UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN PSICOLOGIA EN NEUROCIENCIAS DE LA CONDUCTA

PROPIEDADES REFORZANTES DEL ALIMENTO EN UN MODELO ANIMAL DE OID. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES A CANNABINOIDES DEL NÚCLEO ACCUMBENS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:DOCTOR EN PSICOLOGIA

PRESENTA:

LIC. FELIPE CORTÉS SALAZAR

TUTOR PRINCIPAL: DR. RODRIGO ERICK ESCARTÍN PÉREZ
PROFESOR DE TITULAR Y TUTOR EN POSGRADO DE PSICOLOGÍA, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

TUTOR ADJUNTO: DR. FLORENCIO MIRANDA HERRERA
PROFESOR TITULAR Y TUTOR EN POSGRADO DE PSICOLOGÍA, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

TUTOR EXTERNO: DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO
INVESTIGADOR 3C DEL DEPTO. DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS DEL CINVESTAV, IPN. TUTOR REGISTRADO EN POSGRADO EN PSICOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE 2023

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen

La obesidad es una patología que merma la salud y bienestar de los humanos. Reportes recientes confirman la participación de los receptores CB2 (rCB2) en la regulación de procesos hedónicos, motivacionales y de conducta alimentaria. Aunque los rCB2 se expresan en el núcleo accumbens (NAc), centro regulador del procesamiento de las propiedades reforzantes de los estímulos, a la fecha no se ha descrito con detalle su contribución en la regulación del consumo de estímulos gratificantes. Así, el objetivo del presente trabajo fue determinar si la obesidad inducida por dieta (OID) genera alteraciones en la sensibilidad a las propiedades reforzantes del alimento palatable en términos de motivación ante una tarea operante y si esto se asocia a alteraciones en la neurotransmisión mediada por rCB2 del NAc en rata. Nuestros resultados muestran que el efecto de estimulación de la motivación por el alimento palatable tras la activación de los rCB2 del NAc se pierde tras la exposición crónica a la dieta alta en grasas, además de que la obesidad disminuye la motivación por el alimento palatable y produce cambios de la expresión de los rCB2 en regiones como el NAc. Finalmente, se concluye que los rCB2 contribuyen con la regulación de los circuitos neuronales responsables de la motivación por alimento palatable y que se su función está alterada ante el desarrollo de obesidad por la exposición crónica a la dieta con alto contenido de grasas.

Abstract

Obesity is a condition that undermines the health and well-being of humans. Recent reports have confirmed the involvement of CB2 receptors (rCB2) in the regulation of hedonic, motivational, and feeding behaviors. Although rCB2 receptors are expressed in the nucleus accumbens (NAc), a regulatory center for processing the reinforcing properties of stimuli, their contribution to the regulation of the consumption of rewarding stimuli has not been described in detail to date. Thus, this study aimed to determine whether diet-induced obesity (OID) leads to alterations in sensitivity to the reinforcing properties of palatable food in terms of motivation in an operant task and whether this is associated with alterations in rCB2-mediated neurotransmission in the NAc of rats. Our results show that the stimulation effect on motivation for palatable food following the activation of NAc rCB2 is lost after chronic exposure to a high-fat diet. In addition, obesity decreases the motivation for palatable food and alters the expression of rCB2 receptors in regions such as the NAc. In conclusion, rCB2 receptors contribute to the regulation of neural circuits responsible for motivation for palatable food, and their function is altered in the development of obesity due to chronic exposure to a high-fat diet.

Agradecimientos

Investigación realizada gracias al programa UNAM-PAPIIT IN224214, IN217117, e IN232120, así como a la beca CONACyT para el becario 479513.

Los experimentos se realizaron en el laboratorio 18 del Grupo de Investigación en Nutrición de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, en el laboratorio 4 y 7 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV Zacatenco.

Lista de Abreviaturas

(-)-delta-8-trans-tetrahidrocannabinol	(Δ8-THC)
(-)-delta-9-trans-tetrahidrocannabinol	(Δ9-THC)
Anandamida	(ANA)
Área tegmental ventral	(ATV)
Cannabiciclol	(CBL)
Cannabidiol	(CBD)
Cannabielsoin	(CBE)
Cannabigerol	(CBG)
Cannabinodiol	(CBND)
Cannabinol	(CBN)
Cannabitriol	(CBT)
Cannacromene	(CBC)
Colecistoquinina	(CCK)
Colesterol de alta densidad	(HDL)
Colesterol de baja densidad	(LDL)
Corteza prefrontal	(CPF)
Diacilglicerol	(DAG)
Endocannabinoides	(EC)
Fosfoinositol trifosfato	(PI3K)
Fosfolipasa C	(PLC)
Grupo alimentado con dieta alta en grasas	(HF)
Grupo control, alimentado con dieta estándar	(Ctrl)
Hipotálamo dorsal	(HD)
Hipotálamo lateral	(HL)
Hipotálamo ventral	(HV)

Hipotálamo ventromedial	(VMH)
Inositol trifosfato	(IP3)
La amida hidrolasa de ácidos grasos	(FAAH)
La fosfolipasa-D específica para NAPE	(NAPE-PLD)
Lipasa diacilglicerol	(DAGL)
Modelo de obesidad inducido por dieta	(OID)
N-acil-fosfatidiletanolamina	(NAPE)
Neuropéptido tipo Y	(NPY)
Núcleo accumbens	(NAc)
Núcleo arqueado del hipotálamo	(ARC)
Núcleo paraventricular del hipotálamo	(PVN)
Péptido relacionado a Aguti	(AgRP)
Pro-opiomelanocortina	(POMC)
Proteína quinasa 3	(Akt)
Proteína quinasa activada por mitógeno	(MAPK)
Razón fija	(RF)
Razón fija 1	(RF1)
Razón fija 5	(RF5)
Razón progresiva	(RP)
Receptores a cannabinoides tipo 1	(rCB1)
Receptores a cannabinoides tipo 2	(rCB2)
Sistema endocannabinoide	(SEC)
Súper familia de receptores acoplados a proteínas G	(GPCR)
Transcrito regulador de anfetamina-cocaína	(CART)
Trastorno por Atracón	(TPA)
Trastornos Alimentarios y de la Ingestión de los Alimentos	(TAIA)

Índice

Regulación Central del Comportamiento Alimentario 9

Comportamiento Alimentario Patológico 14

Circuito de la Recompensa 17

Sistema Endocannabinoide 22

Antecedentes Históricos del Uso de la Mariguana y su Incorporación al Estudio Biomédico 22

Receptores a Cannabinoides: Comunicación, Síntesis y Metabolismo 26

Receptor CB1: Expresión y Señalización 29

Receptor CB2: Expresión y Señalización 34

Participación de los Endocannabinoides en el Control Alimentario y en la Obesidad 39

Planteamiento del Problema 43

Justificación 44

Preguntas de investigación 47

Objetivos 47

Hipótesis 48

Método 49

Animales 49

Aparatos 49

Dietas 50

Cirugía estereotáxica 52

Drogas 52

Modelo de Obesidad Inducido por Dieta (OID) 53

Evaluación de la Motivación por Alimento Palatable 54

Evaluación de los Efectos de la Activación de los rCB2 del NAc en la Motivación por Alimento Palatable 55

Determinación de la Expresión de los rCB2 del NAc 56
Liberación de [^{3}H]-dopamina de Explantes del NAc 58
Análisis Estadístico 60
Resultados 62
Modelo de obesidad inducido por dieta (OID) 62
Evaluación de la Motivación por Alimento Palatable 67
Motivación por el Alimento Palatable en Sujetos Sometidos al Protocolo de OID 69
Efectos de la Activación de los rCB2 del NAc Sobre la Motivación por Alimento Palatable en Ratas Sometidas al Protocolo de OID 71
Determinación de la Expresión de los rCB2 del NAc en Ratas Expuestas al Protocolo de OID 73
Evaluación de los Efectos de la Activación de los rCB2 sobre la Liberación de [^{3}H]DA en el NAc 79
Discusión 81
Limitaciones 86
Perspectivas 87
Referencias 88

Regulación Central del Comportamiento Alimentario

Entre 1901 y 1904 el Dr. Iván Petróvich Pávlov estudió la relación entre los procesos fisiológicos de la alimentación con las conductas asociadas, los resultados de sus observaciones permitieron establecer mecanismos fisiológicos de la respuesta de ingestión de alimento y además proponer la teoría de condicionamiento respondiente que es la base del aprendizaje asociativo en Psicología, en ella se relacionan patrones de aprendizaje entre procesos fisiológicos y los estímulos del contexto (Gutiérrez, 1999).

En la actualidad, la conducta alimentaria se concibe como un proceso complejo que incluye desde la búsqueda del alimento hasta las conductas consumatorias que se definen como episodios de ingesta. Entre estos dos parámetros se han establecido patrones disfuncionales como la compulsión e impulsividad, además de procesos cognitivos, toma de decisiones basadas en señales de las propiedades reforzantes de los alimentos y el componente emocional previo, durante y posterior a la alimentación, la suma de estos factores interviene en su topología (de Araujo, 2011; Petrovich, 2013; Prus et al., 2009).

En humanos y modelos animales la conducta alimentaria se puede definir operacionalmente por los episodios en los que se ingiere alimento durante el día (24h) y el consumo por la diferencia entre el alimento expuesto y el que se deja en el recipiente, esta cantidad de consumo puede expresarse en gramos o kilocalorías (Travers, 2009).

Otro rasgo importante es que la conducta alimentaria se acompaña por experiencias gratificantes, por ello, el alimento es considerado un reforzador natural que aumenta la probabilidad de ocurrencia de las conductas contingentes a su consumo. La magnitud de la sensación gratificante o palatabilidad del alimento aumenta con su privación, las características intrínsecas del alimento, el estado energético del organismo y el procesamiento neuronal (Schaumberg et al., 2015).

A nivel del sistema nervioso se integra información propioceptiva y sensoperceptiva, además de que se modulan funciones ejecutivas y motoras que generan señales energéticas y hedónicas asociadas al alimento. En conjunto esta información determina la preferencia del tipo de alimento y la cantidad del consumo (Berridge et al., 2009; Kringelbach & Berridge, 2010).

En el encéfalo, las neuronas que regulan la homeostasis energética se encuentran concentradas en el hipotálamo, región que integra señales de hormonas periféricas en una intrincada red que también involucra neuropéptidos, purinas, monoaminas y lípidos (Funahashi et al., 2003).

En la década de los 50s, Hetherington y Ranson demostraron la participación del hipotálamo en el metabolismo energético, en esa misma época, se concluyó que la ingesta se relacionaba con la acumulación de grasa en el cuerpo. Entre 1970 y 1990 se reportaron los hallazgos de las señales de saciedad relacionadas con la liberación de glucagón, bombesina y colecistoquinina resultante de la ingestión de alimento (Singh et al., 2017).

En experimentos donde se lesionaron núcleos hipotalámicos de ratas se encontraron efectos hiperfágicos o hipofágicos dependiendo del área lesionada, de estos hallazgos se definió al núcleo ventromedial como el centro del hambre y al hipotálamo lateral como centro de la saciedad (Stellar & Stellar, 1985). Este paradigma estableció por algún tiempo la idea de un funcionamiento de encendido-apagado, respecto a las señales de inicio y paro en el comportamiento alimentario. En la actualidad esta idea es reduccionista, se acepta preferentemente la idea de una comunicación compleja y dinámica en la que intervienen otras estructuras del encéfalo.

Existe una clasificación de las conexiones del hipotálamo con otras regiones cerebrales que regulan la homeostasis energética, estas incluyen proyecciones provenientes de regiones ventrales, regiones intermedias del cerebro y fibras provenientes de núcleos

monoaminérgicos del tallo cerebral. La región ventral incluye al núcleo arqueado (ARC) y paraventricular (PVN) del hipotálamo, sus neuronas se conectan con otras regiones dentro del mismo hipotálamo. En la región intermedia del cerebro se comunica el hipotálamo lateral con la amígdala central, habénula, núcleo parabraquial y núcleo de la cama de la estría terminal. Por último, los núcleos monoaminérgicos se encuentra el área tegmental ventral (ATV) y el rafé dorsal que se comunican con el hipotálamo lateral. Todas las regiones enlistadas mantienen integrada información del estado energético y motivacional del organismo, función indispensable para el procesamiento de los estados de hambre y saciedad (Jeninngs et al., 2013).

Los núcleos del ARC y PVN son conocidos como centros de entrada por recibir información de regiones ventrales, intermedias y del tallo cerebral, participan en la homeostasis energética decodificando señales periféricas de leptina, orexina y grelina para regular el balance energético (Cone, 2005).

Las neuronas del ARC se clasifican en dos poblaciones en función de la expresión diferencial de los neurotransmisores que sintetizan. El primero expresa al péptido relacionado a Aguti (AgRP) y el segundo pro-opiomelanocortina (POMC). Las neuronas que expresan AgRP son orexigénicas por participar en la generación de señales de hambre, razón por la que se encuentran más activas en el ayuno, estas neuronas además co-expresan el ARN mensajero del neuropéptido tipo Y (NPY), sintetizan y liberan ácido γ-aminobutírico (GABA), por lo que sus terminales axónicas liberan simultáneamente AgRP, GABA y NPY en diferentes áreas del prosencéfalo, del hipotálamo y romboencéfalo, además estas neuronas expresan receptores para melanocortinas, leptina y grelina (Cone et al., 2001).

El segundo grupo neuronal, además de sintetizar y liberar POMC, libera al transcrito regulador de anfetamina y cocaína (CART) y ß-endorfinas (metabolitos resultantes de la proteólisis específica de la POMC), por lo que a estas neuronas se les denomina como

POMC/CART y expresan receptores a leptina e insulina. A estas neuronas se les reconoce por su función anorexigénica, promoviendo hipofagia cuando se activan (Zhan, et al., 2013).

Debido a las funciones opuestas y sinérgicas entre las neuronas AgRP/NPY y POMC/CART, se ha propuesto un sistema de comunicación complejo y dinámico que está en regulación permanente para mantener el balance energético. En consistencia con este razonamiento, Li et al. (2013) mostraron el efecto hiperfágico en ratones tras la administración sistémica de leptina, señal que bloquearon con la activación farmacológica de las neuronas AgRP/NPY. Gran parte de las proyecciones de las neuronas AgRP/NPY y POMC/CART tienen como objetivo el PVN. Este núcleo es considerado un centro integrador que regula diversas funciones homeostáticas en el sistema, incluyendo la alimentación.

Por su parte, Luchtman et al. (2015), bloquearon el efecto hiperfágico de la administración de NPY en el PVN con melanotan II (MTII), agonista selectivo de los receptores MC3 y MC4. A partir de este resultado propusieron que parte de la función regulatoria de la alimentación del PVN se explica por las conexiones que mantiene con el ACR por medio de las melanocortinas.

La inactivación de las neuronas POMC del núcleo ventromedial del hipotálamo con la toxina *diptheri* (inhibidor de la síntesis de proteínas), produce hiperfagia y con ello la ganancia de peso corporal. El mecanismo propuesto es la inhibición de la síntesis de la hormona estimuladora de melanocitos alfa (α-MSH), producida por el metabolismo de la POMC y que tiene efectos hipofágicos antagonizando a los receptores MC4 lo que disminuye la señal inhibitoria de la alimentación producida por las neuronas AgRP vía la α-MSH (Michael et al., 2017; Zhan et al., 2013). Mecanismo corroborado con ratones *knockout* de los receptores MC4 donde se observó el desarrollarlo de obesidad al cabo de los 224 días, confirmando el efecto anorexigénico de la unión de la α-MSH a los receptores MC4 (Huszar et al., 1997).

Chen et al. (2016) proporcionaron evidencia de la relación entre la actividad de las neuronas AgRP con la función regulatoria de la alimentación del hipotálamo, ya que tras estimular con optogenética a estas neuronas en ratones antes de ser alimentados, observaron un consumo definido por los autores como *voraz*. Este efecto además fue directamente proporcional al tiempo de la estimulación optogenética. Adicionalmente, los sujetos mostraron mayor motivación por obtener alimento evaluado con programas de reforzamiento de razón progresiva, lo que sugiere que estas neuronas también participan en el procesamiento de las propiedades reforzantes de la alimentación.

Recapitulando, hasta este punto se ha expuesto la evidencia experimental que permite sugerir la contribución de las neuronas POMC/CART y AgRP/NPY en la regulación hipotalámica de la conducta alimentaria mediante la afectación de procesos homeostáticos, hedónicos y motivacionales; además de que estas neuronas pertenecen a una red comunicante con áreas del mesencéfalo, prosencéfalo y telencéfalo necesarias para la modulación de distintos aspectos de la conducta alimentaria (Rossi & Stuber, 2017).

Por otro lado, el procesamiento de los componentes hedónicos de la alimentación se regula en gran medida por neuronas que se relacionan anatómica y funcionalmente con la corteza cerebral, estriado ventral y mesencéfalo, que forma parte de una red neuronal que integra el circuito de la recompensa. Específicamente, existe evidencia suficiente de que el hipotálamo lateral tiene conexiones bidireccionales con el núcleo accumbens, lo que permite entender la vinculación del componente hedónico con la regulación homeostática (D´Addario et al., 2014).

El hedonismo en la alimentación puede ser considerado como la huella biológica en el recorrido filogenético de los mamíferos a partir de experiencias positivas, que aumentaban la probabilidad de repetir una conducta adaptativa. El placer es capaz de promover conductas de búsqueda, en este caso de alimento, pero con características particulares, como el contenido

energético, textura y sabor. Otro factor que guía estas conductas son los ciclos circadianos (Bainier et al., 2017).

Es por ello por lo que la palatabilidad es uno de los factores más relevantes en la alimentación lo que explica porque los alimentos palatables son ricos en contenido energético (Berridge & Kringelbach, 2015). El placer no sólo ha permitido que se recuerde un alimento que nos ha nutrido y proporcionado energía, sino que nos permite sobrevivir, por ello guía la conducta alimentaria mediante el desarrollo de preferencias.

Comportamiento Alimentario Patológico

En el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales V-TR (DSM-V TR) (APA, 2022) se clasifican los trastornos alimentarios y de la ingestión de los alimentos (TAIA) a partir de los patrones de conducta y síntomas específicos que presentan los datos epidemiológicos, que en algunos casos se relacionan con alteraciones homeostáticas.

Aunque la obesidad no se ha incluido en los TAIA del DSM-V TR es considerada una condición fisiológica anormal que predispone a desarrollar patologías más severas, se caracteriza por compartir patrones conductuales con el Trastorno por Atracón (TPA) como el consumo desmedido en periodos cortos ante una sensación de pérdida de control (APA, 2022).

