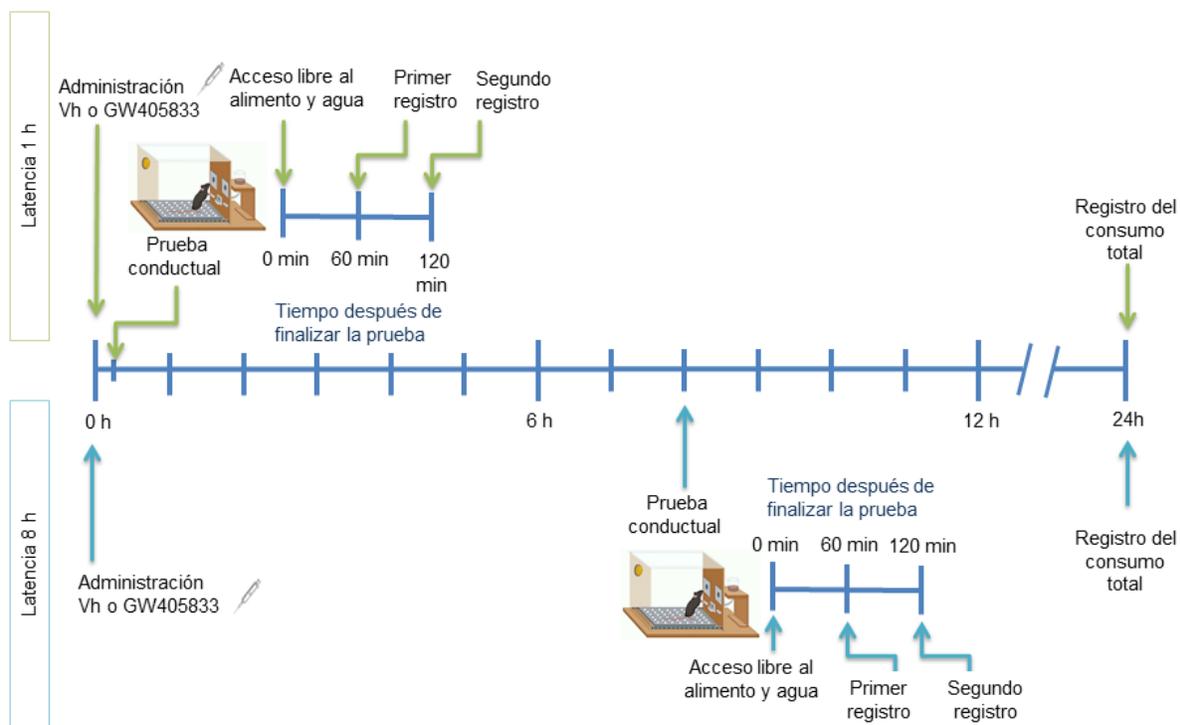
En la fase de administraciones, se realizó la *simulación de la inyección*, más cuatro inyecciones siguiendo el orden pre-establecido en un cuadro latino (Vh, GW405833, AM630, AM630+GW405833), con dos días de descanso entre cada inyección, repitiendo los tiempos de espera manejados en los grupos anteriores. Al finalizar cada una de estas sesiones el animal fue llevado a su caja habitación en condiciones *ad libitum* y se evaluó su consumo de agua corriente una y dos horas posteriores a su libre acceso (Figura 10).

Se realizó un segundo experimento con este grupo, pues se decidió comparar los cambios en la motivación por el alimento palatable con dos diferentes intervalos de espera entre la administración y el inicio de la evaluación conductual, 1 y 8 horas, con dos administraciones cada uno, vehículo y GW405833. La designación del fármaco y el tiempo de espera se hizo con base a un cuadro latino (Vh-15, GW405833-1 hora, vh-8 h, GW405833-8h). Todas las administraciones se realizaron al inicio de la fase de luz, por lo que las evaluaciones conductuales se realizaron durante la primera u octava hora de este ciclo, según el caso. Al tener programadas las administraciones se cuidó que los sujetos fueran restringidos de su consumo líquido 24 horas antes de su prueba conductual, manteniendo su peso al 90% del reportado en condiciones *ad libitum* y así no alterar los resultados por diferencias en el estado de privación.

Al finalizar cada prueba se evaluó el consumo de agua una y dos horas posteriores a su acceso, agregando el registro del consumo total de agua 24 horas posteriores a la administración del fármaco, como lo muestra en la figura 11.

Figura 11

Esquema de temporalidad para diferentes ventanas de espera.



Nota. Representación del protocolo experimental con latencia de 1 y 8 horas entre la administración y el comienzo de la prueba conductual, en ambos casos se evaluó el consumo libre de líquido una y dos horas posteriores al acceso libre que fue cuando finalizó la prueba conductual, y a las 24 horas de la administración.

Una vez terminadas las administraciones los sujetos fueron eutanizados y se realizó la revisión histológica de los sitios de inyección.

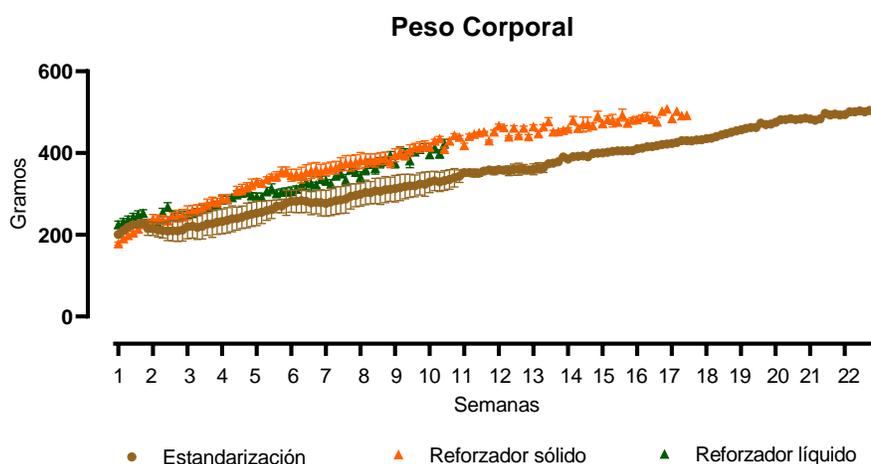
5. Resultados

5.1 Establecimiento del paradigma operante para evaluar la motivación por el alimento palatable en ratas por medio de programas de reforzamiento de razón fija y progresiva

Durante el desarrollo del paradigma se monitoreo el peso corporal de los sujetos (Ver Figura 12), para verificar que la restricción de alimento o agua se estuviera realizando adecuadamente, se observa un crecimiento paulatino y constante en cada uno de los grupos.

Figura 12

Registro de peso corporal



Nota. Peso corporal de los sujetos, comparando los grupos de estandarización, con reforzador sólido y líquido n=23, (Datos expresados en términos de media y desviación estándar).