Se sabe que la obesidad y el TPA son entidades nosológicas independientes, sin embargo, comparten algunos síntomas. Entre el 40 y 70% de los pacientes con diagnóstico de TPA presentan obesidad, esta puede ser originada por el TPA, presentarse como comorbilidad, o de manera independiente. Hasta el momento no se ha aceptado que una condición sea determinante de la otra, es decir, se aceptan que hay factores que promueven la generación de obesidad en ausencia de sintomatología del TPA (Bray et al., 2023).

Son múltiples los factores que facilitan la aparición de la obesidad, se han clasificado siguiendo distintos criterios. Archer y Lavie (2022) los dividen en factores adquiridos y congénitos, los primeros son aquellos que involucran el componente conductual, tanto en la dimensión alimentaria, abuso, como en la actividad física, el sedentarismo. En el segundo grupo, el de los factores congénitos, se encuentran los que predisponen al individuo para el desarrollo de los primeros (por ejemplo, los factores genéticos).

Aunque la prevalencia de obesidad se relaciona principalmente por componentes congénitos, las diferencias en la etiología parten del funcionamiento celular. Por lo que, el componente congénito es solo una parte de la función celular, mientras que lo genético es específico de la función nuclear y mitocondrial. Es por ello por lo que en hermanos monocigóticos puede haber diferencias fenotípicas ante coincidencias genotípicas, que se explican por más de un factor: acomodación fenotípica, *splicing* alternativo, edición de ARN, transcriptos quiméricos, multifuncionalidad protéica, variancia epistática, efectos maternos, regulación metabólica en la transcripción y modificaciones transcripcionales (Archer et al., 2018).

Retomando la idea anterior, la estimulación contextual y los patrones conductuales resultantes parecen explicar mejor la etiología de la obesidad lo que también permite generar intervenciones diseñadas a este nivel. Las condiciones de sedentarismo asociadas al incremento excesivo de calorías en la alimentación y gasto energético reducido generan un balance energético positivo, lo que consecuentemente producirá acumulación de grasa corporal y probable desarrollo de obesidad (van Strien, 2018).

Una vez desarrollada la obesidad, se ha reportado que ocurren alteraciones que comprometen el funcionamiento de los tejidos cardiaco, pulmonar, pancreático, renal y cerebral. Así, los cambios en el funcionamiento del sistema nervioso central, particularmente del circuito de la recompensa (Berridge et al., 2010), ayuda a entender en parte la afectación

de la regulación cognitiva, emocional y conductual reportada en estos pacientes (Konttinen, 2020; Piché et al., 2023).

Una de las alteraciones cognitivas que modifica la conducta alimentaria en personas con obesidad es el incremento en la actividad somatosensorial de las cortezas gustativas primaria y secundaria, asociado a la sensibilidad olfativa y gustativa. La corteza gustativa primaria se comunica con la ínsula anterior y el *operculum* frontal, circuito que procesa la información de la percepción del sabor. La corteza gustativa secundaria se comunica con la corteza orbitofrontal y prefrontal para integrar elementos sensitivos del alimento, asignando valores a los sabores y salinidad. Cuando estos procesos están alterados como en la obesidad se asocian con sobreingesta de alimento, debido a que las experiencias sensitivas, gustativas y emocionales en personas normo peso son diferentes ante los mismos estímulos alimentarios, debido a que las personas con obesidad tienen la percepción de los alimentos disminuida (Liu, 2019).

El alimento palatable en humanos y modelos animales aumenta la saliencia de los estímulos asociados por sus características en el sabor, incrementando la probabilidad de sobreingesta por un consumo compulsivo. Estos componentes conductuales también se han reportado en trastornos por el consumo de sustancias de abuso y en algunos obesos. Ambas condiciones presentan alteraciones en los núcleos cerebrales que regulan el procesamiento del placer (Ziemens et al., 2022).

Los estados emocionales negativos como la ansiedad, la impulsividad, la pérdida de control y la depresión son más comunes en pacientes con obesidad y en personas con trastornos de consumo de sustancias de abuso. La transmisión dopaminérgica en el circuito de la recompensa es considerada como un elemento clave para la regulación de los procesos cognitivos y motores necesarios para la expresión de las sensaciones placenteras en el consumo de alimento y sustancias de abuso (Blanco-Gandia, et al., 2017).

Las proteínas que participan en la comunicación celular son capaces de modificar la topología conductual, se han propuesto diversas familias de receptores neuronales que participan en la conducta alimentaria. Por ejemplo, los receptores CD36, pertenecientes a la familia de los receptores buitres (scavengers) se acoplan a ácidos grasos y colágeno, por lo que se les relaciona con la preferencia de alimento rico en grasas y en general con el desarrollo de la obesidad (Kure Liu et al., 2019).

Los receptores a cannabinoides también participan, como se demostró en un modelo de rata al que se privó 22 horas seguido de dos horas de acceso a una dieta chow para saciarlas, le siguió 1 hora de acceso a una dieta palatable, los animales consumieron la dieta palatable a pesar de que los sujetos ya habían consumido entre el 80-85% de su requisito energético diario, tras la microinyección intra núcleo accumbens (NAc) de ACEA agonista selectivo de los rCB1 se encontró un efecto hiperfágico, mismo que tuvo un efecto dosis dependiente (Cortés-Salazar et al., 2012).

En conclusión, la topología de la conducta alimentaria permite estudiar la relación con los circuitos neuronales implicados en su regulación y como en condiciones patológicas como la obesidad, se alteran. Los mecanismos son semejantes a lo reportado en los trastornos por el consumo de sustancias. Los factores que regulan estos circuitos incluyen la experiencia perceptiva y emocional, el fenotipo, genotipo y la actividad física que modifican los patrones de alimentación que a su vez permite comprender el desarrollo de patologías como la obesidad.

Circuito de la Recompensa

El hallazgo de Olds y Milner (1954) marcó un hito con su modelo de autoelectroestimulación intracraneal al encontrar que la aplicación de gradientes de voltaje en el *tegmentum* y el área *septal* eran reforzantes en una tarea operante, aumentando la respuesta

en las ratas, incluso en condiciones de extinción experimental. En 1956, cuando Olds y Milner repiten el experimento, descubren que la autoelectroestimulación con descargas de bajo voltaje en el NAc mantenía la tasa de respuesta en el programa de reforzamiento, lo que permitió relacionar los componentes hedónicos de los reforzadores con este núcleo (Kringlebach et al., 2010).

En una sofisticada serie de experimentos electrofisiológicos realizados por Gallistel et al. (1981), se describe la actividad de fibras mielinizadas ante estímulos reforzantes, rastreando su origen en el núcleo de la cama anterior del prosencéfalo medio, que a su vez se conectaba a una matriz de estructuras subcorticales anteriores del sistema límbico. Dichas estructuras subcorticales proyectan al hipotálamo y al área preóptica para descender al ATV y después ascender directamente a las vías medias del prosencéfalo a un grupo selecto de estructuras límbicas que incluía el NAc, tubérculo olfatorio y corteza frontal.

Wise y Bozarth en 1984 propusieron una organización de los núcleos y tractos en tres puntos de sinapsis que conforman al circuito de la recompensa. El primer punto conecta desde el núcleo de la cama anterior del procencéfalo al ATV, el segundo del ATV al NAc y, por último, del NAc al pálido ventral. Para ese momento los principales neurotransmisores caracterizados en el tercer punto de conexión fueron GABA, sustancia P y encefalina. Por su parte, la entrada de neurotransmisores al NAc incluyó acetilcolina, endorfinas, serotonina, GABA, glutamato, encefalina, dinorfina y sustancia P.

Gallistel et al. (1981) explicaron por qué el circuito era sensible a la administración de barbitúricos, benzodiacepinas, cannabinoides, etanol, nicotina y opioides en las proyecciones del ATV, mientras que en las sinapsis asociadas al NAc interactuaban anfetaminas, cannabinoides, cocaína, opioides y anestésicos disociativos como ketamina y fenciclidina.

En 1992, Koob denomina el *circuito de la recompensa* a los núcleos implicados en el procesamiento de los estímulos reforzantes en modelos de animales con conducta de consumo compulsivo. Describió la presencia de los sistemas en este circuito de dopamina, opioides y GABA, además de resaltar la participación del NAc, estructura que recibe señales y las redistribuye a otras regiones del mesencéfalo, prosencéfalo y del sistema extrapiramidal.

El circuito de la recompensa se compone principalmente por el ATV, el NAc y la corteza prefrontal (CPF) forma parte de los cuatro circuitos dopaminérgicos encefálicos. Fue el primer circuito en relacionarse con el procesamiento del placer debido a los efectos inhibitorios de la autoadministración de cocaína tras lesionar dichas regiones, lo que se confirmó con los efectos de las inyecciones sistémicas de antagonistas de los receptores D1 y D2 (Koob, 1992).

Las neuronas del ATV que proyectan a la CPF y al NAc liberan DA ante experiencias placenteras y procesamiento cognitivo. La entrada de DA a la CPF permite la activación y procesamiento cognitivo modulando el estado emocional y la saliencia de los estímulos para dirigir la conducta dirigida a objetivos, mientras que la entrada de DA al NAc se relaciona con el consumo de reforzadores naturales y artificiales (D´Addario, 2014).

El circuito de la recompensa incluye a otras estructuras como el hipotálamo lateral, amígdala, corteza del cíngulo anterior, hipocampo, por mencionar solo algunas. En conjunto, estas regiones participan con la integración de información cognitiva, emocional, hedónica y motivacional de los estímulos reforzantes (Koob & Volkow, 2010).

Los conceptos de *liking* y *wanting* integran elementos del procesamiento neuronal, forman parte de las conductas y sensaciones asociadas al consumo de reforzadores. El primero se relaciona con la experiencia placentera que se experimenta en el consumo de los reforzadores, acompañado de gesticulaciones de agrado y la liberación de DA en el circuito mesolímbico. El segundo, se asocia al deseo o necesidad por un estímulo determinado

acompañado por un aumento en la saliencia de los reforzadores, además de involucrar otros sistemas de neurotransmisión como el opioide, endocannabinoide y la serotonina. Los circuitos neuronales asociados con el *liking* son más robustos, posiblemente porque se requiere procesar más información en la experiencia hedónica (Berridge, 2009; Berridge et al., 2010; Berridge & Kringelbach, 2015).

Se ha vinculado al circuito principalmente con el abuso de drogas, sin embargo, actualmente se sabe que también participa en el consumo y abuso de reforzadores naturales como el alimento, particularmente del tipo palatable que por sus características oro-sensoriales y energéticas es capaz de aumentar la percepción del sabor (Berridge, 2018).

Las proyecciones del ATV al NAc podrían ser las responsables de la emisión de conductas adaptativas dirigidas a la obtención de estímulos apetitivos. Aproximadamente el 75% de las neuronas del ATV que liberan dopamina tienen activación fásica cuando los animales tocan un pequeño bocado de comida durante la exploración en espacios conocidos, mientras que la población de neuronas restantes no responde a ningún estímulo fásico, por lo que se ha propuesto que la expresión de la conducta alimentaria es modulada en parte por el circuito de la recompensa (Schultz, 1998).

El NAc, el ATV y la sustancia *nigra,* reciben la información cognitiva proveniente de la CPF que es necesaria para el procesamiento de las propiedades hedónicas del alimento. La toma de decisiones vinculada a la ingesta de alimento palatable depende de la liberación de DA, misma que a su vez permite la expresión conductual de conductas anticipatorias como la búsqueda, el control inhibitorio, monitoreo en el diseño cognitivo, la conciencia sensorial e interoceptivas, así como la integración de la información saliente (Gupta et al., 2020). En función de lo anterior, se ha considerado que la alimentación dirigida a la obtención de sensaciones gratificantes antes que energéticas (alimentación hedónica), depende principalmente de la actividad del circuito de la recompensa.

La pérdida del control inhibitorio en el consumo de alimento palatable se relaciona con la ganancia de peso corporal y el desarrollo de la obesidad, específicamente la que se relaciona con una fuerte presencia de episodios de sobreingesta, razón por la cual se ha propuesto una adicción al alimento palatable (Gupta et al., 2020).

El concepto de adicción al alimento fue propuesto en 1956 por Randolph, quien lo definió como el consumo continuo de alimentos altamente palatables que es independiente de la satisfacción de los requerimientos energéticos y que ocurre a pesar de conocer las consecuencias negativas del consumo excesivo de alimento.

Lo encontrado por Melis et al. (2007), refuerza esa idea, ellos evaluaron mediante microdiálisis *in vivo* la liberación de DA en el NAc en ratas alimentadas con dietas palatables o chow, encontraron que la concentración de DA aumentaba con las dietas palatables a diferencia de cuando se alimentaban con la dieta chow. Además, encontraron que el aumento en la concentración de DA del NAc por el alimento palatable se regulaba por los receptores CB1.

Se encontró que personas con diagnóstico de obesidad y adicción al alimento tienen cerebros más parecidos entre sí, a diferencia de personas con obesidad, pero sin adicción al alimento. Las alteraciones comprometidas eran en las conexiones que modulan el control inhibitorio en el circuito de la recompensa, lo que explica los episodios de sobreingesta (Kalon, et al., 2016).

En modelos animales y en humanos la adicción al alimento se presentan cambios en la comunicación entre la periferia y el circuito de la recompensa, alterando el funcionamiento de las vías aferentes del nervio vago y el hipotálamo. Estas conexiones procesan la información proveniente de las hormonas de saciedad, estados emocionales que en conjunto con un acceso fácil a alimento palatable, termina por aumentar el *craving* y las conductas de búsqueda y motivación de alimento palatable (Simon et al., 2017).

En conclusión, el placer es complejo en los humanos que, considerando sus implicaciones, es difícil trasladarlo a la etología de la rata. Sin embargo, existen coincidencias neurobiológicas, específicamente en el circuito de recompensa que procesa reforzadores naturales y sintéticos. La conducta es sensible al tipo y características del reforzador, los patrones de consumo, las experiencias sensoperceptivas relacionadas con emociones positivas por la exposición repetida que aumenta la expresión de conductas relacionadas a su obtención, formando nuevos aprendizajes. Es la motivación guiada por el placer lo que modifica la biología de los organismos para desarrollar patologías que a simple vista parecieran ser exclusivamente metabólicas, pero que además de ello promueven patrones anómalos que dificultan su remisión.

Sistema Endocannabinoide

Antecedentes Históricos del Uso de la Mariguana y su Incorporación al Estudio Biomédico

Los cannabinoides se clasifican en tres grupos, el primero está conformado por las moléculas que sintetiza la planta de la mariguana (*cannabis* S. L.), los fitocannabinoides. El segundo, lo integran las moléculas que se producen de manera endógena en mamíferos, cuya estructura es análoga a los fitocannabinoides, los endocannabinoides (EC). El último, está integrado por las moléculas que se diseñan y sintetizan artificialmente en laboratorios para uso clínico y experimental, los cannabinoides sintéticos (Pertwee, 2014).

Dentro del primer grupo que contiene a los fitocannabinoides, se conocen otras subespecies de la planta, *cannabis* indica, *cannabis* ruderalis y *cannabis* afghanica. El concepto cannabinoide no sólo hace alusión a las sustancias químicas aisladas de la planta, las cuales presentan de manera típica un esqueleto terpenofenólico de C_{21}, sino que también involucra a los derivados y productos transformados de la planta (Turner et al., 1980).

La *cannabis* S. L., contiene 545 compuestos de los cuales se han aislado 104 fitocannabinoides, clasificados en 11 tipos, cada uno con sus compuestos derivados y sus respectivas nomenclaturas: (-)-delta-9-trans-tetrahidrocannabinol (Δ^9-THC) [18 compuestos], (-)-delta-8-trans-tetrahidrocannabinol (Δ^8-THC) [2 compuestos], cannabigerol (CBG) [17 compuestos], cannacromene (CBC) [8 compuestos], cannabidiol (CBD) [8 compuestos], cannabinodiol (CBND) [2 compuestos], cannabielsoin (CBE) [5 compuestos], cannabiciclol (CBL) [3 compuestos], cannabinol (CBN) [10 compuestos], cannabitriol (CBT) [9 compuestos] y los cannabinoides del tipo misceláneos [22 compuestos] (Ahmed, et al., 2008; Zulfiqar, et al., 2012).

Los fitocannabinoides son moléculas que interactúan con sitios de unión en el sistema nervioso de mamíferos, incluyendo al humano. Dichos receptores participan en múltiples procesos, se caracterizan por tener efectos psicotrópicos, razón por la cual su uso se relaciona con prácticas mágico-religiosas, curativas y recreativas.

La relación entre el humano y la planta se remonta a su uso en ceremonias de carácter mágico-religiosas desde hace más de 12,000 años, se han hallado restos de la planta en vasijas dentro de tumbas de humanos que vivieron en el noroeste del territorio actual de China. Se cree que debido a las rutas mercantiles que mantenía China con el resto del mundo, la planta llegó a conocerse hasta la India, además de ser usada como parte de su medicina, se le empleó con fines recreativos (Crocq, 2006).

El registro más antiguo del empleo terapéutico de la planta data aproximadamente de hace cuatro mil setecientos años y en la cultura China. En la tradición oral Shen Nong Ben Cao Jing, se mencionan sus efectos alucinatorios, estimuladores del apetito, tónicos y sedativos (Bonini, et al., 2018).

En el año 1800 a.C., los sumerios emplearon la mariguana contra la epilepsia, neuralgias y la pediculosis. En el 1,500 a.C. en las notas de *Atharva Veda*, libro sagrado del

hinduismo, en el *bhanga*, se hace referencia a la planta como *nos libera de la ansiedad*. En Persia, en el año 600 a.C. en las notas de Avesta se describe su uso en rituales con propiedades abortivas (Russo, 2007).

En el segundo centenario de nuestra época, en las notas de Galeno se usa como ingrediente en un jugo de semillas para tratar la otalgia y el dolor crónico. Los egipcios la registraron en su libro médico de Fayyum para tratar tumores. En el siglo ocho en la región de Persia e Irak se registró su actividad psicoactiva, 50 años después se registraría en el Ibn Sahl como un componente médico acompañado de un jugo de flores intranasal para la migraña, los dolores uterinos y en la prevención de abortos (Russo, 2014).

En el año 1,000 el físico y psicólogo persa, al-Mayusi la menciona en el uso contra la epilepsia con un jugo intranasal. Desde el siglo once y hasta el 1563 solo existen reportes acerca del control de dolor, contra reumas, una mención sobre su uso contra los tumores. Para 1563 en la India se registró su uso contra la ansiedad y para incrementar el apetito (Pertwee, 2014).

Aun cuando en la antigüedad y hasta la edad media se conocía la capacidad curativa de la planta y sus efectos positivos contra muchas enfermedades, tuvieron que pasar varios siglos para que el mundo moderno incorporara este conocimiento a la terapéutica farmacológica.

En 1830 los colonizadores ingleses importaron a Europa la planta de la mariguana, dándole principalmente un uso recreativo. Entre 1838 y 1840 el físico y químico Irlandés Sir W. B. O´Shaughnessy, considerado el padre de la investigación moderna de los cannabinoides, se cuestionó porqué la planta tenía efecto en nuestro organismo, dedicando gran parte de su vida al estudió sistemático de las propiedades medicinales de la planta, usando como guía los registros de la farmacopea China (Di Marzo, 2006).

Derivado de sus estudios surgieron los hallazgos para describir el sistema endocannabinoide. El primer aporte lo realizó Thomas Wood en 1899 aislando el fitocannabinoide cannabinol desde la resina de la planta. En 1932, Robert Cahn caracterizó el cannabinol, describiendo sus características moleculares. Para 1940, el inglés Lord Alan Todd, un gigante en la química orgánica sintetizó por primera vez un cannabinoide, el cannabidiol (Jacob & Todd, 1940).

Después de algunas décadas, Gaoni y Mechoulam dilucidaron la estructura de la principal molécula responsable de los efectos psicotrópicos de la planta de la mariguana (Δ^9THC) y en 1964 la sintetizaron. Matsuda y su equipo de trabajo, clonaron al receptor CB1 (rCB1) en 1990 y, a tres años de este descubrimiento, el inglés Sean Munro reportó la presencia de un segundo receptor el CB2 (rCB2) (Turu & Hunyady, 2010).

En 1992, Mechoulam y su equipo caracterizaron uno de los endocannabinoides, la N-araquidonoiletanolamida, molécula a la que se le denominó anandamida (ANA) por la palabra en sanscrito *ananda* que significa felicidad. Posteriormente, fue identificado el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y el noladin ether, en 1995 y en 2001 respectivamente (Howlett, 2002).

A partir de los descubrimientos de las moléculas endógenas responsables de los efectos de los cannabinoides sobre el funcionamiento del sistema nervioso, se comenzó con la investigación contemporánea del sistema de los EC desde la perspectiva de las disciplinas de la Neurobiología, Biomedicina, Biología molecular, Farmacología, Neurociencias y la Fisiología Celular.

Receptores a Cannabinoides: Comunicación, Síntesis y Metabolismo

Los receptores a cannabinoides se encuentran distribuidos de manera ubicua en mamíferos, sin embargo, se concentran mayoritariamente en tejidos inmune, nervioso, adiposo y endócrino (Joshi & Onaivi, 2019).

Los rCB1, rCB2 y GPR55 son los receptores activados por cannabinoides más estudiados. Todos ellos pertenecen a la súper familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Existen otros receptores que se activan con los cannabinoides como los receptores de potencial transitorio V1 (TRPV1), V2 (TRPV2), A1 (TRPA1), estos se activan principalmente por la capsaicina, por lo que no se integran formalmente al sistema endocannabinoide (SEC). Otro ejemplo son los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) que han mostrado ser activados por cannabinoides (Pertwee, 2015).

Los rCB1 y rCB2 tienen una homología del 44% entre sus secuencias de aminoácidos residuales (Mailleux & Vanderhaeghen, 1992), aunque en las regiones transmembrana las homologías alcanzan hasta un 32% (Cabral & Griffin-Thomas, 2009), no necesariamente cumplen con las mismas funciones, ni tampoco tienen la misma interacción con otros sistemas, aun cuando se expresen en la misma región.

Los EC se sintetizan bajo demanda en respuesta al incremento de Ca^2 intracelular en las neuronas mediante la actividad de lipasas específicas sobre precursores lipídicos contenidos en la membrana. Los endocannabinoides son considerados miembros de otros mediadores de lípidos asociados al ácido araquidónico. El ácido araquidónico es un ácido graso poliinsaturado precursor de las prostaglandinas y otros eicosanoides (Lu & Mackie, 2021).

Los EC más estudiados en Neurobiología son el 2-AG y la ANA, pertenecen a las etanolaminas de cadena larga de ácidos grasos, son moléculas que forman parte de las N-aciletanolaminas que se clasifican en ácidos grasos monoinsaturados y sobresaturados, como

los ácidos oleico, palmítico y estérico, aunque son más abundantes que la ANA en el organismo (Devane, et al., 1992; Sugiura, et al., 1995).

A pesar de que las N-aciletanolaminas no se unen a los receptores a cannabinoides, al menos no a los clásicos (rCB1 y rCB2), si son capaces de activar a los receptores PPARα, receptor nuclear involucrado en procesos antiinflamatorios, además de inhibir el apetito. En el caso de la palimitoiletanolamina, además de activar a los receptores PPARα, también es altamente selectivo para el receptor GPR55, debido a su activación por endocannabinoides (Tsuboi et al., 2018).

En el sistema nervioso, los EC se sintetizan y liberan en todo el encéfalo, en la médula espinal, tanto por neuronas como en células gliales. Además, la comunicación cannabinoide en las neuronas es preferentemente presináptica y retrógrada, es decir, los EC se sintetizan en elementos postsinápticos y se difunde a través del espacio sináptico para activar receptores en la presinápsis (Takako et al., 2005).

Los EC se sintetizan bajo demanda por el incremento de Ca^2 intracelular asociado a la activación de receptores acoplados a proteínas $G_{q/11}$ como por ejemplo receptores a glutamato, mGluR1 y mGluR5, así como los receptores colinérgicos muscarínicos, M_1 y M_3, que han mostrado regular positivamente la concentración de ANA y 2-AG en cultivos de neuronas de hipocampo de ratas (Schmind et al., 1999).

Seguido de las señales que promueven la síntesis de EC en la célula, los precursores lipídicos de la membrana plasmática: 2-Araquidonoil-fosfatidillinositol, el ácido 2-araquidonoil-fosfatídico, la 2-araquidonoil-fosfatidilcolina y el 2-araquidonoil-fosfatidiletanolamida, interactúan con otras enzimas para producir EC. En el caso de la ANA, en su ruta sintética es necesario que se catalice al precursor N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE) por la fosfolipasa-D específica para NAPE (NAPE-PLD), o puede ser por otras rutas

que no involucran a NAPE-PLD, por ejemplo, como parte de la síntesis de los ácidos grasos (Natarajan, et al., 1983; Schmid, et al., 1990).

El 2-AG se sintetiza a partir de su precursor, el diacilglicerol (DAG) y por la lipasa diacilglicerol (DAGL), en sus dos isoformas α o β. Cabe mencionar que esta molécula se encuentra densamente expresada en el estriado, además que la isoforma DAGLα participa predominantemente en la sinapsis del cerebro maduro, mientras que la DAGLβ participa preferentemente en etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso. La DAGLα, parece estar regulada por Ca^2 y cofactores como glutationa, tripéptido conformado por glutamato, cisteína y glicina, la movilización de Ca^2 es fundamental para la síntesis de los EC. El paso crítico para la producción de ANA y 2-AG en la célula, se debe principalmente a la formación de NAPE y DAG, ambos convertidos desde fosfatidiletanolamina a partir de N-acetiltransferasa y fosfoinositidos por la interacción de la fosfolipasa C (Shonesy et al., 2013).

Los EC se sintetizan en la membrana plasmática por medio de enzimas específicas, sin embargo, hasta el momento se han descrito otros endocannabinoides: N-dihomo-γ-linolenoiletanolamina, virodhamida, N-araquidonoildopamina, N-araquidonoilglicina, N-araquidonoilGABA y el Noladin Éter, los cuales pueden tener otras rutas metabólicas (Cota et al., 2003; Pertwee et al., 2010).

Las moléculas fosfolipídicas contenidas en la membrana de la neurona constituyen el precursor de la ANA. La síntesis de ANA inicia con el aumento de los niveles de Ca^2 intracelular, de manera que la fosfatidiletanolamina es transformada a N-araquidonoil fosfatidiletanolamina por la N-aciltransferasa. Posteriormente, la Fosfolipasa D convierte a la N-araquidonoil fosfatidiletanolamina en ANA, proceso dependiente de Ca^2 (Hussain, et al., 2018).

Para la síntesis del 2-AG se requiere del precursor fosfatildil-inositol (PI, por sus siglas en inglés), que es transformado en diacilglicerol (DAG) por la Fosfolipasa C-β, que también es dependiente del flujo de Ca^2 intracelular. Finalmente, la DAG lipasa produce 2-AG (Szabo & Schicker, 2008).

La neurotransmisión por endocannabinoides finaliza tras su captura e hidrólisis por enzimas específicas, la ANA es metabolizada por la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, por sus siglas en inglés) en la neurona postsináptica, mientras que el 2-AG es metabolizado por la lipasa monoacilglicerol en la terminal presináptica (Howlet et al., 2002).

Receptor CB1: Expresión y Señalización

En 1990 se descubrió que el SKR6, un GPCRs que hasta ese momento era un receptor huérfano, al expresarlo y activarlo farmacológicamente con Δ^9-THC en células K1 de ovario de hámster chino (células CHO) mostró inhibir la actividad del adenilil ciclasa, permitiendo establecer un acople específico con las proteínas $G_{i/o.}$ Estos hallazgos bastaron para que desde ese momento se le nombrara receptor a cannabinoides tipo 1 (Pertwee et al., 2010).

Al poco tiempo se clonó el gen responsable de la codificación de los rCB1 en humano, rata y ratón, el *CNR1*, para caracterizarlo se empeló un oligonucleótido proveniente del receptor de la sustancia K de vaca, del ADNc de la biblioteca del cerebro de rata, se secuenciaron 472 aminoácidos identificando el *locus* en la región 6q14-15, 91.8~96.1 cM (Cao et al., 1997).

El *locus* coincide con los marcadores moleculares D6S474 y DS424 relacionados con la presencia de esquizofrenia y con la onda P300 que aparece en los registros de EEG ante la toma de decisiones y que está alterada en pacientes esquizofrénicos de población clínica en Estados Unidos y Australia. Este *locus* también comparte secuencias de aminoácidos con personas con dependencia a sustancias de abuso (Levinson, et al., 2000; Martinez, et al., 1999; Martínez-Gras, et al., 2006).

Hasta el momento se han caracterizado cuatro exones que se expresan alternativamente para sintetizar cinco isoformas de ARNm del rCB1 en el encéfalo, la región codificante está preferentemente en el exón 4, sin embargo, aún no se ha descrito por completo la actividad transcripcional del exón 5 en la región 5´, misma que se ha propuesto estabiliza al ARNm en localización subcelular o eficacia transduccional. Estas isoformas que se expresan en el tejido encefálico tienen una localización diferenciada, expresando los mensajeros preferentemente en el exón 1 y 3 de donde se transcriben las variantes CB1A, CB1B, CB1C y CB1D, todas las isoformas coinciden en los dos sitios alternativos para la señal de inicio de la transcripción en estos exones, mientras que para la variante CB1E los transcriptos se expresan en el sitio 5´al final del exón 3 y en el exón 4, esta última es la de menor expresión en el encéfalo (Zhang et al., 2004).

El *CNR1* presenta al menos 11 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, por sus siglas en inglés) a lo largo de su secuencia, mismos que se asocian con patologías, de los que destacan el SNP codificante 1359G/A (rs1049353) que contiene una adenina (A) o guanina (G) que no ocasiona un cambio de aminoácido en la molécula resultante (treonina 392/453 treonina). En la región 3´UTR (*unstraslated región*) se han localizado 12kb del extremo 3´ del gen, además de un microsatélite que es rico en tripletes de AATn (Martínez-Gras et al., 2006).

La frecuencia de los alelos con SNPs en el *CNR1* y del microsatélite AATn, se relacionan con la diversidad entre las poblaciones norteamericana, japonesa, europea y africana para presentar diversas patologías, así como en halotipos del mismo gen. Un haplotipo es el conjunto de alelos de polimorfismos de un gen que al encontrarse cercanos entre ellos aumenta la probabilidad de heredarse juntos. Lo anterior tiene implicaciones en la participación del *CNR1* en algunos trastornos que pudieran estar diferenciados en la población (National Center for Biotechnology Information, 2023).

Una vez que se codifica y transcribe el *CNR1* al rCB1, esta proteína participa en la modulación de múltiples procesos en todo el organismo, en el encéfalo modula elementos cognitivos, emocionales y hedónicos, por mencionar solo algunos ejemplos de toda su participación en el sistema. El rCB1 pertenece a la clase A de los GPCRs, presenta una abundante expresión en el encéfalo, principalmente en las balsas lipídicas de membranas plasmáticas e intracelulares. Se ha descrito mayor presencia de rCB1 en terminales presinápticas de la médula espinal, cerebelo, estriado, sustancia *nigra*, hipocampo y corteza cerebral, este receptor se expresa con menor densidad en el sistema nervioso periférico (Hebert-Chatelain et al., 2016).

Las terminales axónicas y segmentos colaterales de las zonas activas de la sinapsis de las neuronas de la corteza cerebral que inervan al hipocampo son ricas en expresión del rCB1, aunque también se le encuentra en las interneuronas positivas a colecistoquinina (CCK) y con menor densidad en neuronas que liberan glutamato. Dentro del estriado dorsal y ventral los rCB1 se expresan abundantemente en las neuronas espinosas medianas, expresión particularmente alta en axones de la vía directa que proyectan al globo pálido (Katona et al., 1999).

Dentro del estriado dorsal y ventral, los rCB1 se expresan abundantemente en las neuronas espinosas medianas, expresión particularmente alta en los axones de la vía directa que proyectan al globo pálido (+). En el cerebelo, los rCB1 se expresan en fibras ascendentes, neuronas tipo canasta y otras neuronas. La expresión funcional incluye astrocitos y microglía, donde modula negativamente la muerte neuronal en modelos de isquemia o daño traumático cerebral. Se expresa en menor proporción en oligodendrocitos donde modula la respuesta celular ante hipoxia isquémica, estrés oxidativo, ataques inmunes y tumorales, mediante mecanismos anti apoptóticos, como la regulación a la baja de fosfoinositol trifosfato (PI3K) y la proteína quinasa 3 (AkT) (Howlet, et al., 2002).

En el cerebelo, se ha encontrado la expresión de los rCB1 en fibras ascendentes, en neuronas tipo canasta y en otras neuronas. La expresión funcional incluye astrocitos y microglía, donde modula negativamente la muerte neuronal en modelos de isquemia o daño traumático cerebral. Se expresa en menor proporción en oligodendrocitos donde modula la respuesta celular ante hipoxia isquémica, estrés oxidativo, ataques inmunes y tumorales mediante mecanismos anti apoptóticos, como la regulación a la baja de fosfoinositol trifosfato (PI3K) y la proteína quinasa 3 (AkT) (Robson, 2001).

También se ha descrito la participación de los rCB1 en la proliferación, diferenciación y migración en células progenitoras neuronales como neuromodulador retrógrado, regulando negativamente la liberación de neurotransmisor y promoviendo la hiperpolarización de la neurona presináptica. Al transfectar los rCB1 en líneas celulares con la toxina *pertusis*, toxina que cataliza la ribosilación del ADP de la subunidad de las proteínas G_i, G_o y G_t, se encontró una reducción en la producción de AMPc, lo que permitió determinar la señalización vía las proteínas $G_{i/o}$ y con la administración de ANA en membranas que expresaban al rCB1, nuevamente se encontró un efecto inhibitorio sobre el adenilil ciclasa (Jiang & Bajpayee, 2009).

Una vez descrito el acople de los rCB1 con las proteínas Gi/o, se implantó el receptor en células CHO y se encontraron efectos diferenciales entre el rCB1 y el rCB2 con la administración de ANA, lo que demostró diferencias en las vías de señalización de ambos receptores, aun cuando ambos receptores se acoplan a la misma proteína G (Rueda et al., 2000).

El 2-AG presenta actividad farmacológica como agonista completo, es decir, se acopla a todos los receptores cannabinérgicos con efecto inhibitorio en sistemas heterólogos en presencia de la forskolina, molécula responsable de la acumulación del AMPc (Gonsiorek et al., 2000).

Las vías canónicas que también son las más aceptadas involucran la activación de los GPCR´s favorecen la activación de quinasas asociadas a receptores acoplados a proteínas G (GRKs), fosforilando residuos de serina y/o treonina en dominios intracelulares de receptores activados por agonistas, generalmente en el extremo C-terminal y/o en el tercer *loop* intracelular (Reiter & Lefkowitz, 2006).

Los rCB1 y rCB2 se co-expresan con las isoformas de adenilil ciclasa 1, 3, 5, 6 y 8, mismas que en ensayos con radioligandos mostraron inhibir la producción de AMPc, mientras que las isoformas 2, 4 y 7 estimulan la producción de AMPc (Molina-Holgado et al., 2002). Adicionalmente, se ha reportado que en ausencia de las proteínas $G\alpha_{i/o}$, estos receptores pueden señalizar por proteínas G_q, induciendo un decremento en la producción de AMPc (Cruz-Martínez et al., 2018).

El acople de los rCB1 con las proteínas $G\alpha_{i/o}$ es considerado como la vía canónica, en ella incrementa la fosforilación de la cinasa reguladora de señales extracelulares, pERK 1-2, a través de vías dependientes de las proteínas G y la chaperona β-arrestina. La vía de la proteína $G\alpha_{i/o}$ participa negativamente en la modulación de la producción de AMPc que a su vez inhibe la actividad de la proteína cinasa A (PKA, Tsuboi et al., 2018), además de estimular la actividad de los canales de K^+ rectificadores de corriente (GIRKs) e inhibir a los canales de Ca^2 dependientes de voltaje tipo N y P/Q, lo que en conjunto genera una inhibición en la liberación de neurotransmisor en la terminal presináptica (Al-Zoubi et al., 2019).

Por su parte, la vía que involucra la fosforilación y reclutamiento de la β-arrestina depende de señales alternas dependientes de las proteínas G, que a su vez dependen del estado en el que se encuentren al momento de la activación. Los dos subtipos, β-arrestina 1 y β-arrestina 2, cumplen la función de mediación en la desensibilización de los GPCRs. Se ha

encontrado que en ratones *knockout* de β-arrestina 1 y β-arrestina 2, aumenta la sensibilidad y actividad de los rCB1 en tratamientos con agonistas selectivos (Reiter & Lefkowitz, 2006).

Como último paso en la ruta canónica de los rCB1 se fosforilan la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), la p38 MAPK y la cinasa c-Junk N-terminal, cinasas que participan como factores de transcripción (Gábor et al., 2010).

De las vías alternas a la ruta canónica tras la activación de los rCB1 se da el acople con otros subtipos de proteínas G, en condiciones específicas se ha reportado la interacción con las proteínas $G\alpha_s$ y $G\alpha_{q/11}$ (Al-Zoubi et al., 2019).

Se ha descrito, aunque en menor proporción la función de la proteína y del transcripto del rCB1 fuera del sistema nervioso en las glándulas adrenales, tejido del sistema reproductivo y células inmunes. En estos tejidos se ha propuesto una probable interacción con la modulación del funcionamiento del sistema nervioso central (Fulton, 2010; Tsuboi et al., 2018; Zou et al., 2019).