Como parte de las modificaciones que se realizaron en la estandarización, hubo algunos ajustes del entrenamiento conductual, a la fase de adquisición de la conducta operante se agregaron sesiones de aproximaciones sucesivas para los sujetos que no lograban asociar la presión de la palanca con la recompensa, esta estrategia encadena la conducta inicial a conductas progresivamente más cercanas a la operante requerida hasta asociarla con la

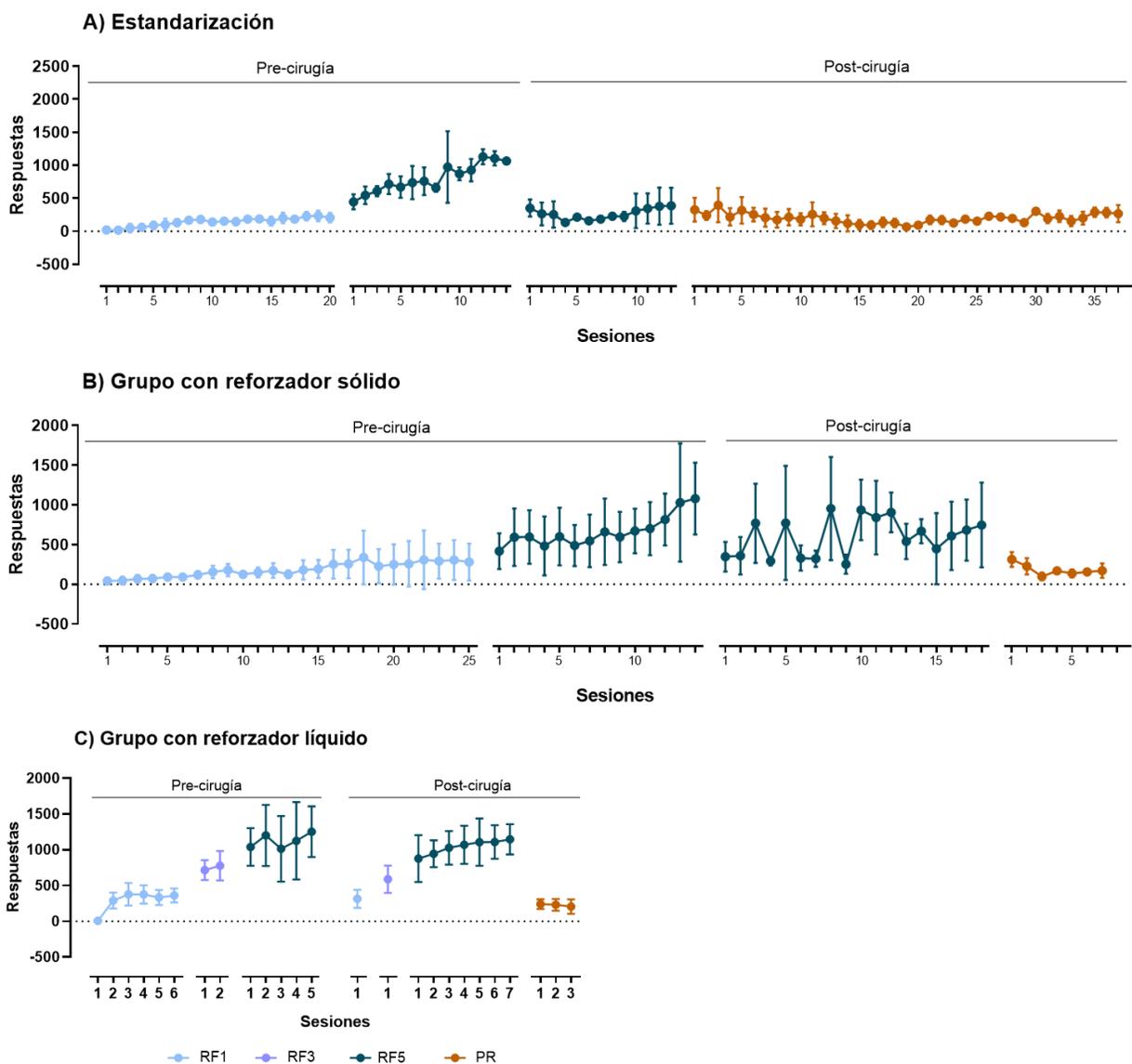
emisión del reforzador. También se propuso agregar sesiones de RF3 entre los programas RF1 y RF5 pre-cirugía, en el restablecimiento de la conducta operante post-cirugía, se comenzó con una sesión de RF1, otra de RF3 y después una serie de sesiones con RF5. Por último, se eliminó el requerimiento de respuesta para los programas RF5 pre-cirugía y post-cirugía en el programa de RP (Ver Figura 9). Respecto a las administraciones farmacológicas, se decidió evaluar exclusivamente la participación de los rCB2, eliminando la evaluación de los rCB1.

Otro elemento que se modificó en concordancia con la privación fue el registro del consumo libre de comida, cuando se privó de alimento y posteriormente al cambiar al reforzamiento líquido, se restringió el consumo de agua corriente y por lo tanto se registró el consumo libre de agua posterior a la prueba conductual. Con respecto a la frecuencia de las sesiones conductuales, en las primeras dos fases se realizaron los 7 días de la semana, mientras que, en la tercera fase, las evaluaciones se realizaron de lunes a viernes, permitiendo que las ratas tuvieran un periodo de descanso.

Por último, se logró reducir la duración del modelo aumentando la eficiencia en los periodos de entrenamiento conductual logrando con ello maximizar los recursos y mantener a las ratas el menor tiempo posible en experimentación. Al inicio de la estandarización, la duración promedio del modelo era de 74 días, mientras que para el *grupo con reforzador sólido* se logró reducir a 58 días, aunque en esta parte de la estandarización se tuvieron menos sesiones de entrenamiento, al realizar el análisis de la duración para cada programa se encontró que sólo el programa de RP tenía menor número de sesiones. El *grupo con reforzador líquido* tuvo la cifra más baja en el número de sesiones de entrenamiento, con 36 días de duración, es decir que se redujo poco más del 50% en comparación con la primera fase, y 38% menos con la segunda fase, la duración de cada programa también fue menor en comparación con ambas fases. En la figura 13 se muestra la comparación del número de respuestas en cada programa de reforzamiento que requería el cumplimiento del criterio estabilidad en la conducta, para cada grupo.

Figura 13

Registro de la respuesta conductual para cada programa conductual



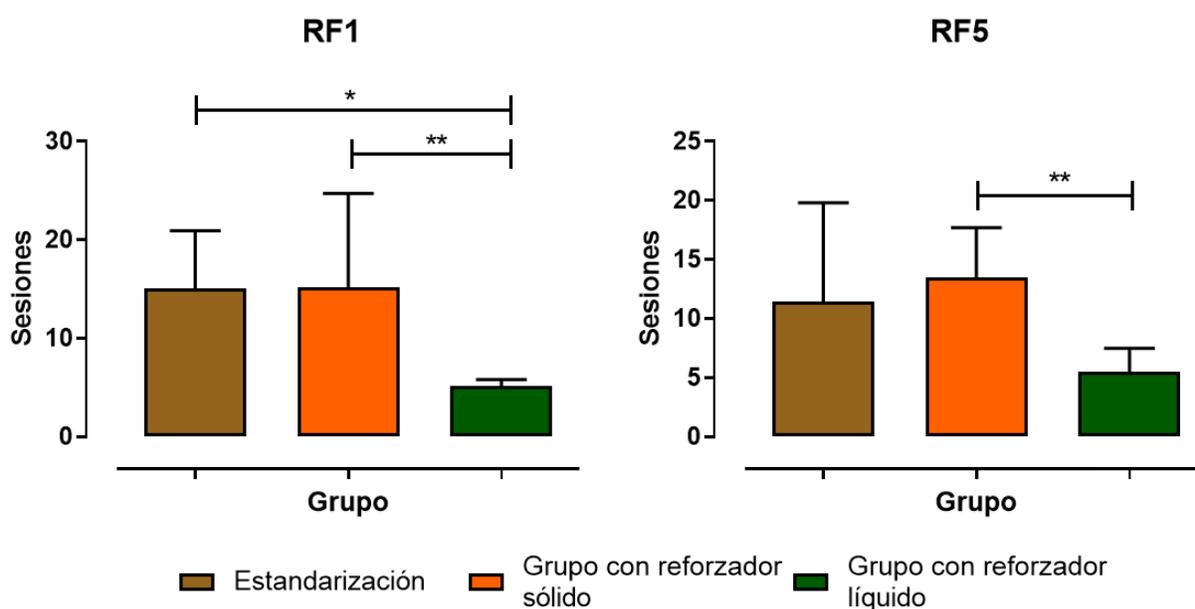
Nota. Número de respuestas obtenidas en los diferentes programas operantes del periodo de entrenamiento A) Estandarización (n=5), B) Grupo con reforzador sólido (n=7) y C) Grupo con reforzador líquido (n=11), (Datos expresados en términos de media y desviación estándar).