Receptor CB2: Expresión y Señalización

Aunque la disponibilidad de información de los rCB2 en la literatura es considerablemente reducida en comparación a los rCB1, se sabe que los rCB2 pertenecen a los GPCR's de la clase A de los receptores de rodopsina. Se clonaron en una la línea celular de leucemia promielocítica de humano (HL60) usando el ADNc y desde macrófagos y monocitos del esplenio. Se describió el gen *CNR2*, responsable de codificar los 360 aminoácidos de la proteína, con una presencia de siete α-hélices transmembranales, un grupo amino (N) terminal en la región extracelular glucosilado y un grupo carboxilo C terminal en la región intracelular (Amin & Ali, 2019).

El gen *CNR2* se identificó en el *locus* del cromosoma 4 en ratón y en el cromosoma 1p36 en humanos, tiene una estructura simple con un exón de codificación simple. Los rCB2 son considerados de baja variabilidad con respecto a los rCB1 a partir de las comparaciones

entre secuencias de humano, rata y ratón. El 81% de sus aminoácidos son homólogos entre rata y humano, el 82% entre humano y ratón, mientras que la homología entre rata y ratón es del 93%. Esta baja variabilidad entre especies se puede deber a la particularidad de la C-terminal que se presenta en la rata, como resultado de la región intrónica del ADN (Karsak et al., 2009).

El ARNm proveniente del *CNR2* mostró una expresión preferente en el sistema inmune y en células hematopoyéticas, sin embargo, también hallaron su presencia en otras estirpes celulares del sistema inmune, de mayor a menor medida en células β > células *natural killer* > macrófagos > células polimorfonucleares > células CD8T > células CD4T (Galiègue, 1995).

La expresión de los rCB2 en el sistema nervioso central se desestimó durante varios años debido a la señal tan baja que se registraba, por la ausencia de sondas y anticuerpos específicos de la proteína. Sin embargo, con el avance biotecnológico fue posible reevaluar la expresión de la proteína del receptor y con ello establecer la contribución de los rCB2 en la modulación de la actividad del sistema nervioso central, así como en el tejido endotelial y en células gliales (Quraishi & Paladini, 2016).

Con el reporte de Xi et al., en el 2011, se describió la participación de los rCB2 del NAc en la modulación de la liberación de DA y la conducta operante en un protocolo de autoadministración de cocaína en un modelo kockout de ratón. Se encontró que tanto el efecto de liberación de DA como los puntos de ruptura requerían de la participación de los rCB2, efecto que se confirmó con el uso de antagonistas selectivos.

En el reporte de Zhang et al. (2017), se determinó la expresión de los rCB2 por hibridación *in situ* en los somas de neuronas del ATV y en células gliales. También se evaluó la modulación del receptor en presencia del agonista JWH-133 en el ATV, encontrándose la inhibición de los potenciales de acción, efecto prevenido con el antagonista, AM630. Estos

mismos autores encontraron que el consumo de cocaína aumentaba la expresión de los rCB2 en la CPF, estriado y mesencéfalo, además de una tendencia de aumento con el consumo de sacarosa. Nuevamente encontraron una modulación negativa en los potenciales de acción y una caída en los puntos de ruptura ante la activación farmacológica del rCB2 con el JWH-133.

En el reporte de den Boon et al. (2012) encontraron la presencia funcional de los rCB2 en membranas intracelulares de neuronas piramidales de la corteza prefrontal, mientras que López-Ramírez et al. (2019) encontraron la presencia de los rCB2 en neuronas del estriado que expresaban conjuntamente receptores D2, formando heterodímeros rCB2-D2, además de que sugirieron que los rCB2 se expresan en las proyecciones DAérgicas que llegan al estriado. Por su parte, Navarrete et al., (2013) reportaron la presencia de los rCB2 en neuronas que conjuntamente expresan a los receptores nicotínicos α3 y α4, en el NAc y el ATV.

Hay evidencia experimental demostrada por Aracil-Fernández et al. (2012) de la expresión de los rCB2 en astroglia en el NAc y el ATV, misma que se relaciona con el consumo de cocaína en un modelo mutante. También existe evidencia de la presencia significativa de los rCB2 en microglía y en menor medida en oligodendocitros en células de cultivos primarios (Rojo-Bustamente, et al., 2020). En tejido de cerebelo humano se halló la expresión de los rCB2 en microglía perivascular (Núñez, et al., 2004). En conjunto, estos hallazgos corroboran la presencia funcional del receptor en NAc, tanto en neuronas como en células gliales.

Con respecto a las vías de señalización hay poca información disponible y la que hay converge en la vía canónica por acople con las proteínas $G_i/G_{o\alpha}$, inactivando el adenilil ciclasa y consecuentemente promoviendo la reducción de la síntesis de AMPc. Este efecto es generado por el desacople de las subunidades catalítica y reguladora del complejo PKA,

modulando así la fosforilación de factores de transcripción que a su vez regulan a promotores de sobrevivencia, proliferación y diferenciación celular (Taylor & Kornev, 2016).

De los pocos estudios que no describen la vía canónica, se ha reportado que los rCB2 pueden activar la vía de PI3K/Akt que se asocia con la respuesta protectora de neuronas en apoptosis, además de que puede fosforilar a la serina 352 en condiciones basales. Esta fosforilación aumenta con la activación de agonistas selectivos, promoviendo la desensibilización del receptor, además de las proteínas que participan en la internalización del receptor, como el residuo P139 en el motif DRY (X)6P resultante de la interacción entre el receptor y las proteínas G. Así mismo, se encontró que la β-arrestina 2 y la clatrina son necesarias para la internalización y reciclamiento del rCB2 (Dhopeshwarkar & Mackie, 2016).

La activación de alguna de las dos vías, de la β-arrestina o proteínas $G_i/G_{o\alpha}$, depende de las características moleculares del ligando con el que interactúa el receptor. A este fenómeno se le conoce como selectividad funcional o agonismo sesgado, el cual consiste en que dos o más fármacos selectivos a un mismo receptor generen respuestas diferentes al interior de la célula, debido a que interaccionan en distintos sitios de unión, lo que genera diferentes cambios conformacionales (DeWire, et al., 2007; Franklin et al., 2013).

Ejemplo de lo anterior es el caso de los agonistas selectivos GW405833 y el GW833972A, que se ha mostrado que pueden tener distinta selectividad funcional. El primer agonista muestra una interacción muy baja con el adenilil ciclasa pero mayor por las β-arrestinas, probablemente por su naturaleza de aminoalcaloide, mientras que en el segundo agonista muestra una actividad preferente por la inactividad del adenilil ciclasa (Dhopeshwarkar & Mackie, 2016).

Otro de los mecanismos descritos en los que se involucra la activación de los rCB2 es en la modulación de la fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés), a través de las

subunidades βγ de las proteínas Gαi o directamente por la actividad de los canales CaV2.1 dependientes de Ca^2, mediante mediadores como la CAMKII o los receptores ubicuos de calciomodulin cinasa, que son sensibles al aumento de Ca^2 (1μM) intracelular (Jiang et al., 2008). Estos sensores de calcio son capaces de generar una respuesta iónica directa en los canales CaV2.1. Recientemente se ha descrito que la activación de los rCB2 es capaz de modular al subtipo P/Q de los canales de Ca^2 mediante la subunidad βγ (Sánchez-Zavaleta et al., 2018).

En el 2012 den Boon et al., demostraron que los rCB2 que modulan la actividad eléctrica de las neuronas piramidales de la CPF, dependen del incremento de Ca^2 intracelular y una vez activos regulan positivamente las corrientes de Cl^- dependientes de Ca^2 por la activación de los receptores de inositol trifosfato (IP3). Poco después se reportó que la función de los rCB2 en el retículo endoplasmático de neuronas piramidales de la CPF medial estaba regulada por la síntesis de endocannabinoide, es decir, la modulación de las corrientes de Cl^- se daban por activación de los rCB2 mediante endocannabinoide sintetizado como consecuencia de la aplicación de pulsos despolarizantes de 20Hz (den Boon et al., 2014).

La expresión funcional de los rCB2 en neuronas glutamatérgicas de la región CA2 y CA3 en el hipocampo involucra al co-transportador de sodio y bicarbonato (NBC) a nivel postsináptico, regulando el pH de la neurona y con ello el tono endocannabinoide. Aunque la expresión de los receptores es baja en estas neuronas, se ha reportado que los rCB2 son capaces de hiperpolarizar la neurona (Stempel, et al., 2016).

Otro elemento en la vía de señalización de los rCB2 es la que se caracterizó en neuronas dopaminérgicas del ATV, mediante registros electrofisiológicos y biología molecular. Se encontró la expresión de los rCB2 en los somas y, al activarlos farmacológicamente, hiperpolarizaron a la neurona por el acople de proteínas $G_{\alpha i}$, vía la inhibición de la adenilil ciclasa y regulando la actividad de la PKA dependiente de canales M

de K^+, mismos que se proponen como responsables de hiperpolarizar la neurona (Ma et al., 2019).

La vía de señalización canónica en células inmunes también es por el desacople del complejo heterotrimérico de la proteína G, la subunidad βγ regula las isoformas de la PLC y activa las MAPK, como resultado del incremento de Ca^2 intracelular por la PLC/IP3. Por su parte, la subunidad α que se une a la adenilil ciclasa para inhibir su actividad, generando la disminución de la síntesis de AMPc, lo que se ha asociado como una señalización vía rCB2 para mantener una homeostasis inmunológica o una alternativa en respuesta a los fitocannabinoides (Δ^9-THC) o bien a los EC, para sobreponerse a una perturbación inmunosupresora (Cabral & Griffin-Thomas, 2009).

Participación de los Endocannabinoides en el Control Alimentario y en la Obesidad

La participación del sistema EC en la regulación alimentaria es compleja y aun en la actualidad se desconocen procesos moleculares en los que participan. De tal forma, entender estos mecanismos potencialmente permitirá mejorar los actuales tratamientos dirigidos a condiciones como la obesidad.

La conducta alimentaria tiene dos tipos de regulación, la homeostática y hedónica, ambas son reguladas en el encéfalo por circuitos neuronales que estimulan la generación de conductas de búsqueda de alimento, mismas que serán capaces de modificar el peso corporal y en general el estado de salud (Berridge & Kringelbach, 2015).

Los EC también participan en el balance de la regulación endostásica, la cual permite completar el consumo energético que se necesita para mantenerse vivo y, en la regulación exostásica, mecanismo evolutivo que permite almacenar energía para garantizar la sobrevivencia de necesidades futuras (Piazza et al., 2017). En ambos casos, el elemento hedónico está presente como huella biológica para que las conductas adaptativas se repitan.

La memoria hedónica permite que se jerarquice la búsqueda de los alimentos por su palatabilidad, por esta huella evolutiva. En la época moderna difícilmente habrá quien se alimente cumpliendo exclusivamente con las necesidades energéticas sin considerar el elemento hedónico, razón que explica en parte la sobreingesta, considerando que la oferta de alimentos palatables es excesiva, además de que tienen un bajo aporte nutrimental (Lau et al., 2017).

Uno de los circuitos neuronales en los que interviene el SEC en la regulación alimentaria homeostática se encuentra en el hipotálamo, este circuito está constituido por una intricada red de conexiones que involucra al PVN, hipotálamo lateral (HL), hipotálamo ventromedial (VMH) y ARC, estas áreas regulan principalmente funciones endócrinas como las señales de hambre y saciedad (Rossi & Stuber, 2017).

Por su parte, los EC están presentes en neuronas que regulan directamente la conducta alimentaria. Hay reportes en los que se realizaron administraciones con THC en ratas con estimulación eléctrica en el HL y confirmaron la modulación orexogénica (Trojnar & Wise, 1991; citado en Lau, et al. 2017). También se demostró que la activación de los rCB1 facilita la ingestión alimentaria por una respuesta homeostática, particularmente aquellos que se expresan en el hipotálamo. La regulación orexogénica provocada por la activación de los rCB1 involucra la regulación del tono de GABA en el PVN, en esta regulación participan a su vez los receptores $5HT_{1A}$ y $5HT_{1B}$ (Cruz-Martínez et al., 2018).

Otro hallazgo que es consistente con el efecto hiperfágico de la activación de los rCB1 es lo reportado por Williams y Kirkham (1999), quienes encontraron que con la administración subcutánea de AEA en ratas previamente alimentadas se incrementó la ingesta de alimento de manera dosis dependiente, efecto que se previno con el SR141716.

En el reporte por Jamshidi y Taylor (2001) hallaron que la activación de los receptores a cannabinoides centrales con la administración de ANA en el VMH fue capaz de

reproducir un efecto hiperfágico semejante a lo reportado por Williams y Kirkham en 1999, pero con administraciones sistémicas. Ambos reportes muestran evidencia de la participación del SEC sobre la regulación de la conducta alimentaria por receptores periféricos y centrales, pero con la activación central es suficiente para estimular el consumo de alimento.

Por otra parte, dentro de los efectos positivos en el tratamiento contra la obesidad con el SR141716, se reportó reducción en la circunferencia de la cintura, en el peso corporal y en la acumulación de triglicéridos en modelos de murinos, lo que llevó a que el tratamiento alcanzara la investigación de tercer nivel e incluso la venta abierta para su uso en humanos, sin embargo, debido a la incidencia en la ideación suicida de los usuarios se retiró del mercado (Behl et al., 2021).

En otro reporte se mostró el restablecimiento de los valores en la biometría hemática, además de aminorar la resistencia a la glucosa en los ratones que se expusieron a un modelo de obesidad inducido por dieta (OID), los cuales recibieron el tratamiento con el SR141716. A pesar de lo anterior, dentro de los efectos conductuales se registró un incremento en la respuesta ansiosa, semejante a lo que se reportó en los ensayos clínicos con humanos (Verty et al., 2015).

Aunque el tratamiento en humanos con inhibidores de la actividad de los rCB1 no avanzó más, permitió develar en la comunidad científica la relevancia de este sistema para regular elementos metabólicos y cognitivo-afectivos relacionados con la conducta alimentaria.

Paralelamente se propuso la participación de los rCB2 en un modelo de obesidad con manipulación genética. En el estudio se desarrollaron tres fenotipos de la cepa de ratón C57Bl/6J: heterocigotos (*wild type*), homocigotos obesos por deficiencia de leptina (*ob/ob)* y homocigotos delgados (*ob+/ob).* Se observó que la expresión de los rCB2 en tejido adiposo e hígado es directamente proporcional con la ganancia de peso corporal, además de que la

deficiencia del gen *Cnr2* previene el desarrollo del síndrome metabólico en los ratones expuestos a una dieta alta en grasas. Por último, los ratones deficientes del gen *Cnr2,* no desarrollan esteatosis por la exposición a la dieta alta en grasas (Deveaux et al., 2009).

Por otro lado, en ensayos farmacológicos se reportó que los rCB2 inhiben la conducta alimentaria, pues administrando inyecciones i.p., del agonista selectivo JWH015 a una dosis de 10mg/Kg en ratones, se observó disminución en la ingesta y el peso corporal, efecto que se previno con el tratamiento del antagonista selectivo a los rCB2, el AM630 (Verty et al., 2015).

Se ha propuesto que los rCB2 del sistema nervioso regulan procesos inflamatorios en los que coinciden procesos de envejecimiento. En el reporte Amancio-Belmont et al. (2016) encontraron que el consumo de alimento estándar y palatable disminuye con el incremento de edad en ratas, así como los puntos de ruptura por pellets palatables, pero no en la búsqueda por alimento palatable. Al evaluar la expresión de los rCB1 y rCB2, encontraron un incremento significativo en ambas proteínas en la CPF, NAc e Hipocampo, efecto que los autores propusieron deberse al envejecimiento de los animales.

Simultáneamente se ha reportado que los rCB2 modulan procesos inflamatorios (Zoppi et al., 2014) y conductas impulsivas (Navarrete et al., 2012). Estas últimas alteran la toma de decisiones implicadas en la ingesta y la selección del alimento, por lo que se ha propuesto que los rCB2 cumplen una función de freno o equilibrio de conductas reforzantes (Onaivi, 2017), la cual se va perdiendo con el desarrollo de las adicciones y patologías neurodegenerativas, lo que sugiere que en algunos casos de obesidad potencialmente podrían ocurrir fenómenos semejantes a los reportados en procesos adictivos.

Planteamiento del Problema

Los rCB1 del diencéfalo y mesencéfalo contribuyen con la regulación de la alimentación homeostática, su activación estimula el consumo de alimento mediante la modulación de la liberación de GABA y glutamato en el hipotálamo. También participan en la regulación de la alimentación hedónica estimulando la liberación de DA en el NAc, especialmente estimulando la ingesta de alimento palatable, incluso en sujetos saciados (Cortés-Salazar et al., 2014; Guegan et al., 2013; Escartín-Pérez et al., 2009).

Las características que hacen que el alimento sea palatable promueve que se consuma más que el alimento estándar o con bajo aporte calórico. Al respecto se ha propuesto que los mecanismos neuronales que pueden generar el consumo compulsivo de alimento podrían ser compartidos con aquellos responsables de otros procesos adictivos (Mateo et al., 2017).

En el NAc, cuando se activan los rCB1 de los somas de las espinosas medianas, se registra una reducción en el tono de GABAérgico, lo que a su vez promueve la activación cortical y liberación de glutamato a las neuronas del ATV. Ante esta señal, se libera DA en regiones del circuito mesocorticolímbico, incluyendo el NAc. Este circuito orquesta movimientos y cogniciones relacionadas a experiencias placenteras en adicciones y conducta alimentaria (Mateo et al., 2017).

Los EC participan en la génesis de la obesidad asociada a la sobreingesta de alimento hipercalórico, como se demostró en ratones deficientes de los rCB1 que no desarrollaron obesidad aun con la exposición continua a una dieta alta en grasas (Ravinet Trillou et al., 2004). En otro reporte en el que emplearon un modelo de OID en ratones con agotamiento selectivo de los rCB1 en neuronas del prosencéfalo, hipotálamo y neuronas preganglionares de la médula espinal, encontraron atenuado el efecto anorexogénico clásico del tratamiento con el SR141716A, a diferencia de los ratones con agotamiento total, que no expresaron el efecto anoréxico clásico del tratamiento (Quarta et al., 2010).

Por otro lado, la evidencia experimental de la participación de los rCB2 sobre la regulación de la alimentación hedónica y la regulación del peso corporal incluye el empleo de fitocannabinoides como tratamientos. Se ha descrito un efecto anorexogénico en animales alimentados con dieta chow con tratamientos crónicos y sistémicos con CBD, efecto prevenido parcialmente con el agonista inverso el AM630 (Ignatowska, Jankowski & Swiergiel, 2011).

Aunque el mecanismo de acción del CBD no está completamente esclarecido, se ha propuesto que funciona como un modulador alostérico negativo o como agonista inverso de los rCB2 (Mlost et al., 2020). De la misma forma, el tratamiento crónico y sistémico con el agonista de los rCB2, el JWH-133, mostró un efecto anoréxico en ratones alimentados con una dieta alta en grasas, efecto revertido con la coadministración del AM630 (Wu et al., 2020). Estos reportes muestran la participación de los rCB2 en la regulación del peso corporal en animales alimentados con dietas estándar y altas en grasas. Cuando se activaron estos receptores, se previno la ganancia de peso corporal en rata y ratón.

Justificación

En México es bien conocida la crisis sanitaria asociada a la obesidad. En adultos se calcula que la prevalencia alcanza el 30.5% en hombres, un 40.2% en mujeres y combinando las prevalencias los casos de sobrepeso para ambos sexos alcanzan un 75.2%. En niños y adolescentes llegan a un tercio de la población nacional. Con respecto a los gastos asociados a esta condición, estos ascienden a más de 85 mil millones de pesos al año entre tratamientos médicos (73%), pérdidas en el desempeño laboral (15%) y muertes prematuras (12%). Alrededor de 400 millones de horas laborales se pierden tratando las consecuencias de la obesidad, sobrepeso y diabetes, lo que equivale a 184,851 empleos de tiempo completo (Instituto Mexicano para la Competitividad A.C., 2015).

Por otro lado, como ya se mencionó el SEC contribuye con las señales de la comunicación y procesamiento de la información en el circuito de la recompensa, elemento neuronal que participa en la expresión de la conducta alimentaria homeostática y hedónica. El SEC también participa en la toma de decisiones, procesos inflamatorios y en las alteraciones que forman parte de la propuesta adicción al alimento (Gupta et al., 2020).

Particularmente los rCB2 del circuito de la recompensa regulan la actividad eléctrica en neuronas corticales y del mesencéfalo, promoviendo la hiperpolarización de neuronas piramidales y liberadoras de dopamina, respectivamente (den Boon et al., 2012; Zhang, et al., 2014), en el NAc regulan la liberación de DA (Xi et al., 2011) e inhiben a las neuronas dopaminérgicas del ATV (Ma et al., 2019).

Como se ha mencionado, el incremento en la liberación de DA en el NAc se relaciona con la autoadministración de cocaína, efecto en el que contribuyen los rCB2 (Aracil-Fernández et al., 2012; Navarrete et al., 2013; Xi et al., 2011) y en la ingesta de alimento palatable (Melis, 2007) mediado por los rCB1.

A pesar de que la expresión presináptica de los receptores CB1 en el NAc está bien caracterizada en neuronas que liberan glutamato y en los somas de neuronas que liberan GABA, falta evidencia de las probables estirpes neuronales y gliales en las que se expresan los rCB2.

De forma paralela, el consumo compulsivo de alimento hipercalórico se relaciona con el aumento de peso corporal, generando sobrepeso y en algunos casos obesidad (Berridge et al., 2010). La obesidad es una condición de acumulación anormal de grasa e inflamación crónica que se caracteriza por alteraciones moleculares en el sistema inmune, como el incremento de la proteína reactiva C y citocinas proinflamatorias (Cox, West & Cripps, 2015). En ratones deficientes de rCB2 se ha observado inflamación exacerbada y mayor expresión de citocinas proinflamatorias (Turcotte et al., 2016), por lo tanto, estos receptores

pudieran participar en alteraciones que expliquen los desajustes que promueven la sobreingesta de alimento palatable en la obesidad (Piché et al., 2023).

La participación de los rCB2 del cerebro y su relación con la ganancia de peso corporal a la fecha ha sido poco estudiada, pues principalmente se ha investigado más su participación en otras patologías. No obstante, se ha observado que su activación está relacionada con la liberación de DA en el NAc, que a su incrementa conductas consumatorias orientadas a la obtención de estímulos gratificantes como la cocaína (Xi et al., 2011).

De acuerdo con la evidencia disponible hasta el momento, la participación de los rCB2 en la actividad de las neuronas es inhibitoria, pues se ha reportado que en neuronas positivas a TH del ATV decrementan su actividad eléctrica tras la activación farmacológica de los rCB2 (Zhang et al., 2014), mediante la apertura de canales de K^+ tipo M (Ma et al., 2019).

En la CPF, los rCB2 se expresan en membranas intracelulares de neuronas piramidales y, tras su activación, hiperpolarizan a la neurona mediante corrientes de Cl^- (den Boon, 2012), mientras que en el hipocampo en neuronas de las regiones CA2 y CA3 hiperpolariza mediante el transporte de Na^2/K^+, regulando así las oscilaciones de ondas teta y omega (Stempel et al., 2016).

Debido a la actividad inhibitoria de los rCB2, se les considera como *el freno* de conductas impulsivas y compulsivas. Aunado a lo anterior, se ha reportado la reducción de la expresión del rCB2 en ratones con obesidad inducida. Así, es posible hipotetizar que las alteraciones asociadas a la obesidad inducida por una dieta alta en grasas pudieran modificar la expresión funcional de los rCB2 en el NAc. En consecuencia, evaluar la participación y cambios de expresión de los rCB2 en la obesidad podría coadyubar a proponer terapias dirigidas a entender y tratar parte de la circuitería neuronal implicada en la motivación y consumo compulsivo del alimento palatable.

Preguntas de investigación

1. ¿La obesidad inducida en ratas por el consumo crónico de una dieta hipercalórica (alta en grasas) genera alteraciones en la motivación por el alimento palatable evaluada mediante una tarea operante?

2. ¿Las alteraciones conductuales son explicadas por cambios en la neurotransmisión cannabinoide mediada por los rCB2 del NAc de la rata?

Objetivos

General:

Determinar si la obesidad inducida con una dieta hipercalórica con alto contenido de grasas genera alteraciones en la motivación (evaluada con una tarea operante) por alimento palatable, además de evaluar la participación los rCB2 del NAc y sus probables alteraciones en rata.

Específicos:

I. Establecer un modelo de OID en ratas macho de la cepa Wistar de 20 días posnatales (DPN) mediante la exposición durante 41 días a una dieta hipercalórica alta en grasas (60% de calorías de grasas). El modelo será validado mediante la evaluación de los siguientes parámetros: *i*) un incremento en la ganancia de peso corporal superior al 15% con respecto a los controles, *ii*) alteraciones en la química sanguínea evaluada mediante la medición de las concentraciones de triglicéridos, colesterol total, colesterol de alta y baja densidad, *iii*) incremento de la acumulación de tejido adiposo inguinal, gonadal, retroperitoneal, mesentérico y total, y *iv*) que la dieta no comprometa la actividad locomotora.

II. Estandarizar un protocolo de condicionamiento operante para evaluar la motivación por alimento palatable, mediante tres fases: preentrenamiento, entrenamiento y

prueba. Los parámetros para las fases de entrenamiento y prueba se establecieron en términos de la estabilidad en la tasa de respuesta en los programas de reforzamiento de razón fija y en la fase de prueba se cuantificaron los cambios en la motivación con los puntos de ruptura en un programa de reforzamiento de razón progresiva.

III. Determinar si el modelo OID produce cambios en los puntos de ruptura asociados al alimento palatable.

IV. Evaluar la participación de los rCB2 del NAc en la regulación de la motivación por alimento palatable (pellts de sacarosa con sabor a chocolate) con un programa de reforzamiento de razón progresiva tras la exposición al modelo de OID.

V. Determinar si el modelo de OID produce alteraciones en la expresión de los rCB2 del NAc.

VI. Evaluar la participación de los rCB2 en la liberación de DA en el NAc.

Hipótesis

Con base en la evidencia experimental actualmente disponible, los efectos esperados son: *i*) La exposición crónica a una dieta alta en grasas por 41 días generará incremento en la ganancia de peso corporal, alteraciones en la química sanguínea (triglicéridos, colesterol total, colesterol de alta y baja densidad) e incremento de la acumulación de tejido adiposo. Paralelamente, se esperan cambios en la sensibilidad a las propiedades del alimento palatable, específicamente un incremento en los puntos de ruptura, acompañados de cambios en la respuesta a la activación de los rCB2 del NAc y en la expresión de estos receptores en la misma región cerebral de las ratas.

Método

Animales

Se emplearon 24 ratas macho de la cepa *Wistar* generadas en los bioterios donde se realizaron los experimentos. Para los procedimientos conductuales, los animales fueron entregados por el Bioterio General de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I) con una talla de entre 50 a 60g y con una edad de entre 20 y 24 DPN. Para las evaluaciones neuroquímicas las ratas se suministraron por el bioterio del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) sede Zacatenco, con el apoyo del Dr. Benjamín Florán, los procedimientos llevados a cabo con todos los animales se apegaron en todo momento con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Aparatos

Para evaluar la motivación por alimento palatable se emplearon 8 cajas operantes tipo Skinner, automatizadas y desarrolladas por Med Assossiates Inc. (Standard Modular Chamber, MED-008-B2). Cada caja estaba equipada con dos palancas retractiles, dispensador para reforzadores sólidos y líquidos, luces para cada palanca, luz general y bocina para emitir un tono ajustable. Se empleó el *software* MED-PC-IV® para registrar las respuestas de la rata y el número de reforzadores dispensados en cada sesión. Se diseñaron y escribieron los códigos de todos los programas con el *software* Trans IV®, personalizando los requisitos de cada configuración experimental. Las cajas operantes estuvieron conectadas a una interfase que las enlazaba a un computador en el que se ejecutaron los programas y se compilaron las respuestas de los animales.

Para cuantificar la liberación de DA [H^3], se usó un contador de centellometría automatizado Beckman Coulter ®, además de una bomba peristáltica de 24 canales en los que por goteo se capturaban las soluciones que contenían el ligando radioactivo.

Para evaluar la expresión de los receptores a cannabinoides se empleó la técnica de Western Blot, con una fuente de poder de 4 canales de la marca BioRad®, una cámara de electroforesis y otra de transferencia de la misma marca. Las membranas en las que se incubaron a los anticuerpos fueron de PVDF.

Se emplearon cajas de actividad de campo abierto de la marca Med Assossiates Inc., con el software MED, para determinar la actividad locomotora de los sujetos.

Las mediciones del peso del tejido adiposo se realizaron con una balanza semianalítica y la biometría hemática fue procesada por un laboratorio comercial.

Dietas

Como parte de los experimentos para estandarizar el modelo OID, la dieta que se desarrolló en un primer momento tuvo la composición de almidón de maíz, caseína, dextrosa, sacarosa, aceite de soya, celulosa, mineral mix, vitaminas mix, L-Cistina, colina, TBHQ, inulina y manteca de cerdo. El aporte calórico era de 4.74 kc/g y 45% de aporte lipídico, esta dieta se le denominó DAGS. La dieta control tuvo la composición de almidón de maíz, caseína, dextrosa, sacarosa, aceite de soya, celulosa, mineral mix, vitaminas mix, L-Cistina, colina y TBHQ, con un aporte calórico de 3.84 kc/g y 10% de aporte lipídico, conocida como AIN 93 (por las siglas de la institución que recomendó la fórmula en 1993).

Ambas dietas fueron desarrolladas a partir de las recomendaciones nutrimentales para roedores por la American Institute of Nutrition en 1993 (Reeves, Nielsen & Fahey, 1993) y se elaboraron en la planta piloto de las instalaciones del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), se preparó una vez por semana y se transportó al bioterio del laboratorio de Neurobiología de la Alimentación de FES-I donde se realizaban los experimentos conductuales.

Sin embargo, debido a problemas con la comercialización de la caseína por restricciones de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), en experimentos posteriores se empleó una dieta comercial (TestDiet ®). Con la primera dieta permitió se establecieron los parámetros en talla, tiempo de exposición, volumen, manejo para evitar su descomposición, los materiales de almacenaje y la cronicidad de lavado. También se pudo determinar la edad óptima para favorecer la ganancia de peso corporal y la manipulación para evitar el estrés innecesario de los animales.

Se usaron dos dietas comerciales desarrolladas por TestDiet®. La dieta alta en grasas (HF) (Rodent Purified Diet w/60% Energy From Fat-Blue, 58Y1), con un perfil nutricional de 23.6% de proteína, 34.9% de grasa, 25.9% de carbohidratos, 6.5% de fibra y un aporte calórico de 5.16 Kcal/g (0.924kcal proteínas, 3.140 kcal grasas y 1.036 kcal carbohidratos). La dieta control fue empleada como control a la anterior (Rodent Purified Diet w/10% Energy From Fat-Yellow (58Y2), con 16.9% de proteína, 4.3% de grasa, 67.4% de carbohidratos, 4.7% de fibra y un aporte calórico de 3.76 Kcal/g (0.678kcal proteína, 0.384kcal de grasa y 2.697 kcal de carbohidratos). Mediante el uso de estas dietas se obtuvieron todos los resultados del modelo OID.

Para la evaluación de la motivación por alimento palatable se emplearon dos dietas como reforzadores, una estándar para las fases de entrenamiento y una palatable para las fases de prueba de motivación, ambas dietas fueron suministradas por BioServ (Dustless Presision Pellets®). El perfil nutricional de la dieta estándar por cada pellet de 45 mg fue de 18.7% de proteína, 5.6% de grasa, 4.7% de fibra, 6.5% de ceniza, <10% de humedad y 59.1% de carbohidratos. La dieta palatable fue manufacturada a base de sacarosa y tenía sabor a chocolate, con un perfil nutricional por cada 45mg, de 0%, de proteína, 0.0% de grasas, 5.8% de fibra, 0.8% de ceniza, <10% de humedad y 87.4% de carbohidratos.

Cirugía estereotáxica

Posterior a los 41 días del modelo OID a las ratas se les implantó unilateralmente (hemisferio derecho) una cánula guía de microinyección en el NAc, las coordenadas se calcularon con el Atlas Estereotáxico del cerebro de rata de Paxinos y Watson (2002), las coordenadas fueron anteroposterior +1.52mm; lateromedial -0.7mm; y dorsoventral -6mm.

Se anestesió a las ratas con una mezcla de Xilazina y Ketamina + solución salina (s.s.), en una proporción de 1:3 entre anestésico y sedante, la proporción fue de 1:1 entre el coctel y la s.s., se empleó en una dosis efectiva de 100mL/10kg de peso corporal vía i.p. Para el periodo de recuperación posterior a la cirugía se concedieron 5 días, en ese periodo se dio un tratamiento profiláctico con un antibiótico de amplio espectro a una dosis de 100mL/10kg vía i.m., con alimento y agua corriente *ad libitum*.

Drogas

Como sedante se usó el clorhidrato de xilacina desarrollada por PiSA Agropecuaria®, un agonista betaadrenérgico con una dosis de 8mg/kg, como anestésico se usó ketamina desarrollada por PiSA Agropecuaria®, antagonista de los receptores NMDA, con la dosis de 70mg/kg. En el tratamiento profiláctico postoperatorio el antibiótico que se empleó fue Enroxil® al 5% de enrofloxacina.

Para conocer la participación de los rCB1 se usó el agonista selectivo Arachidonyl -2´chloroethylamide hydrate (ACEA), con una Ki de 1.4 nM para los receptores CB1 y >1 400nM para el rCB2. Para el bloqueo de los rCB1 se empleó el antagonista 1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-4-morpholinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM 281), con una Ki de 12 nM para los rCB1 y 4 200nM para los rCB2.

Para evaluar la participación de los rCB2 se emplearon el agonista CB2 2-[(3-chlorophenyl) amino]-N-(4-pyridinylmethyl)-4-(trifluoromethyl)-5-Pyrimidinecarboxamide

hydrochloride (GW 833972A), con una Ki de 7.8nM, >1 000nM para los rCB1, además del agonista inverso 6-Iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl](4-methoxyphenyl) methanone (AM 630), con una Ki 31.2nM para los rCB2 y >150nM para los rCB1. Ambos fármacos se diluyeron en dimetil sulfóxido (DMSO) al 50%, después se realizaron diluciones con s.s. para alcanzar la dosis de 0.5µg/µL de fármaco + 0.05% de DMSO + 99% de s.s., la solución de vehículo tuvo un volumen de 0.05% de DMSO y 99.95% de s.s.

Modelo de Obesidad Inducido por Dieta (OID)

A los dos días del arribo de los animales a nuestro bioterio, se pesaron y distribuyeron a uno de los dos grupos con los que se trabajó, cuidando que el peso corporal promedio fuera semejante. A los animales del grupo control se les alimentó con la dieta control y al grupo HF se alimentó con la dieta alta en grasas (HF), se les expuso por 41 días a las dietas registrando diariamente el consumo de alimento, líquidos (agua corriente) y peso corporal, lo que permitió rastrear el estado de salud de los animales y evitar alteraciones en su desarrollo.

Al término del modelo, 5 ratas de cada grupo fueron seleccionadas aleatoriamente, se colectó la sangre troncal y la cantidad de tejido adiposo. Con la muestra de 5mL de sangre troncal se evaluó la química sanguínea donde se determinaron los niveles de leptina, glucosa, colesterol de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) y colesterol de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés). Los análisis clínicos se realizaron en una clínica veterinaria, misma que recogió las muestras en el laboratorio y envió los resultados por correo electrónico. Para colectar el tejido adiposo se disecó el área inguinal, retroperitoneal, mesentérica y gonadal, el análisis también incluyó el cálculo de la grasa total que incluyó las cuatro áreas.

Por último, se midió la actividad locomotora de las ratas para descartar que la dieta generara daños en la motricidad gruesa de los sujetos expuestos a la dieta HF.

Evaluación de la Motivación por Alimento Palatable

Este procedimiento consistió en el entrenamiento de las ratas para que asociaran la operante de presionar una palanca con la contingencia del alimento palatable como estímulo reforzador. El protocolo se dividió en tres fases, preentrenamiento, entrenamiento y prueba.

La *fase de preentrenamiento* consistió en que los animales asociaran la operante con el reforzador, para conseguirlo se sometieron a un programa de asociaciones emergentes mediante una operante libre, donde se mostraron aleatoriamente los estímulos incondicionados como el alimento, las luces asociadas a las palancas, el sonido del dispensador del reforzador y la presencia de las palancas por medio de su exposición y retracción. Para la emisión de las respondientes hasta ese momento, se presentó el reforzador como estímulo incondicionado. Previo a comenzar la primera sesión se entregaron 5 reforzadores que funcionaron como *priming*, se realizaron 3 sesiones de 20 minutos con 5 ensayos cada una, tiempo suficiente para que se formaran las contingencias en la mayoría de las ratas.

En el caso de que la rata no formara las contingencias con la operante libre, se les aplicó un programa de encadenamiento en el que se fragmentó la operante en subsistemas de conductas básicas, conforme aumentaban los ensayos completados, se iban haciendo más complejas, aproximando a la rata a la operante mediante reforzamiento continuo.