Referente a los programas que requerían estabilidad en la conducta para los tres grupos (Ver Figura 14), la comparación mostró que, bajo RF1 el grupo con reforzador líquido

redujo significativamente el número de sesiones en comparación con los grupos de estandarización y el grupo con reforzador sólido [$F_{(2,20)}=8.261$; $p=0.0024$], mientras que en el programa RF5 post-operatorio hubo una reducción significativa en el número de sesiones del grupo con reforzar líquido frente al que tuvo reforzador sólido [$F_{(2,20)}=7.035$; $p=0.0049$].

Figura 14

Comparativa del número de sesiones en cada programa conductual que requería estabilidad en la conducta.



Nota. A) número de sesiones bajo RF1, B) número de sesiones bajo RF5 post-operatorio, comparando los grupos de estandarización, con reforzador sólido y líquido $n=23$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, (Datos expresados en términos de media y desviación estándar).

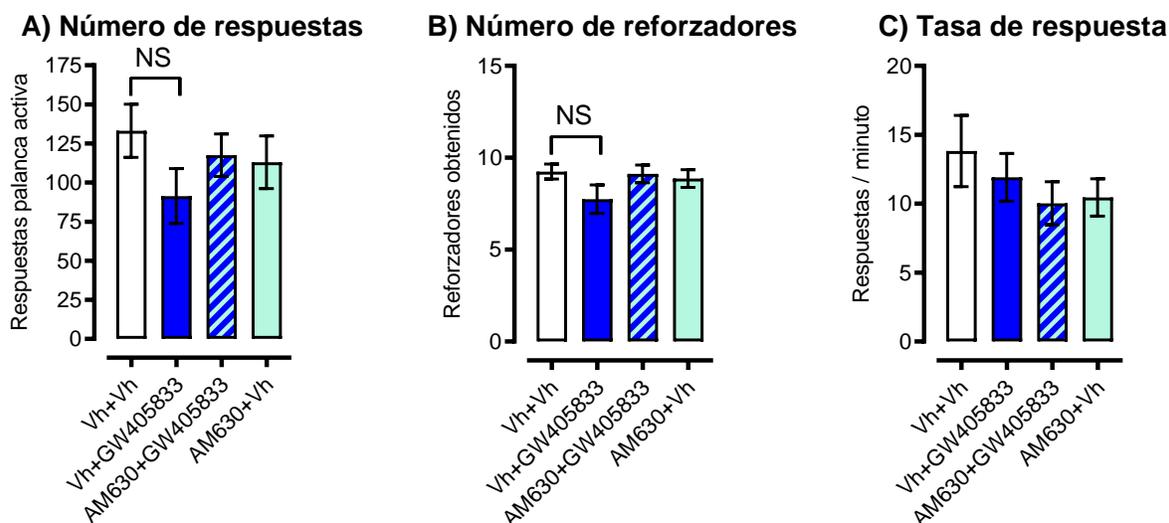
5.2 Evaluación de la motivación por el alimento palatable en ratas que recibieron la administración intra-CCA del agonista selectivo de los rCB2, GW405833.

Los resultados operantes obtenidos de las administraciones farmacológicas intra-CCA en la estandarización (datos no mostrados), no arrojaron diferencias significativas debido al bajo número de sujetos.

Los resultados de los estudios operantes donde se evaluaron los efectos de la activación farmacológica de los rCB2 sobre la motivación por el alimento palatable con el nuevo modelo estandarizado, mostró que la administración intra-CCA de GW405833 produjo una tendencia a disminuir el número de respuestas para obtener el alimento palatable en comparación con el grupo control, tendencia que se previno con la administración de AM630. En concordancia con lo anterior, el número de reforzadores obtenidos también tendió a disminuir con las microinyecciones del agonista de los rCB2. De la misma forma, el análisis de la tasa de respuesta mostró consistentemente la tendencia a disminuir sus valores cuando se activó farmacológicamente a los rCB2 en comparación con la administración del vehículo (Ver Figura 15).

Figura 15

Indicadores conductuales en el programa de razón progresiva.

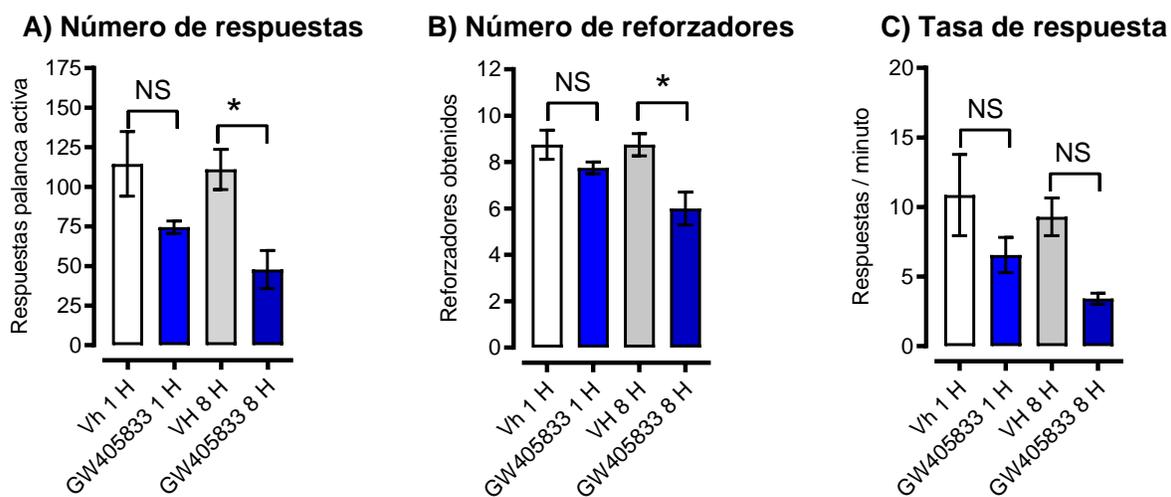


Nota. A) Número de respuestas, B) número de reforzadores, C) tasa de respuesta, obtenidos durante el programa de razón progresiva posterior a la administración de diferentes tratamientos, n=9. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, (Datos expresados en términos de media y desviación estándar).

El segundo experimento en donde se evaluó la motivación por el alimento palatable, una y ocho horas después de administrado el fármaco (Ver Figura 16), específicamente en el periodo de una hora no se encontró una disminución significativa en el número de respuestas, ni de reforzadores, solo una tendencia a disminuir con la activación de los rCB2, patrón que se repite al evaluar la tasa de respuesta. Para el periodo de ocho horas se observaron diferencias significativas con la administración del agonista de los rCB2 en el número de respuestas [$F_{(4,12)}=5.484$; $p= 0.0132$] y de reforzadores obtenidos [$F_{(4,12)}=5.667$; $p= 0.0118$] en comparación con el grupo control.

Figura 16

Indicadores conductuales en el programa de razón progresiva, con diferente ventana de espera.



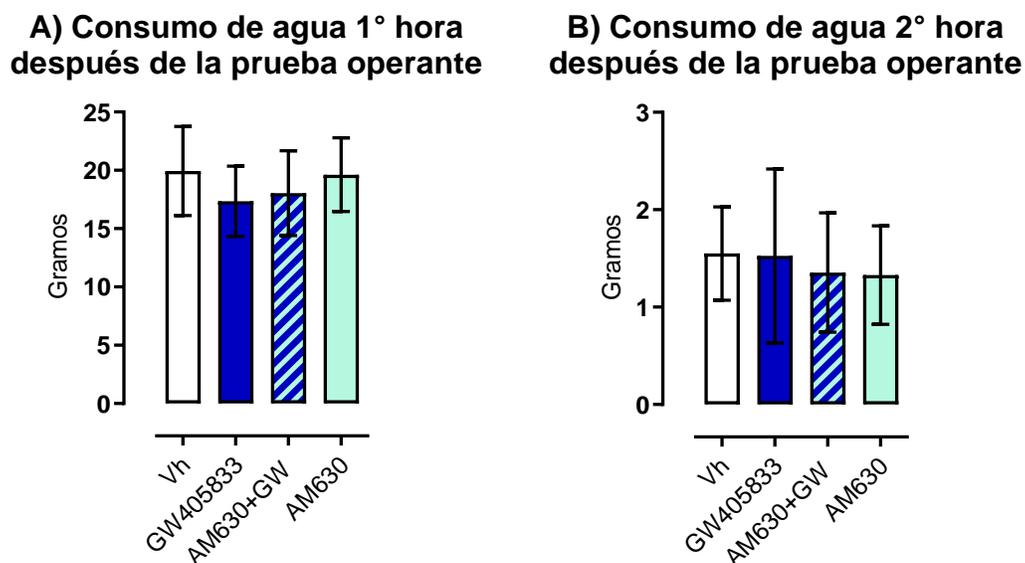
Nota. A) Número de respuestas, B) número de reforzadores, C) tasa de respuesta obtenidos durante el programa de razón progresiva posterior a la administración de diferentes tratamientos con latencias diferentes, $n=6$. * $p<0.05$, (Datos expresados en términos de media y desviación estándar).

5.3 Evaluación del consumo libre de agua con la activación farmacológica de los CB2 en la CCA en ratas.

Se evaluó el consumo libre de agua dos horas posteriores al fin de las sesiones de RP (Ver Figura 17), se observaron valores similares en el consumo durante la primera hora, por lo que el tratamiento con GW405833 no produjo efectos sobre el consumo de líquidos. El consumo de líquidos en la segunda hora disminuyó con respecto a la primera, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Figura 17

Consumo libre de agua posterior a la prueba conductual.



Nota. A) Consumo de agua la primera hora, B) Consumo de agua la segunda hora, obtenidos posterior al fin de la prueba conductual bajo diferentes tratamientos, n=9, (Datos expresados en términos de media y desviación estándar).

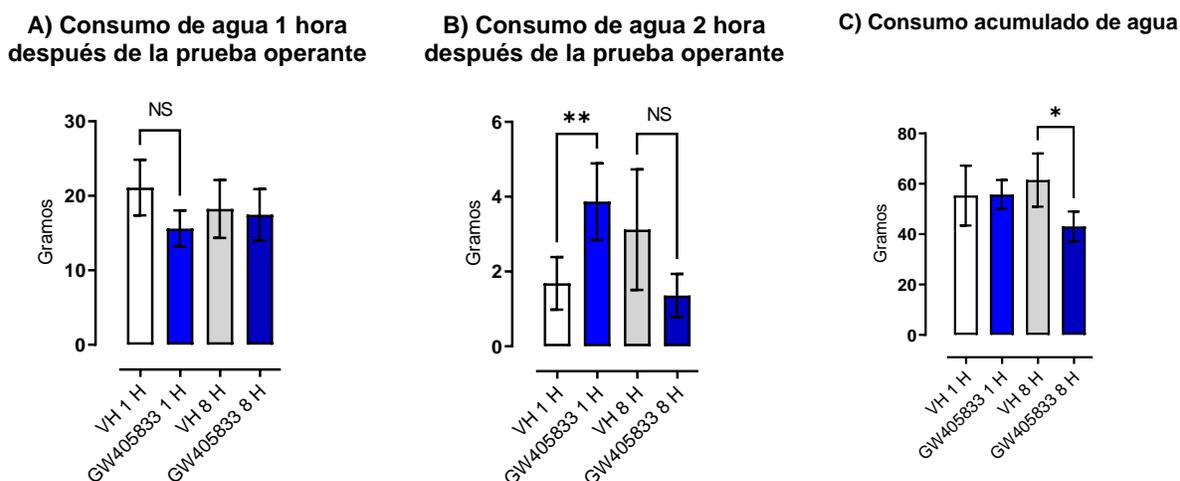
Cuando se realizó la evaluación del consumo libre de líquidos posterior a las administraciones y las evaluaciones conductuales en la primer y octava horas (Ver Figura 18), se encontró que el tratamiento con GW405833 no modificó significativamente el consumo libre de agua una hora posterior al acceso al líquido. Por el contrario, durante la segunda hora de consumo libre de líquidos con la administración de GW405833 se observó un aumento estadísticamente significativo en comparación con el grupo control [$F_{(3,18)}=7.278$; $p=0.0021$]. Al evaluar el consumo total de 24 horas después de la inyección en el grupo de espera de una hora, no se encontraron diferencias significativas.

En el grupo con periodo de espera de ocho horas se observó que durante la primera y segunda hora posterior al acceso a líquido no se hallaron diferencias entre la administración del

vehículo y GW405833. Únicamente al evaluar el consumo acumulado de líquidos a 24 horas después de la administración del fármaco, se halló una disminución estadísticamente significativa al activar a los rCB2 en comparación con su control [$F_{(3,18)}=3.727$; $p= 0.0303$].

Figura 18

Consumo libre de agua posterior a la prueba conductual, con diferentes ventanas de espera



Nota. A) Consumo de agua la primera hora, B) Consumo de agua la segunda hora, ambas después de la prueba operante C) Consumo acumulado de agua desde su acceso hasta las 24 horas de la administración del fármaco, obtenidos bajo el tratamiento de vehículo y GW405833, $n=6$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, (Datos expresados en términos de media y desviación estándar).

6. Discusión y conclusiones

6.1 Discusión

Los experimentos del presente estudio fueron diseñados para determinar, mediante un procedimiento operante, la contribución de los receptores CB2 de la CCA de la rata en la regulación de la motivación por el alimento palatable. Nuestro hallazgo principal indica que la activación de los receptores CB2 de la corteza cingulada anterior puede alterar el valor reforzante de una solución de sacarosa, disminuyendo el número de presiones a la palanca y la motivación por la solución endulzada ocho horas después de la inyección intracerebral del agonista de los receptores CB2, el GW405833. Este resultado es consistente con la hipótesis inicial de que la transmisión cannabinoide en la corteza prefrontal, particularmente de la CCA, tiene una función inhibitoria sobre los procesos neurobiológicos que promueven el consumo de alimento de agradable sabor.