En la *fase de entrenamiento*, las ratas fueron expuestas a programas de reforzamiento positivo en la configuración de razón fija (RF). La emisión del reforzador dependió del requerimiento de respuesta establecido previamente, en el de razón fija 1 (RF1) se dio una relación de 1:1 entre la respuesta y el reforzador, se continuó con razón fija 5 (RF5) con una

relación de 1:5, esté último además de mantener la asociación entre el reforzador y la operante, incrementó la tasa de respuesta. En ambos programas, los animales debían mantener una estabilidad de respuesta calculada a partir del promedio de respuestas de al menos 20% de las últimas 5 sesiones, con la siguiente fórmula, $\frac{\bar{X}a*k}{\bar{X}b} =\leq 20$, donde a es el promedio de las últimas 5 sesiones, b el promedio de las últimas 3 sesiones, k es una constante.

En la *fase de prueba*, se determinó la motivación de las ratas por el alimento palatable usando como unidad de medida los puntos de ruptura que se obtuvieron con el programa de razón progresiva (RP), los puntos de ruptura se definieron como el valor máximo de operantes que realizó la rata para obtener un reforzador. El programa de RP consistió en aumentar progresivamente el requerimiento de respuesta con cada reforzador otorgado. Los valores se establecieron a partir de la ecuación $P = (x^{1.5})$, donde P corresponde al valor del requerimiento de respuesta y x es el número de ensayo. Los puntos de ruptura se calcularon del último ensayo de cada sesión para conocer el valor máximo de la operante por conseguir el reforzador. Se buscó que la serie permitiera calcular la motivación sin desgaste de la operante por el costo de demora y que fuera principalmente por el costo de esfuerzo en la tarea. Las sesiones no tuvieron una duración establecida, finalizaban transcurridos 10 min de omisión de la operante.

En esta fase se realizaron las pruebas farmacológicas para conocer los efectos de la activación de los rCB2 del NAc sobre la motivación por alimento palatable.

Evaluación de los Efectos de la Activación de los rCB2 del NAc en la Motivación por Alimento Palatable

Para evaluar la motivación por alimento palatable tras la activación de los rCB2 del NAc se implantó unilateralmente una cánula guía en el área suprayacente del NAc a un total

de 10 ratas expuestas al modelo OID, se les administraron los tratamientos farmacológicos con una diferencia de dos días entre cada tratamiento, se empleó un cuadro latino en el que todos los sujetos recibieron todos los tratamientos de manera aleatoria.

Determinación de la Expresión de los rCB2 del NAc

Se empleó la técnica de *Western Blot* para evaluar la expresión de los receptores del NAc en ratas expuestas al modelo OID. Para lo anterior, se sacrificaron 8 ratas por dislocación cervical para obtener los tejidos encefálicos y realizar cortes cerebrales coronales en frío, se disecaron los núcleos de interés. Posteriormente, se colectaron las muestras en viales de 50mL con PBS, una vez terminada la colecta se derramó el excedente de la solución y se agregó solución RIPA, para homogenizar el tejido con un homogeneizador motorizado, se prosiguió a fraccionar la muestra por medio de una centrifugación de 15 000 rpm para obtener la fracción sinaptosomal. Se colectó el sobrenadante y se desecharon las pastillas que se formaron en el fondo de los tubos tipo Falcón.

El siguiente paso fue desnaturalizar las proteínas por baño María a 70°C durante 5min., se agregó solución muestra, la cual contenía inhibidores de proteasas. El siguiente paso fue determinar la absorbancia de la muestra por espectrofotometría, apoyándose de una curva de saturación con una muestra conocida, determinada la concentración de la muestra se homogenizó el volumen de carga y se almacenaron en microtubos de 2mL a una temperatura de -70°C.

Con las muestras procesadas y listas, se polimerizaron los geles de poliacrilamida con un 20% de acrilamida, se vertió al interior de los casetes de vidrio, se adicionó el peine para formar los pocillos. Se cargaron los pocillos con el marcador de peso molecular y las muestras de interés, seguido, se montó en las cajas de electroforesis y se cargaron con la

solución amortiguadora para electroforesis, se conectó a una fuente de poder para agregar una carga de 80 volts durante 20 min. y luego se aumentó a 120 volts durante 120 min.

Se extrajo el gel de poliacrilamida y se montó en una preparación tipo sándwich con los geles que contenían las membranas de PVDF en las cajas de transferencia, a la que se le vertió la solución amortiguadora de transferencia. Transcurridas 2h, se obtuvieron las membranas y se activaron con metanol, para después bloquear con BSA a 0.25% durante 24h, se realizaron 3 lavados en agitación de 26 rpm en un agitador orbital por 5min., para retirar el excedente de la solución de bloqueo.

Se incubó el anticuerpo primario para el rCB1 de la casa comercial ABCAM a una dilución de 1:1000, para el rCB2 se empleó el anticuerpo ACR-002 de la casa comercial Cayman® a una dilución de 1:2000. El primero de los anticuerpos secundarios se desarrolló en hospedero de ratón y el segundo de cabra, las diluciones fueron de 1:15000 para el primero y 1:10000 para el segundo, las placas se revelaron usando una reacción de quimioluminiscencia con luminol, se registró la señal con un fotodocumentador o placa fotográfica.

Para determinar por inmunofluorescencia la expresión de los rCB2 en el fenotipo neuronal, astriglial y microglial en el NAc, se obtuvieron los cerebros de las ratas del grupo HF y Ctrl al término del modelo de OID, se sumergieron en una solución de alta sacarosa al 80% durante 4 días, después se trasladaron a una solución de PFA al 4% por 3 días, para seccionar los cerebros en cortes sagitales de 30µm con un criotomo Beckman ®.

Los cortes se almacenaron en una placa de 48 pocillos con PBS filtrado, se seleccionaron las rebanadas con los núcleos mejor conservados, para realizar la recuperación antigénica. Las muestras se mantuvieron en agitación con el buffer de citratos a una temperatura constante de entre 90-100ºC durante 10min., para continuar con 3 lavados de PBS, 5 min. C/u. Posteriormente se llevó a cabo la permeabilización y bloqueo de los tejidos

incubándolos por 2 horas a temperatura ambiente y en agitación con BSA al 1% y Tritón X-100 al 0.2% en PBS.

Después de la incubación se montaron los tejidos en microtubos de 2µL en una solución que contenía el anticuerpo primario en una dilución de 1:100 (Alamone lab ACR-002) en BSA al 1% diluido en PBS durante 24h y en agitación orbital, al término se lavaron 3 veces (5min./c.u.) los tejidos con PBS para incubar el anticuerpo secundario (Neum 1:100; GFAP 1:100; CD68 1:100) durante 3h a temperatura ambiente, se continuó con dos lavados de 5min y uno de 10 min con PBS, los cortes histológicos fueron montados en porta objetos esterilizados con medio vectachield y DAPI, se sellaron con cubre objetos y barniz comercial. Las imágenes se procesaron por microscopía epifluorescente.

Por último, el análisis cuantitativo del campo óptico de la inmunrreactividad de los rCB2 en las microfotografías de las preparaciones NeuN, GFAP y CD68, se empleó el programa ImageJ®, los parámetros en resolución, saturación y área de captura fueron los mismos para todas las imágenes de todas las preparaciones, se calculó el porcentaje de área para realizar la cuantificación en términos de medias.

Liberación de [^{3}H]-dopamina de Explantes del NAc

Grupos de 10 ratas macho de la cepa *Wistar* fueron sacrificados por decapitación para obtener el tejido encefálico y luego obtener cortes coronales de 300 µm mediante un vibratomo. De los cortes cerebrales obtenidos disecó el tejido del NAc y se le mantuvo en una solución Krebs-Henseleit (KH) a 4ºC y con perfusión constante de una mezcla de O_2/CO_2 (95:5 volumen:volumen). La composición del KH (mM) incluyó NaCl (118.25), KCL (1.75), KH_2PO_4 (1.25), $MgSO_4$ (1), D-glucosa (10), $NaHCO_3$ (25) y $CaCl_2$ (2).

Se incubaron los tejidos durante 30 min en 2mL de fluido cerebro espinal artificial que se preparó con 77 nM [^{3}H]-dopamina (40 Ci/mmol), 10 µM de pargilina (inhibidor del

metabolismo de la DA) y 0.57 mM de ácido ascórbico en una solución de 0.03 nM de EDTA, solución que se usó hasta el término del experimento.

Posteriormente se depositaron 3-4 secciones del NAc en cada cámara de un sistema de perfusión vertical (la solución K-H se perfundió a una velocidad de 0.5 mL/min) controlado con una bomba peristáltica multicanal (Brandel PP120). Como línea base se colectaron 4 muestras con estas condiciones, para posteriormente estimular la liberación de [^{3}H]-DA con la adición de una solución de K^+ de 30mM en K-H y se tomaron 6 colectas. Los fármacos se agregaron en la fracción 3 para registrar los efectos ante el estímulo despolarizante del K^+ (Sánchez-Zabaleta et al., 2018; López-Ramírez et al., 2020).

La radioactividad se determinó agregando a cada muestra 5mL líquido de centelleo de una solución de 1L con la composición de 667 mL de tolueno, 333mL de tritón X-100, POPOP 200 mg. Se recuperó el tejido de cada cámara y se agregó líquido de centelleo para posteriormente colocar las muestras en un contador de centelleo (Beckman Coulter) y se determinó el número de desintegraciones por minuto. Para normalizar los resultados se obtuvo un cociente de la radioactividad presente en cada fracción entre la radioactividad del tejido (Sánchez-Zabaleta et al., 2018; López-Ramírez et al., 2020).

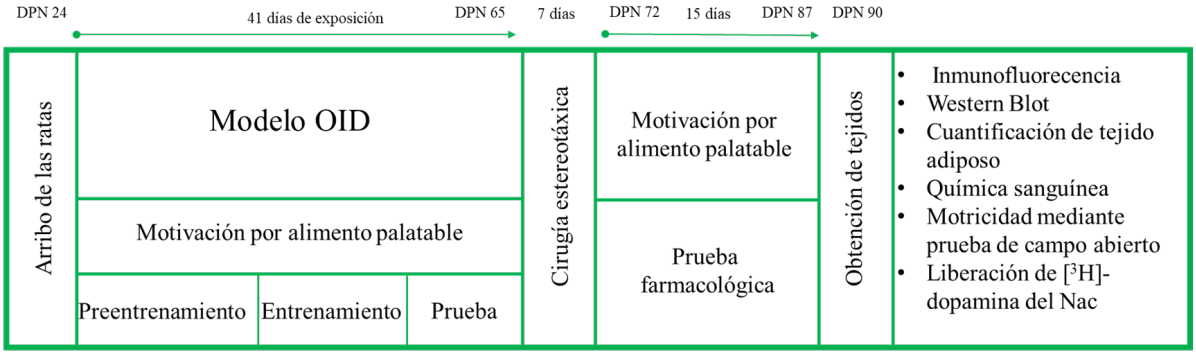
Los experimentos se realizaron de manera secuencial y ordenada. Primero, las ratas fueron sometidas al protocolo de OID y simultáneamente a las fases de preentrenamiento y entrenamiento operante para posteriormente evaluar la motivación por el alimento palatable. Finalizado el periodo de 41 días del modelo OID, se realizaron las cirugías para implantar las cánulas guía en el NAc y después del periodo de recuperación, se obtuvieron los puntos de ruptura en la fase de prueba con el programa de RP y se realizaron las pruebas farmacológicas intra-NAc. Cabe mencionar que se tomaron 8 ratas sin cirugía de cada grupo y se excluyeron del estudio para realizar las pruebas de locomoción mediante la prueba de campo abierto.

Después de realizadas las evaluaciones conductuales tras las manipulaciones farmacológicas, los animales fueron decapitados para obtener los tejidos encefálicos y luego se realizó el análisis histológico de los sitios de inyección y el análisis de expresión del rCB2. Cinco de estos sujetos fueron seleccionados aleatoriamente para evaluar la química sanguínea troncal y el tejido adiposo, de esos sujetos también se realizó el análisis histológico encefálico.

Paralelamente, se decapitó un grupo independiente de 8 ratas experimentalmente ingenuas para extraer los cerebros y disecar el NAc para evaluar Liberación de [^{3}H]-dopamina de explantes del NAc.

Figura 1

Diseño experimental



Nota. Se muestra esquemáticamente las fases por las que pasaron los animales con base a los DPN y cómo se evaluaron las variables dependientes.

Análisis Estadístico

Para la comparación de los grupos sometidos al protocolo de OID, se empleó ANOVA de dos entradas para medidas repetidas, considerando el factor tiempo (días de exposición) y el factor grupo (dieta HF o control), además de la prueba post hoc de post hoc *Šídák*. Para la comparación del peso de los depósitos de grasa corporal de los sujetos de ambos grupos se aplicó la prueba U de Mann-whitney debido a que no se cumplían los supuestos de la estadística paramétrica (distribución normal y homogeneidad de varianzas).

Por su parte, para la comparación de los parámetros de la química sanguínea y de los parámetros de la prueba de campo abierto entre los grupos (HF vs control), se aplicó la prueba *t de student*. Asimismo, el número de respuestas a la palanca activa en los programas de reforzamiento RF1 y RF5 a lo largo del entrenamiento, así como en las 5 sesiones analizadas en las que se evaluaron los puntos de ruptura, fueron comparadas entre los grupos alimentados con la dieta alta en grasas y sus controles empleando un ANOVA de dos entradas de medidas repetidas considerando en factor tiempo (días o sesiones) y el factor grupo, esto seguido de la prueba post hoc de *Šídák* cuando fue apropiado. Las comparaciones en los puntos de ruptura de los sujetos tratados farmacológicamente con los ligandos de los rCB2 se realizaron con ANOVAs de 2 entradas considerando el factor tratamiento y el factor dieta, además de que también se aplicó la prueba post hoc de *Šídák* cuando fue apropiado. El porcentaje del área con inmunoreactividad contra rCB2 + proteínas de neuronas (NeuN), de astroglia (GFAP) o microglía (CD68) se comparó entre los grupos con la dieta alta en grasas y sus controles aplicando pruebas t y mediante un ANOVA de 2 entradas considerando el factor dieta (alta en grasas, control) y el factor estirpe celular (Neun para neuronas, GFAP para astrogía y CD68 para microglía), seguido de la prueba post hoc de *Šídák*. La significancia estadística de las diferencias en todas las comparaciones estadísticas se estableció con un nivel de significancia de α=.05.

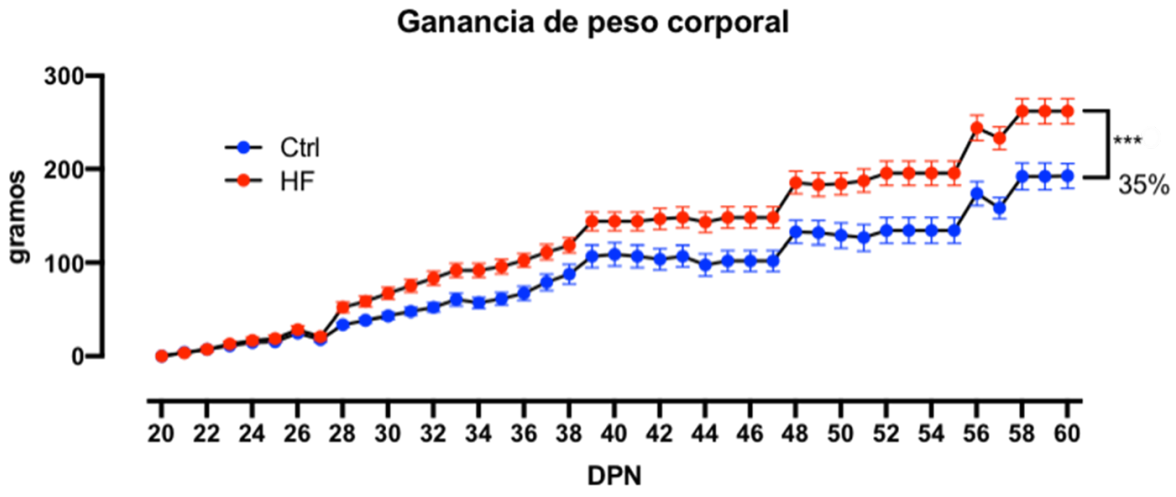
Resultados

Modelo de obesidad inducido por dieta (OID)

El primer objetivo particular del presente estudio fue estandarizar el protocolo para inducir obesidad mediante la exposición a una dieta hipercalórica con alto contenido de grasas. Para lo anterior se consideraron los parámetros de la ganancia de peso y la acumulación de grasa corporal, así como los cambios en las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol total y colesterol de baja densidad. Los sujetos del grupo HF ganaron en promedio 35% más peso corporal que el grupo control al final de los 41 días de exposición con una edad de 65 DPN (factor tiempo $F_{(40,320)} = 372.6$, $p < .001$; factor dieta $F_{(1,8)} = 9.619$, $p < 0.05$; factor interacción $F_{(40,320)} = 10.97$, $p < .001$). El peso corporal de los sujetos que consumieron la dieta HF fue significativamente mayor desde el DPN 44 y hasta el 49 ($p < .05$) y del día 51 hasta el 60 ($p < .001$) (Fig. 2).

Figura 2

Ganancia de peso corporal en el modelo de OID

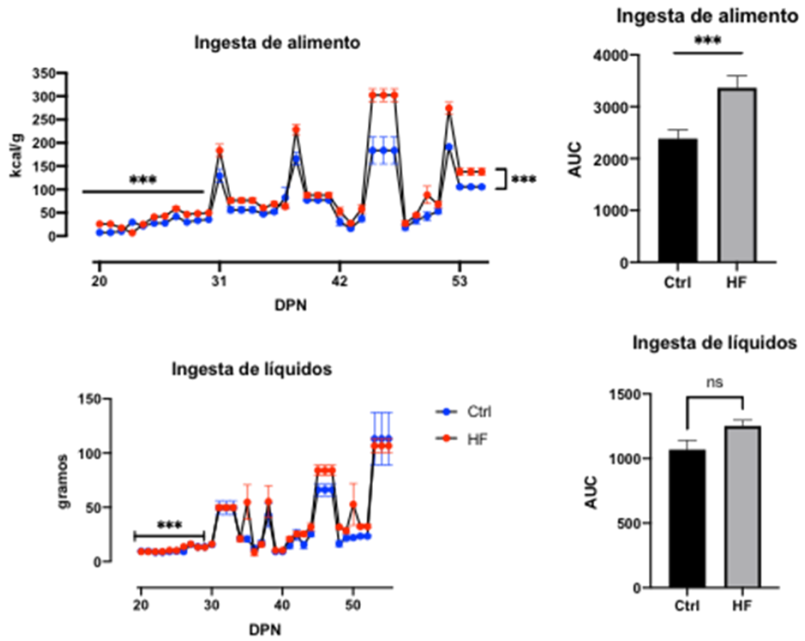


Nota. Ganancia de peso corporal de los sujetos expuestos a la dieta alta en grasas (HF) y sus controles (Ctrl), se encontró un incremento significativo en el grupo HF desde el DPN 44 y hasta el 49 (p<.001) y del DPN 51 hasta el 60 (p<.001). Datos expresados en términos de medias ± el error estándar (S.E.M.) ***p<.001, n=10.