En consistencia con otros reportes, nuestros resultados sugieren que la transmisión cannabinoide mediada por receptores CB2 podría inducir la activación de un mecanismo neuromodulatorio que produce cambios en el comportamiento en el mediano plazo, ya que las manipulaciones farmacológicas dirigidas a los receptores CB2 sólo muestran efectos sobre el consumo de alimento en un periodo de entre cuatro y doce horas posteriores a la administración de los fármacos. Tal es el caso del estudio de Werner y Koch (2003), quienes observaron un aumento del consumo de alimento cuatro y hasta seis horas posteriores a la administración intracerebroventricular de AM630 (un antagonista de los receptores CB2). De la misma forma, Onaivi et al. (2008), mostraron que ratones C57 con privación de alimento no presentan cambios significativos del consumo de alimento durante las primeras horas posteriores a la administración de AM630 y el efecto se observa hasta las doce horas posteriores al inicio de la prueba conductual. En conjunto, estos resultados sugieren que la acción moduladora de los receptores CB2 sobre la motivación por el alimento palatable podría iniciar procesos, aún no descritos, en los que la inhibición de las células que expresan al

receptor modifica la actividad del circuito de la recompensa en su totalidad. Investigaciones posteriores deberán establecer si los receptores CB2 inducen cambios que toman más tiempo en expresarse (i. e. cambios en la síntesis de proteínas) o bien si se trata de efectos indirectos mediados por blancos como el receptor activado por el proliferador de peroxisomas- γ (PPAR- γ) o bien produciendo cambios en la vía de señalización de la insulina en el cerebro (Youssef, et al., 2019).

Hasta donde tenemos conocimiento, nuestro grupo de trabajo es el primero en encontrar una relación moduladora entre los receptores CB2 de la CCA y la motivación por alimento palatable, ya que los reportes previos únicamente habían mostrado que la activación sistémica de los receptores CB2 reduce significativamente la motivación por una solución de etanol (Navarrete et al., 2018). A diferencia del efecto estimulador inducido por la activación de receptores CB1 en núcleos del circuito de la recompensa sobre las señales hedónicas y reforzantes de la información sensorial del alimento palatable (Cortés-Salazar, et al. 2014; Guegan et al, 2013), los receptores CB2 de la CCA parecen tener una función antagónica, es decir, inhiben el consumo y la motivación por el alimento de agradable sabor.

La capacidad de la CCA para vincular a una experiencia reforzante (recompensa en el sentido amplio del concepto) con el componente emocional de valencia positiva se fundamenta en sus relaciones anatómicas y funcionales con regiones límbicas como la COF, la amígdala, la corteza insular y el estriado dorsal (Rolls, 2008, 2019). De tal forma, la activación de los receptores CB2 en la CCA podría reducir la capacidad de los sujetos para emitir el comportamiento adecuado para recibir un estímulo reforzante (Brockett, et al., 2020), lo que explica en gran parte nuestro hallazgo de que los sujetos tratados con GW405833 presionan menos la palanca asociada a la entrega de la solución endulzada y, en consecuencia, tienen puntos de ruptura menores.

Existen reportes que apoyan la idea de que los receptores CB2 cumplen con una función inhibitoria del consumo de alimento y en la ganancia de peso corporal. Tal es el caso

del estudio de Ignatowska et al. (2011) donde mostraron que la activación sistémica y crónica de los receptores CB2 reduce significativamente el peso corporal en animales con alimentación libre de una dieta estándar de laboratorio. Paralelamente, lo anterior es consistente con los estudios con animales que no expresan receptores CB2, los cuales consumen más alimento con alto contenido de grasas, además de tener mayor peso corporal y más tejido adiposo (Agudo, et al., 2010).

6.1.1 Consideraciones sobre los procedimientos operantes para evaluar la motivación

En nuestro modelo se tomaron algunas consideraciones importantes sobre los procedimientos operantes para evitar variabilidad en el consumo del reforzador, por ejemplo, se estableció que todas las sesiones conductuales se realizaran dentro de las primeras horas de la fase de luz en el ciclo luz/oscuridad (12x12h). Adicionalmente, se estableció la condición de que los sujetos se mantuvieran en privación de alimento o agua, según el reforzador, durante la fase oscura. Con estas medidas se favoreció la saliencia del reforzador que ayudó a mantener la estabilidad de la tasa de respuesta en los programas de reforzamiento positivo (Reynolds, 1968), además de favorecer la ingesta en el modelo de alimentación libre que se aplicaba posterior a las sesiones de entrenamiento operante (Siegel, 1961).

De la misma forma, se tomaron en cuenta las recomendaciones metodológicas propuestas por García y colaboradores (2017) para los programas de RP, como contemplar fases en la asociación de la operante, comenzando con la de adquisición de la respuesta y culminando con el mantenimiento de la conducta. Fue importante usar como criterio de cambio la estabilidad de la operante, evitando la variabilidad en la tasa de respuesta mayor al 20% en las últimas tres sesiones (Killeen, 1978).

Al emplear como reforzador una solución azucarada ($H_2O+7.5\%$ de sacarosa), las ratas inicialmente mostraron dificultad para emitir la respuesta operante, retardando la aparición de la

estabilidad en la conducta, lo que ocasionó que se alargara el reentrenamiento post-cirugía. Basados en esta experiencia, se moldeó mediante aproximaciones sucesivas, como lo reporta Ferreira (2009) y también se re-entrenó a los sujetos con intervalos en los requerimientos de respuesta más cortos entre un programa y otro, adicionando un programa intermedio entre RF1 y RF5, quedando de la siguiente manera, previo a la cirugía las ratas debían pasar por RF1, RF3 y terminar en RF5. En la post-cirugía se implementó el mismo orden, permitiendo que con el incremento escalonado la demanda no fuera tan abrupta y el nivel de esfuerzo no representara una dificultad adicional (Ferreira, 2009), además permitió que los sujetos se prepararan para las demandas crecientes del programa RP (Lecca, et al., 2020).

El requerimiento de estabilidad en la conducta se eliminó en el programa de RF5 pre-cirugía al considerarse poco necesario, ya que la comprobación de la asociación entre el estímulo reforzante y la operante, se buscaría mediante la estabilidad en la tasa de respuesta (García, et al., 2017), bajo el programa RF5 post-cirugía. También se eliminó el requerimiento de estabilidad en la tasa de respuesta en el programa de RP, se decidió así, porque la prueba conductual no debería tener una estabilidad, sino simplemente expresar la conducta de acuerdo a la suma de factores del modelo, ya que el objetivo de este programa es evaluar el estado motivacional del sujeto y los posibles cambios que indujera la manipulación farmacológica (Bradshaw y Killeen, 2012). Sin embargo, para que los datos fueran comparables, se decidió dejar tres sesiones previas a las microinyecciones para el reconocimiento del programa.

Nuestros resultados confirmaron que las modificaciones antes mencionadas en el proceso de aprendizaje de la operante fueron efectivas, reduciendo tiempo del experimento y facilitando la consecuente evaluación de la motivación por el alimento palatable. Cabe mencionar que este reporte, funcionará para hacer más eficientes los modelos de autoadministración conductual reforzado por pellets o por una solución azucarada.

6.1.2 Limitaciones

No tenemos información de que el bloqueo farmacológico de los receptores CB2 de la CCA previene el efecto del GW405833 cuando se hace la evaluación conductual a las 8 horas de la administración intracerebral. Lo anterior implica que experimentos posteriores deberán aportar evidencia adicional de que el efecto aquí reportado cuenta con suficiente selectividad atribuible al receptor CB2.