Asimismo, la cantidad (g/kcal) de alimento sólido consumido por los sujetos del grupo HF incrementó significativamente ($F_{(1,8)} = 60.54$, $p < .001$, post hoc $p < .001$) en comparación con el grupo control, en el consumo de líquidos se encontró un incremento significativo en los DPN 20 al 30 (post hoc $p < .001$). Se calculó el área bajo la curva (AUC) y se encontró que el grupo HF consumió más kcal/g con respecto a los controles ($t = 7.750$, $p < .001$), aunque el consumo de líquidos no difirió entre los grupos. Se observaron variaciones en los patrones de consumo, mismos que coincidieron con los días de privación de alimento que necesarios para mantener la conducta operante de las ratas durante las evaluaciones de motivación por alimento palatable (Fig. 3).

Figura 3

Consumo de alimento sólido y de líquidos en el modelo de OID



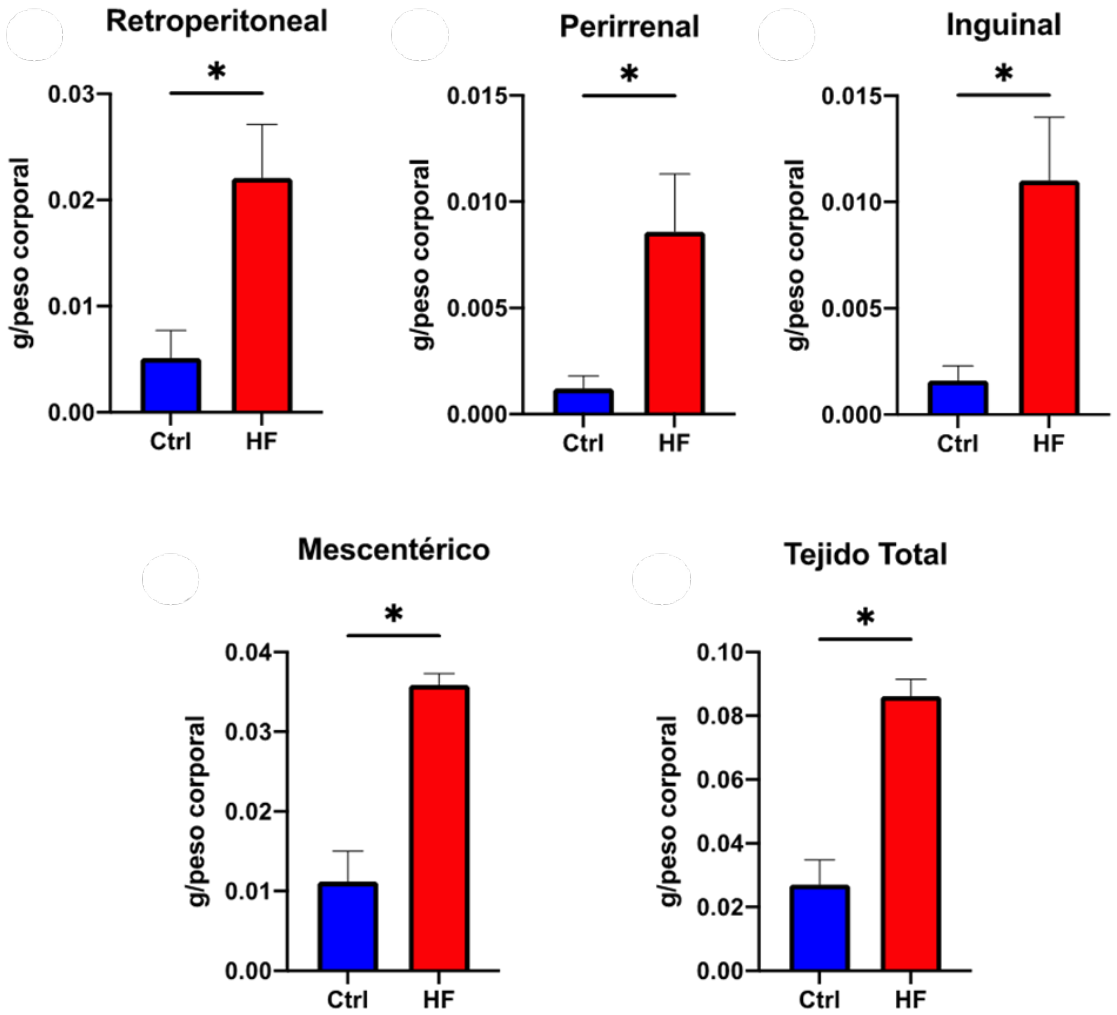
Nota. Consumo de alimento sólido (superior) e ingestión de líquido (abajo) de los sujetos expuestos a la dieta alta en grasas (HF) y sus controles (Ctrl), se encontró un incremento significativo en el consumo de alimento en el grupo HF (p<.001) en los DPN del 20 al 30 (post hoc p<.001), además de encontrar un incremento significativo en la prueba post hoc (p<.001) en la ingesta de líquidos en el grupo control. Datos expresados en términos de medias ± el error estándar (S.E.M.). ***p<.001 dieta HF vs dieta Ctrl, n =10.

Por otro lado, encontramos que la acumulación del tejido adiposo en las ratas alimentadas con la dieta alta en grasas aumentó significativamente en las áreas

retroperitoneal, perirrenal, inguinal, mesentérica y en el tejido graso total (t= 2.672, p< .05; t= 2.277, p< .05; t= 2.642, p< .05; t= 6.824, p< .001; t= 6.563, p< .001, respectivamente) (Fig. 4), pero no en las regiones gonadal ni escapular.

Figura 4

Acumulación del tejido adiposo por regiones

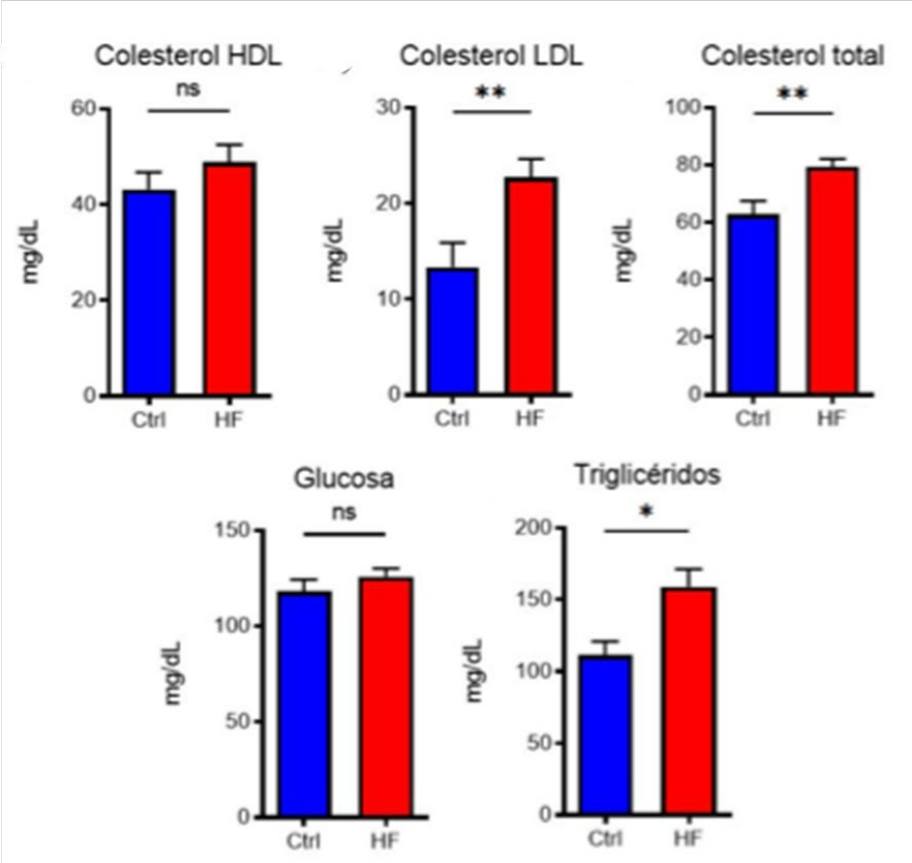


Nota. Se muestra la acumulación retroperitoneal (arriba-izquierda), perirrenal (arriba-centro), inguinal (arriba-izquierda), y total (abajo-derecha) de los sujetos expuestos a la dieta alta en grasas (HF) y sus controles (Ctrl). Datos normalizados al peso corporal de cada sujeto y expresados en términos de medias ±el error estándar (S.E.M.). *p<.05 dieta HF vs dieta Ctrl, n=10.

En consistencia con lo anterior, encontramos en los sujetos alimentados con la dieta alta en grasas aumentos significativos en las concentraciones plasmáticas de colesterol de baja densidad (t= 2.939, p< .01), en el colesterol total (t= 3.023, p< .01) y en los triglicéridos (t= 3.040, p< .05) (Fig. 5). Cómo se esperaba, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la determinación de la glucosa, lo que nos permitió determinar que no eran ratas diabéticas.

Figura 5

Comparaciones en las concentraciones plasmáticas de metabolitos

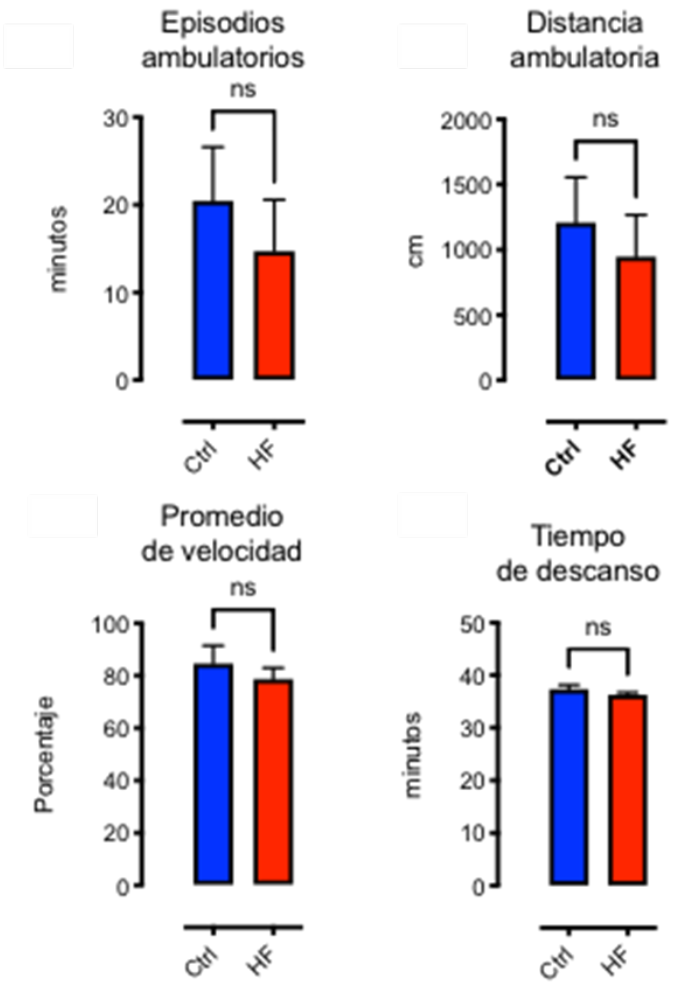


Nota. Comparación de colesterol de alta densidad (arriba-izquierda), colesterol de baja densidad (arriba-centro), colesterol total (arriba-derecha), glucosa (abajo-izquierda), y triglicéridos (abajo-derecha) de los animales expuestos a la dieta alta en grasas (HF) y sus controles (Ctrl). Datos expresados en términos de los promedios de mg por decilitro (mg/dL) ±S.E.M. *p<.05, p<.01 dieta HF vs Ctrl, n=5.

Finalmente, mediante la evaluación de los parámetros de la prueba de campo abierto (episodios ambulatorios, distancia ambulatoria, promedio de velocidad y tiempo de descanso), se determinó que la motricidad gruesa no se afectó significativamente entre los sujetos expuestos a la dieta alta en grasas (Fig. 6).

Figura 6

Parámetros de locomoción en prueba de campo abierto



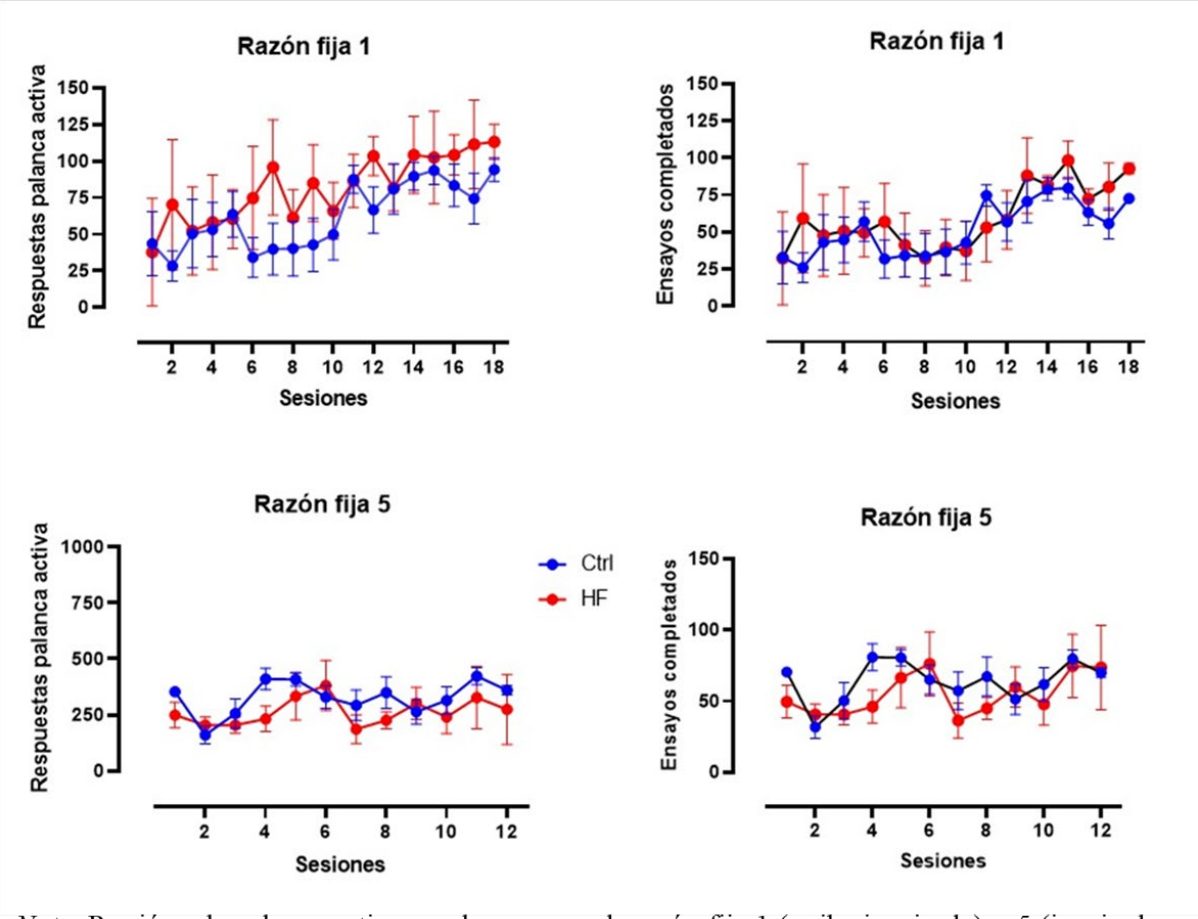
Nota. Episodios ambulatorios (arriba-izquierda), distancia ambulatoria (arriba-derecha), velocidad promedio (abajo-izquierda), y tiempo de descanso (abajo-derecha) de los sujetos expuestos a la dieta alta en grasas (HF) y sus controles (Ctrl). Datos expresados en términos de medias ±S.E.M., n=10.

Evaluación de la Motivación por Alimento Palatable

En función de que el segundo objetivo particular del presente estudio consistió en estandarizar las condiciones del entrenamiento operante para asegurar la evaluación válida de la motivación por el alimento palatable, en la fase de entrenamiento se establecieron los parámetros de estabilidad de la respuesta como criterio de cambio para cada una de las fases. Así, encontramos patrones de adquisición y desempeño operante uniformes en ambos grupos, ya que la emisión de la respuesta en la palanca activa no se encontraron diferencias significativas entre grupos ni en el número de ensayos completados en los programas de razón fija 1 y 5, por lo que se estableció un aprendizaje estable (Fig. 7).

Figura 7

Presiones a la palanca activa en los programas de razón fija



Nota. Presión a la palanca activa en el programa de razón fija 1 (arriba-izquierda) y 5 (izquierda-abajo), y ensayos completados (RF1 arriba-derecha; RF5 abajo-derecha) de los animales expuestos a la dieta alta en grasas (HF) y sus controles (Ctrl). Datos expresados en términos medias ± S.E.M., n=10.