6.2 Conclusiones

En suma, nuestros resultados nos permiten llegar a la conclusión de que la transmisión cannabinoide mediada por receptores CB2 de la corteza cingulada anterior cumple una función neuromodulatoria de carácter inhibitorio de los procesos que promueven la motivación de alimento palatable, particularmente de una solución endulzada. Debido a que no observamos efectos de la activación de los receptores CB2 de la CCA en la primera hora posterior a la administración del fármaco, es necesario diseñar estudios que permitan establecer los mecanismos, vías y regiones del circuito de la recompensa que son susceptibles de modulación por los receptores CB2.

6.3 Perspectiva y sugerencias

Las respuestas a los objetivos planteados en esta investigación, permiten plantear nuevas interrogantes referentes a la participación de los rCB2 en la regulación de la conducta alimentaria, para poder ampliar el conocimiento que favorezca la manipulación farmacológica como tratamiento para las conductas anómalas en torno a la alimentación, es necesario realizar experimentos en donde se evalúe farmacológicamente la participación de los rCB2 de la CCA, en diferentes momentos, es decir, después de la microinyección evaluar el efecto a los 15, 30,

60, 120, 240, 360, 720, y 1,440 minutos, en alimentación libre, para conocer el efecto de la farmacodinámica sobre la ingesta, además de observar la secuencia de saciedad conductual. Otro elemento que debería considerarse es evaluar procesos asociados a la motivación, como la impulsividad evaluada con la prueba del laberinto elevado en T, o con la prueba de condicionamiento por preferencia del lugar. Para el caso del circuito que creemos que está activándose desde la CCA, podría rastrearse la participación de los CB2 en núcleos en los que interviene el procesamiento de la saliencia de los reforzadores, como es el hipotálamo, el ATV, el Nac, y la amígdala.

7. Referencias

- Abbott, M., Binde, P., Clark, L., Hodgins, D., Johnson, M., Maniowabi, D., Quilty, L., Spångberg, J., Volberg, R., Walker, D., y Williams, R. (2018). *Conceptual Framework of Harmful Gambling: An International Collaboration*, (3a ed.) Gambling Research Exchange Ontario (GREO). <https://doi.org/10.33684/CFHG3.en>
- Agudo, J., Martin, M., Roca, C., Molas, M., Bura, A. S., Zimmer, A., Bosch, F., y Maldonado, R. (2010). Deficiency of CB2 cannabinoid receptor in mice improves insulin sensitivity but increases food intake and obesity with age. *Diabetologia*, 53(12), 2629–2640. DOI: 10.1007/s00125-010-1894-6
- Becoña, E., y Cortés, M. (2011). *Manual de adicciones para psicólogos especialistas en psicología clínica en formación*. Socidrogalcohol. I.S.B.N.; 978-84-933094-3-5
- Beltrán, A. (2017). El papel de la motivación en el fenómeno alimentario. *Interamerican Journal of Psychology*, 51 (2), 255-264. DOI: 10.30849/rip/ijp.v51i2.74
- Berrendero, F. (2002). Elementos que forman el sistema cannabinoide endógeno. En: Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (2002) *Guía Básica sobre los Cannabinoides*. Universidad Complutense de Madrid. I.S.B.N.: 84-699-8658-9
- Bisogno, T., Mahadevan, A., Coccurello, R., Chang, J.W., Allarà, M., Chen, Y., Giacobuzzo, G., Lichtman, A., Cravatt, B., Moles, A., y Di Marzo, V. (2013). A novel fluorophosphonate inhibitor of the biosynthesis of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol with potential anti-obesity effects. *British Journal of Pharmacology*, 169(4):784–793. DOI: 10.1111/bph.12013
- Bradshaw, C., y Killeen, P. (2012). A theory of behavior on progressive ratio schedules with applications in behavioural pharmacology. *Psychopharmacology*, 222, 549-564. DOI: 10.1007/s00213-012-2771-4

- Brockett, A. T., Tennyson, S. S., de Bettencourt, C. A., Gaye, F., y Roesch, M. R. (2020). Anterior cingulate cortex is necessary for adaptation of action plans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(11), 6196–6204. DOI: 10.1073/pnas.1919303117
- Cárdenas, A., Navarro, M., Pita, M., Padilla, M., García, K., y Becerra, M. (2014). Componentes neurofisiológicos de los hábitos alimentarios. En López-Espinoza, A. y Magaña, C., (Eds), *Hábitos Alimentarios. Psicobiología y socioantropología de la alimentación*. (pp. 183-195). McGraw Hill. ISBN: 978-607-15-1206-2
- Cortés-Salazar, F., Suárez-Ortiz, J. O., Cendejas-Trejo, N. M., Mancilla-Díaz, J. M., López-Alonso, V. E., y Escartín-Pérez, R. E. (2014). Effects of CB1 cannabinoid receptor activation in the nucleus accumbens shell on feeding behavior. *Acta Colombiana de Psicología*, 17(2), 61-68. DOI: 10.14718/ACP.2014.17.2.7
- Cota, D., Tschöp, H., Horvath, T., y Levine, A. (2006). Cannabinoids, opioids and eating behavior: The molecular face of hedonism?. *Brain research reviews*, 51, 85-107, DOI: 10.1016/j.brainresrev.2005.10.004
- Cristino, L., Bisogno, T., y Di Marzo, V. (2020) Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature reviews Neurology*, 16:9-29 DOI: 10.1038/s41582-019-0284-z.
- Cruz-Martínez, A. M., González-Hernández, B., Cendejas-Trejo, N. M., Mancilla-Díaz, J. M., Florán-Garduño, B., y Escartín-Pérez, R. E. (2010). Inhibición de la saciedad alimentaria inducida por activación de receptores CB1 hipotalámicos. *Revista mexicana de análisis de la conducta*, 36(2), 39-51.
- Cruz-Martínez, A.M., Tejas-Juárez, J.G., Mancilla-Díaz, J.M., Florán-Garduño, B., López-Alonso, V.E. y Escartín Pérez, R.E. (2018). CB1 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulate the release of 5-HT and GABA to stimulate food intake in

- rats. *European Neuropsychopharmacology*, 15(19):1-13. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2018.08.002
- Delgado, J. (1998). Emoción y motivación. Sistema límbico. En Delgado, J., Ferrús, M., Mora, A. y Rubia, F. (Eds). *Manual de Neurociencia*. (pp. 891-914). Síntesis. ISBN: 9788477386001
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., y De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in Neurosciences*, 21(12):521-528. DOI: 10.1016/s0166-2236(98)01283-1.
- Di Marzo, V. (2006). Endocannabinoids: synthesis and degradation. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 160:1-24. DOI: 10.1007/112_0505
- Di Marzo, V., y Piscitelli, F. (2015). The endocannabinoid system and its modulation by phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*, 12:692-698. DOI: 10.1007/s13311-015-0374-6
- Di Marzo, V. (2018). New approaches and challenges to targeting in the endocannabinoid system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(9):623-639. DOI: 10.1038/nrd.2018.115.
- Díaz-Laviada, I. (2002). Mecanismos de transducción de señales de los cannabinoides. En: Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (2002) *Guía Básica sobre los Cannabinoides*. Universidad Complutense de Madrid. I.S.B.N.: 84-699-8658-9
- Díaz-Urbina, D., Escartín-Pérez, R. E., López-Alonso, V. E., y Mancilla-Díaz, J. M. (2018). Efectos de una dieta con alto contenido de grasas sobre patrones conductuales alimentarios. *Acta Colombiana de Psicología*, 21(1), 95-115. DOI: 10.14718/acp.2018.21.1.5
- Escartín-Pérez, R., Cedejas-Trejo, N., Cruz-Martínez, A., González-Hernández, B., Mancilla-Díaz, J. y Florán-Garduño, B. (2009). Role of cannabinoid CB1 receptors on macronutrient selection and satiety in rats. *Physiology y Behavior*, 96, 646-650. DOI: 10.1016/j.physbeh.2008.12.017

- Ferreira, Y. (2009). Influencia del incremento en la magnitud de razón fija sobre el contrafreeloding en organismos inferiores. *Ajayu Órgano de Difusión Científica del Departamento de Psicología UCBSP*, 7(2), 22-44. ISSN 2077-2161
- Fleta, J. y Sarría, A. (2012). Aspectos psicológicos y fisiológicos de la ingesta de alimentos. *Boletín de la Sociedad de Pediatría de Aragón, La Rioja y Soria*, 42(1) 13-21. ISSN-e 1696-358x
- García, M., Roger, C., De la Rubia, J., y Aguilar, M. (2017). Modelos animales de adicción a las drogas. *Adicciones*, 29 (4), 278-292. ISSN 0214-4840
- García-Rico, R., y Fierro, F. (2017). Papel de las subunidades alfa de proteínas G en los procesos morfogénicos de hongos filamentosos de la división Ascomycota. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(1), 1-9. DOI: 10.1016/j.riam.2016.06.005
- Gong, JP, Onaivi, OS, Ishiguro, H, Liu, Q-R, Tagliaferro, PA, Brusco, A. Uhl, GR. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Research*, 1071(1), 10-23. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.11.035
- González, S., Sagrado, O., Gómez, M., y Ramos, J. (2002). Química y metabolismo de los cannabinoides. En: Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (2002) *Guía Básica sobre los Cannabinoides*. Universidad Complutense de Madrid. I.S.B.N.: 84-699-8658-9
- Guegan, T., Cutando, L., Ayuso, E., Santini, E., Fisone, G., Bosch, F., Martínez, A., Valjent, E., Maldonado, R. y Martin, M. (2013). Operant behavior to obtain palatable food modifies neuronal plasticity in the brain reward circuit. *European Neuropsychopharmacology*, 23, 146-159. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2012.04.004
- Horn, H., Böhme, B., Dietrich, L. y Kock, M. (2018). Endocannabinoids in body weight control. *Pharmaceuticals*, 11:1-48. DOI:10.3390/ph11020055
- INEGI y INSP (2022). *Resultados Nacionales*. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición [ENSANUT] 2021 sobre COVID-19 (Archivo PDF)

- https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanutcontinua2021/doctos/informes/220804_Ensa21_digital_4ago.pdf
- Ignatowska B, Jankowski M, y Swiergiel A. (2011). Cannabidiol decreases body weight gain in rats: Involvement of CB2 receptors. *Neuroscience letters*, 490(1), 82–84. DOI: 10.1016/j.neulet.2010.12.031
- Jamshidi, N., y Taylor, D. A. (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *British Journal of Pharmacology*, 134, 1151-1154. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704379
- Kánter, I. (2021). *Magnitud del sobrepeso y obesidad en México: Un cambio de estrategia para su erradicación*. Mirada Legislativa No. 197, Instituto Belisario Domínguez, Senado de la República, Ciudad de México.
- Keller, C., y Siegrist, M. (2015). Does personality influence eating styles and food choices? Direct and indirect effects. *Appetite*, 84, 128-138. DOI: 10.1016/j.appet.2014.10.003
- Killeen, P. R. (1978). Stability criteria. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 29(1), 17–25. doi:10.1901/jeab.1978.29-17
- Kupfermann, I., Kandel, E., y Iversen S. (2001) Estados de motivación y adictivos. En Kandel, E. R., Schwartz, J. H., y Jessell, T. M. (2001). *Principios de neurociencia* (4° ed., pp 998-1014) McGraw-Hill.Interamericana. ISBN: 978-8448603113
- Koch, M., Varela, L., Kim, J. G., Kim, J. D., Hernández-Nuño, F., Simonds, S. E., Castorena, C. M., Vianna, C. R., Elmquist, J. K., Morozov, Y. M., Rakic, P., Bechmann, I., Cowley, M. A., Szigeti-Buck, K., Dietrich, M. O., Gao, X. B., Diano, S., y Horvath, T. L. (2015). Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature*, 519(7541), 45–50. DOI: 10.1038/nature14260
- Lecca, D., Scifo, A., Pisanu, A., Valentini, V., Piras, G., Sil, A., Cadoni, C., y Di Chiara, G. (2020). Adolescent cannabis exposure increases heroin reinforcement in rats genetically

- vulnerable to addiction. *Neuropharmacology*, 166, 107974. DOI:
10.1016/j.neuropharm.2020.107974
- Liu, C., y Kanoski, S. (2018). Homeostatic and non-homeostatic controls of feeding behavior: Distinct vs. common neural systems. *Physiology y Behavior*. 193, 223-231. DOI:
10.1016/j.physbeh.2018.02.011
- López, J. (2018). Análisis del comportamiento alimentario y factores psicológicos en población universitaria no obesa. *Anales de psicología*, 34(1), 1-6. DOI:
10.6018/analesps.34.1.294341
- Macht, M. (2008). How emotions affect eating: A five-way model. *Appetite*, 50(1), 1-11. DOI:
10.1016/j.appet.2007.07.002
- Mahler, S.V., Smith, K.S. y Berridge, K.C. (2007) Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology*, 32:2267–2278. DOI: 10.1038/sj.npp.1301376
- Massa, F., Mancini, G., Schmidt, H., Steindel, F., Mackie, K., Angioni, C., Oliet, S., Geisslinger, G. y Lutz, B. (2010). Alterations in the hippocampal endocannabinoid system in diet-induced obese mice. *The journal of Neuroscience*, 30(18):6273-6281.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.2648-09.2010
- Mesurado, B. (2018). Explicaciones psicológicas sobre la motivación y el sustrato neurobiológico que posibilita la misma. *Psicología y Psicopedagogía*, VII (19), 1-14.
<http://hdl.handle.net/11336/72117>
- Michel-Chávez, A. Estañol-Vidal, B., Senties-Madrid, H., Chiquete, E., R. Delgado, G. y Castillo-Maya, G. (2015). Reward and aversion systems of the brain as a functional unit. Basic mechanisms and functions. *Salud Mental*, 38(4), 299-305. DOI: 10.17711/SM.0185-3325.2015.041
- Monteleone, A.M., Di Marzo, V., Monteleone, P., Dalle Grave, R., Aveta, T., El Ghoch, M., Piscitelli, F., Volpe, U., Calugi, S., Maj, M. (2016). Responses of peripheral

- endocannabinoids and endocannabinoid-related compounds to hedonic eating in obesity. *European journal of nutrition*. 55(4);1153–159. DOI: 10.1007/s00394-016-1153-9
- Monteleone, A. M. , Piscitelli, F., Dalle-Grave, R., El Ghoch, M., Di Marzo, V., Maj, M. y Monteleone, P. (2017). Peripheral endocannabinoid responses to hedonic eating in binge-eating disorder. *Nutrients*, 9(1377), 1-7. DOI: 10.3390/nu9121377
- Monteleone, P., Matias, I., Martiadis, V., De Petrocellis, L., Maj, M., y Di Marzo, V. (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. DOI: 10.1038/sj.npp.1300695
- Monteleone P, Piscitelli F, Scognamiglio P, Monteleone AM, Canestrelli B, Di Marzo V, Maj M (2012) Hedonic eating is associated with increased peripheral levels of ghrelin and the endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol in healthy humans: a pilot study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(6), E917–E924. DOI: 10.1210/jc.2011-3018
- Moreira, F. A., y Crippa, J. A. (2009). The psychiatric side-effects of rimonabant. *Revista brasileira de psiquiatria*, 31(2), 145–153. DOI: 10.1590/s1516-44462009000200012
- Navarrete, F., García-Gutiérrez, M. S., y Manzanares, J. (2018). Pharmacological regulation of cannabinoid CB2 receptor modulates the reinforcing and motivational actions of ethanol. *Biochemical pharmacology*, 157, 227–234. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.07.041
- Onaivi, E. S., Carpio, O., Ishiguro, H., Schanz, N., Uhl, G. R., y Benno, R. (2008). Behavioral effects of CB2 cannabinoid receptor activation and its influence on food and alcohol consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1139, 426–433. DOI: 10.1196/annals.1432.035
- Ortega-Gutiérrez, S. (2013). Avances en el estudio de receptores acoplados a proteínas G. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 109(4):276-284. ISSN-e 1575-3417

- Palomero-Gallagher, N., Vogt, B. A., Schleicher, A., Mayberg, H. S., y Zilles, K. (2009). Receptor architecture of human cingulate cortex: evaluation of the four-region neurobiological model. *Human brain mapping*, 30(8), 2336–2355. DOI: 10.1002/hbm.20667
- Pastor, A., Fernández-Aranda, F., Fitó, M., Jiménez-Murcia, S., Botella, C., Fernández-Real, J. M., Frühbeck, G., Tinahones, F. J., Fagundo, A. B., Rodríguez, J., Agüera, Z., Langohr, K., Casanueva, F. F. y De la Torre, R., (2016). A Lower Olfactory Capacity Is Related to Higher Circulating Concentrations of Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol and Higher Body Mass Index in Women. *PLoS ONE*, 11(2):1-15
DOI:10.1371/journal.pone.0148734
- Paxinos, G., y Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press.
ISBN: 9780123919496
- Pazos, A., y Mato, S. (2002). Farmacología de los receptores para cannabinoides. En: Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (2002) *Guía Básica sobre los Cannabinoides*. Universidad Complutense de Madrid. I.S.B.N.: 84-699-8658-9
- Phan, K. L., Wager, T., Taylor, S. F., y Liberzon, I. (2002). Functional neuroanatomy of emotion: a meta-analysis of emotion activation studies in PET and fMRI. *NeuroImage*, 16(2):331–348. DOI: 10.1006/nimg.2002.1087
- Quarta, C., Bellocchio, L., Manzini, G., Mazza, R., Cervino, C., Brulke, L., Fekete, C., Latorre, R., Nanni, C., Bucci, M., Clemens, L., Heldmaier, G., Watanabe, M., Leste-Lassere, T., Maitre, M., Tedesco, L., Fanelli, F., Reuss, S., Klaus, S.,.... Pagotto U. (2010). CB1 signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. *Cell Metabolism*, 11, 273-285. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.02.015
- Ravinet-Trillou, C., Delgorge, C., Menet, C. y Arnone, M. (2004). CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced

- leptin sensitivity. *International Journal of Obesity*, 28, 640-648. DOI: 10.1038/sj.ijo.0802583.
- Razón, K., Rodríguez, L., y León, J. (2017). Neurobiología del sistema de la recompensa en las conductas adictiva: consumo de alcohol. *Revista Electrónica de Psicología Iztacala*, 20 (4), 1344-1361. ISSN: 1870-8420
- Reynolds, G. (1968). *Compendio de condicionamiento operante*. San Diego, Universidad de California. Recuperado de http://www.soyanalistaconductual.org/g_s_reynolds_compendio_de_condicionamiento_operante.pdf
- Richardson, N., y Roberts, D. (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *Journal of neuroscience methods*, 66, 1-11. DOI: 10.1016/0165-0270(95)00153-0
- Rolls, E. T. (2008). Functions of the orbitofrontal and pregenual cingulate cortex in taste, olfaction, appetite and emotion. *Acta physiologica Hungarica*, 95(2), 131–164. DOI: 10.1556/APhysiol.95.2008.2.1
- Rolls, E. T. (2019). The cingulate cortex and limbic systems for emotion, action, and memory. *Brain structure y function*, 224(9), 3001–3018. DOI: 10.1007/s00429-019-01945-2
- Romero, J. (2002). Distribución del sistema endocannabinoide en el organismo. En: Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (2002) *Guía Básica sobre los Cannabinoides*. Universidad Complutense de Madrid. I.S.B.N.: 84-699-8658-9
- Romero-Zerbo, S. Y., García-Gutierrez, M. S., Suárez, J., Rivera, P., Ruz-Maldonado, I., Vida, M., Rodriguez de Fonseca, F., Manzanares, J., y Bermúdez-Silva, F. J. (2012). Overexpression of cannabinoid CB2 receptor in the brain induces hyperglycaemia and a lean phenotype in adult mice. *Journal of neuroendocrinology*, 24(8), 1106–1119. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2012.02325.x

- Secretaria de Salud (27 de febrero de 2016). *Obesidad aumenta riesgo de diabetes, que es la primera causa de muerte en México*. Gobierno de México.
<https://www.gob.mx/salud/prensa/obesidad-aumenta-riesgo-de-diabetes-que-es-la-primer-causa-de-muerte-en-mexico>
- Siegel, P. S. (1961). Food intake in the rat in relation to the dark-light cycle. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 54(3), 294–301. DOI: 10.1037/h0044787
- Simpson, K., y Bloom, S. (2010). Appetite and Hedonism: Gut Hormones and the Brain. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 39(4), 729–743. DOI: 10.1016/j.ecl.2010.08.001
- Soria-Lara, D., Gaitán-Vélez, B., Jiménez-Islas, H. y Miranda-López, R. (2019). El sistema de endocannabinoides como regulador de la lipogénesis y su posible modulación por la mangiferina. *Revista Biomédica*, 30(2):83-102. DOI: 10.32776/revbiomed.v30i2.638
- Ting, C., Chi C., Li, C., y Chen C. (2015) Differential modulation of endogenous cannabinoid CB1 and CB2 receptor in spontaneous and splice variants of ghrelin-induced food intake in conscious rats. *Nutrition*, 31(1), 230-235. DOI: 10.1016/j.nut.2014.06.008
- Vázquez-Arévalo, R., López-Aguilar, X., Álvarez-Rayón, G., Franco-Paredes, K., y Mancilla-Díaz, J. (2004). Presencia de trastorno de la conducta alimentaria en hombres y mujeres mexicanos: algunos factores asociados. *Psicología conductual*, 12(3), 415-427.
<https://psycnet.apa.org/record/2005-01194-003>
- Werner, N. A., y Koch, J. E. (2003). Effects of the cannabinoid antagonists AM281 and AM630 on deprivation-induced intake in Lewis rats. *Brain research*, 967(1-2), 290–292. DOI: 10.1016/s0006-8993(02)04274-9
- Williams, C. M., y Kirkham, T. C. (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, 143(3), 315–317.
DOI:10.1007/s002130050953

Williams, C. M., Rogers, P. J., y Kirkham, T. C. (1998). Hyperphagia in pre-fed rats following oral δ 9-THC. *Physiology y Behavior*, 65(2), 343–346. DOI:10.1016/s0031-9384(98)00170-x

Youssef, D. A., El-Fayoumi, H. M. y Mahmoud, M. F. (2019). Beta-caryophyllene alleviates diet-induced neurobehavioral changes in rats: The role of CB2 and PPAR- γ receptors. *Biomedicine y Pharmacotherapy*, (110), 145-154.