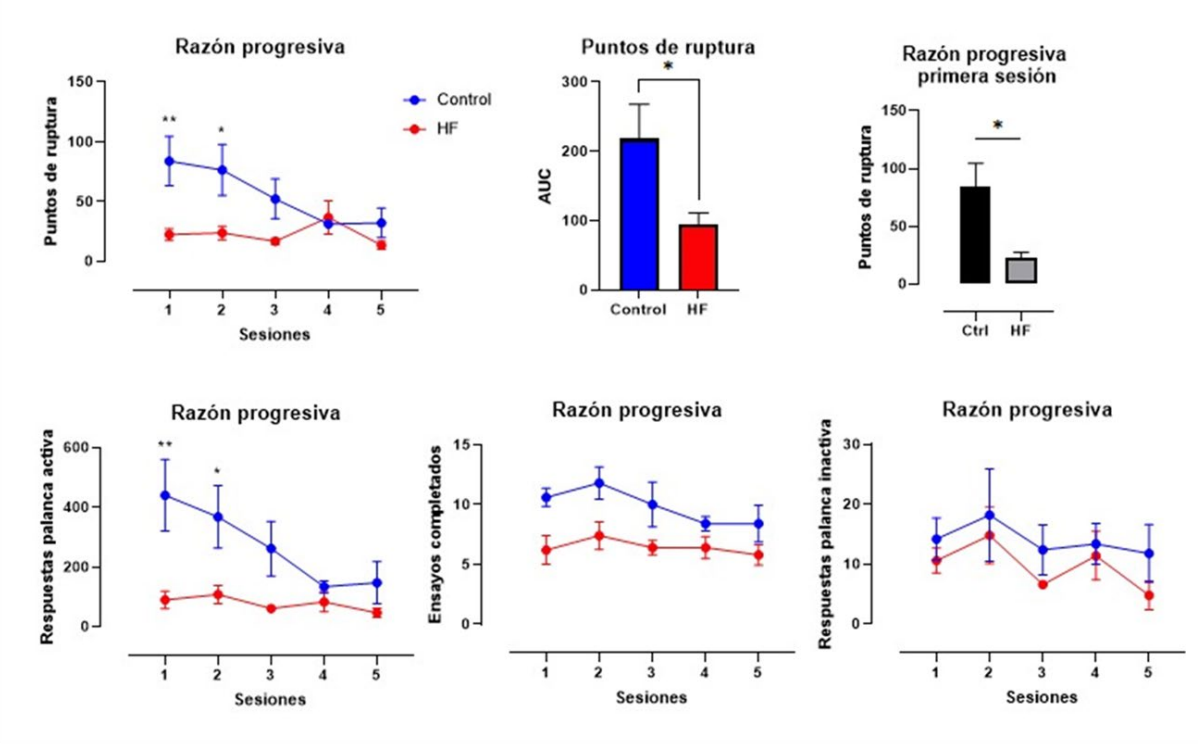
Motivación por el Alimento Palatable en Sujetos Sometidos al Protocolo de OID

Para cumplir el tercer objetivo particular del presente trabajo, se determinaron los efectos de la exposición a la dieta alta en grasas sobre el procesamiento de las propiedades reforzantes del alimento palatable. Así, encontramos que en cinco sesiones en las que se aplicó el programa de reforzamiento de RP, las ratas del grupo HF disminuyeron significativamente sus puntos de ruptura (factor sesiones $F_{(4,32)} = 3.639$, $p < .05$; factor dieta $F_{(1,8)} = 5.862$, $p < .05$; interacción sesiones x grupo $F_{(4,32)} = 4.200$, $p < .01$), específicamente se encontraron diferencias significativas del factor grupo en las sesiones 1 (HF vs control, $p < .01$) y 2 (HF vs Control, $p < .05$). De la serie de cinco sesiones consecutivas en las que se calculó el área bajo la curva (AUC) para conocer la magnitud acumulada del efecto, encontramos que el grupo alimentado con la dieta alta en grasas presentó menor motivación por el alimento palatable ($t = 2.333$, $p < .05$) (Fig. 8).

De la misma forma, encontramos que el número de respuestas a la palanca activa también disminuyó significativamente en el grupo alimentado con la dieta alta en grasas (factor sesiones $F_{(2.721,21.77)} = 5.540$, $p < .01$; factor dieta $F_{(1,8)} = 7.174$, $p < .05$, factor interacción $F_{(4,32)} = 3.528$, $p < .05$), en las sesiones 1 ($p < .01$) y 2 ($p < .05$). Por el contrario, el número de ensayos completados y presiones a la palanca inactiva no fueron diferentes entre los grupos (Fig. 8). El efecto de disminución de la motivación por el alimento palatable a consecuencia de la exposición a la dieta se confirmó desde la comparación de los puntos de ruptura de la primera sesión de la serie de cinco sesiones ($t = 3.396$, $p < .05$) (Fig. 8).

Figura 8

Parámetros de respuestas operantes



Nota. Respuestas operantes de los animales expuestos a la dieta alta en grasas (HF) y sus controles (Ctrl), obtenidos con la aplicación del programa de RP, incluyendo los puntos de ruptura (arriba-izquierda), las presiones de la palanca activa (abajo-izquierda), los ensayos completados (abajo-centro), las respuestas a la palanca inactiva (abajo-derecha), así como el área bajo la curva de los puntos de ruptura de las 5 sesiones evaluadas (arriba-centro) y los puntos de ruptura de la sesión 1 (arriba-derecha). Datos expresados en términos medias ± S.E.M. *p<.05, **p<.01 dietas HF vs Ctrl, n=10.

Efectos de la Activación de los rCB2 del NAc Sobre la Motivación por Alimento Palatable en Ratas Sometidas al Protocolo de OID

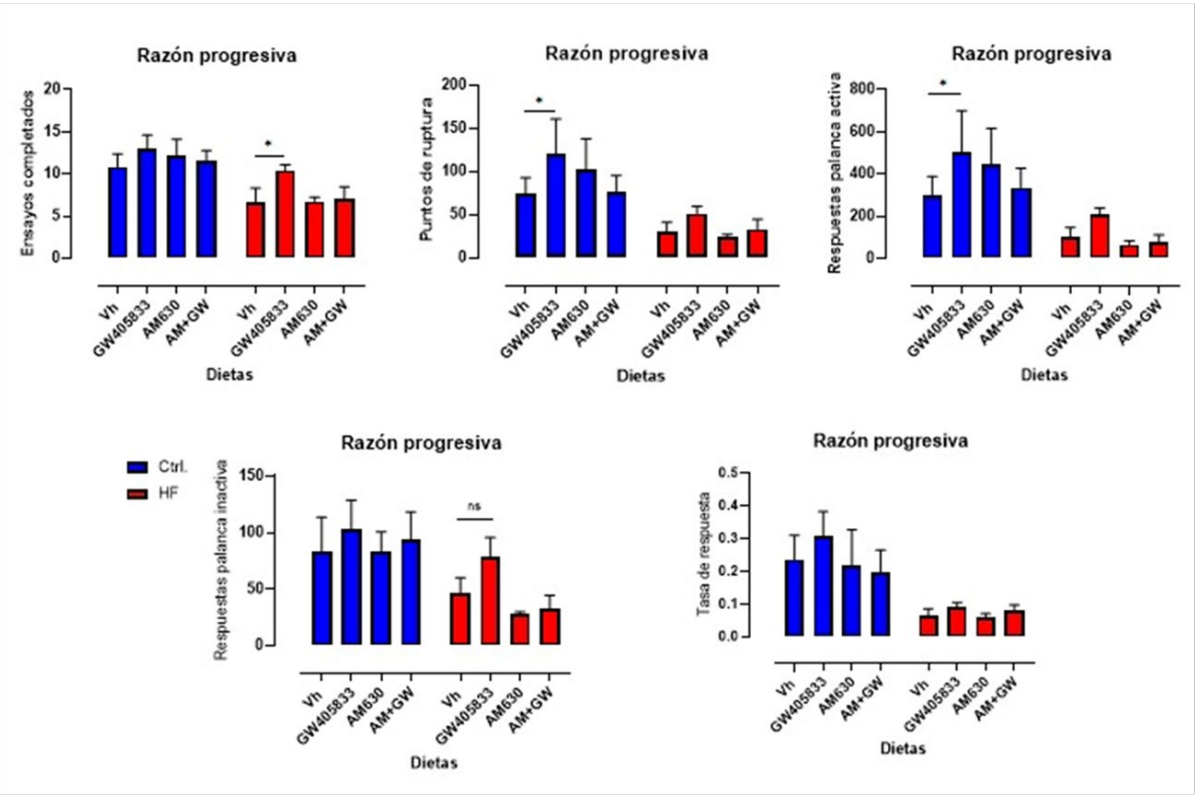
Como cuarto objetivo de la tesis se determinó conocer la participación de los rCB2 sobre la motivación por alimento palatable tras la exposición del modelo OID. Encontramos que la administración intra-accumbens del agonista selectivo de los rCB2 (GW405833, 0.5µg/0.5µL) no modificó significativamente los puntos de ruptura de las ratas del grupo HF. Contrario a lo anterior, sí encontramos que el mismo tratamiento con el agonista de los rCB2 produjo un incremento significativo (factor tratamiento $F_{(3,12)} = 2.227$; $p < .05$; factor dieta $F_{(1,4)} = 4.210$, $p < .05$, interacción entre tratamiento x dieta $F_{(3,10)} = 1.878$, $p < .05$) en los puntos de ruptura de las ratas del grupo alimentado con la dieta control (vh vs GW, $p < .05$), además de que dicho efecto fue prevenido por el antagonista AM 630 (Fig. 9).

En los ensayos completados por sesión, observamos diferencias significativas en el grupo tratado con el agonista de los rCB2 de los sujetos alimentados con la dieta HF (factor tratamientos $F_{(3,12)} = 4.626$, $p < .05$; factor dieta $F_{(1,4)} = 5.528$, $p < .05$, interacción tratamiento x dieta $F_{(3,10)} = 0.7213$, $p < .05$), específicamente aumentó el número de ensayos completados en los sujetos alimentados con la dieta HF con el tratamiento del agonista de los rCB2 ($p < .05$) (Fig. 9).

Por su parte, el número de presiones a la palanca activa aumentó significativamente por el tratamiento con el agonista de los rCB2 en el grupo alimentado con la dieta control (Vh vs GW, $p <. 05$), pero no en el grupo HF la palanca inactiva (grupo HF) y en la tasa de respuesta (grupo HF) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos o condiciones (Fig. 9).

Figura 9

Parámetros de la conducta operante en el programa de RP con los tratamientos farmacológicos



Nota. Conducta operante en los programas de RP en términos de ensayos completados (arriba-izquierdo), puntos de ruptura (arriba-centro), presiones a la palanca activa (arriba-derecha), presiones a la palanca inactiva (abajo-izquierda), y tasa de respuesta (abajo-derecha) de los animales alimentados con la dieta alta en grasas (HF, barras rojas) o con la dieta control (Ctrl, barras azules) que recibieron los tratamientos farmacológicos con los ligandos de los rCB2. Datos expresados en términos de medias ± E.S.M. *p<.05; ns=no significativo , n=10.

Determinación de la Expresión de los rCB2 del NAc en Ratas Expuestas al Protocolo de OID

El quinto objetivo particular del presente trabajo se consistió en determinar si la expresión de los rCB2 se modificaba con la exposición a la dieta HF. Para lo anterior, se evaluó en cinco núcleos del circuito de la recompensa de la rata la densidad de expresión del receptor mediante la técnica de Western Blot. Las regiones de interés incluyeron a la corteza prefrontal (CP), al núcleo accumbens (NAc), al hipotálamo ventral (HV) y dorsal (HD) y al área tegmental ventral (ATV), además de que se incluyó como control negativo (-, línea HEK) en ambos grupos, los alimentados con la dieta alta en grasas (HF) y la dieta control (Ctrl). De tal forma y con base los parámetros previamente descritos (Ashton et al., 2006), se realizó un análisis cualitativo de la expresión del rCB2, en el que se observó que los sujetos alimentados con la dieta alta en grasas tenían una mayor expresión del rCB2 en la fracción sinaptosomal del tejido de la CP, HD y VTA del grupo expuesto a la dieta HF, mientras que en NAc y el Hv disminuyó (Fig. 10).

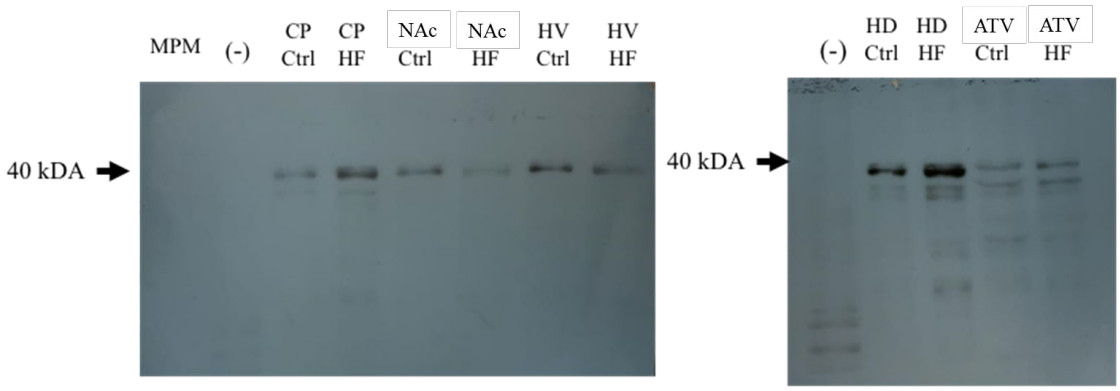


Fig. 10. Fotografías del inmunoblot en el que se muestra la expresión de los rCB2 de la fracción sinaptosomal en las regiones de interés de los sujetos alimentados con la dieta alta en grasas (HF) o con la dieta control (Ctrl). CP= corteza prefrontal, NAc= núcleo accumbens, HV= hipotálamo ventral, y HD= hipotálamo dorsal, VTA= área tegmental ventral. Las bandas reveladas corresponden a los 40kDA (flecha negra), peso molecular de los rCB2.

Adicionalmente, se determinó si los rCB2 se expresan en distintas estirpes celulares del NAc (neuronas, microglía y astroglia) y si dicha expresión se

modificaba por efecto de la exposición a la dieta alta en grasas mediante una técnica inmunohistoquímica.

Así, encontramos que los rCB2 se expresan en las tres estirpes celulares, neurona (NeuN), astroglia (GFAP) y microglía (CD68), además de que los patrones de expresión parecen modificarse por efecto de las dietas que consumían los sujetos. Se muestran las imágenes obtenidas con la superposición inmunorreactiva contra rCB2 + NeuN + DAPI para el grupo HF (Fig. 11e-h) y grupo Ctrl (Fig. 11a-d) en la misma región. Las imágenes que muestran simultáneamente la inmunorreactividad contra rCB2 + GFAP + DAPI del grupo HF (Fig. 12e-h) y al grupo Ctrl (Fig. 12a-d). Finalmente, aunque no identificamos sitios con inmunorreactividad contra rCB2 + CD68 + DAPI en el grupo HF (Fig.13e-h), si lo encontramos en el grupo Ctrl (Fig. 13a-d).

Al realizar la cuantificación de la densidad óptica de los rCB2 en las fotomicrografías de las preparaciones de NeuN, GFAP y CD68, encontramos un decremento significativo (t= 4.719, p< .001) del grupo HF con respecto al grupo control y se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los factores dieta (factor dieta $F_{(1,29)}$= 13.95, p< .001) y al tipo de estirpe celular que se evaluó (factor grupo $F_{(2,29)}$= 2.29, p< .05) y una interacción entre factores (interacción dieta X grupo $F_{(2,29)}$= 8.626, p< .001). Específicamente, se observó que en los sujetos alimentados con la dieta alta en grasas disminuyó significativamente la inmunorreactividad contra rCB2 + GFAP con respecto al grupo control (p< .001) (Fig. 14).

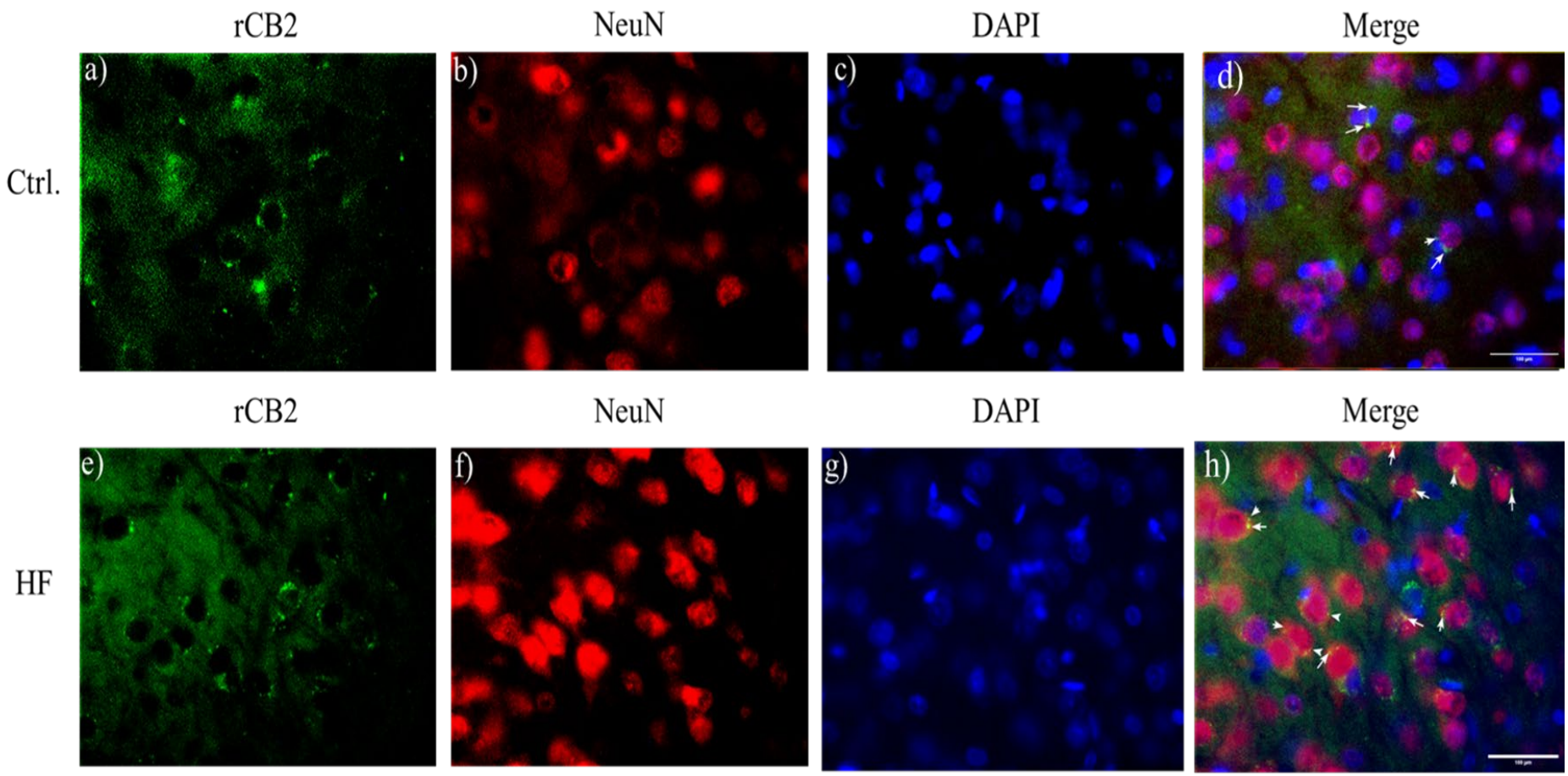


Fig. 11. Se muestra en a) y e) la inmunorreactividad de los sitios de reconocimiento para el rCB2 en el NAc de ratas Ctrl y HF respectivamente, en b) y f) se muestra la inmunorreactividad de células de estirpe neuronal positivas a NeuN del grupo Ctrl y HF respectivamente, en c) y g) se muestra la inmunorreactividad de los núcleos celulares positivos a DAPI del grupo Ctrl y HF respectivamente, en d) y h) se muestran las superposiciones (cabezas de flecha) de los canales de CB2+NeuN+DAPI para determinar la presencia de los rCB2 en neuronas del Nac en las ratas expuestas al modelo OID. Escala en 100µm.

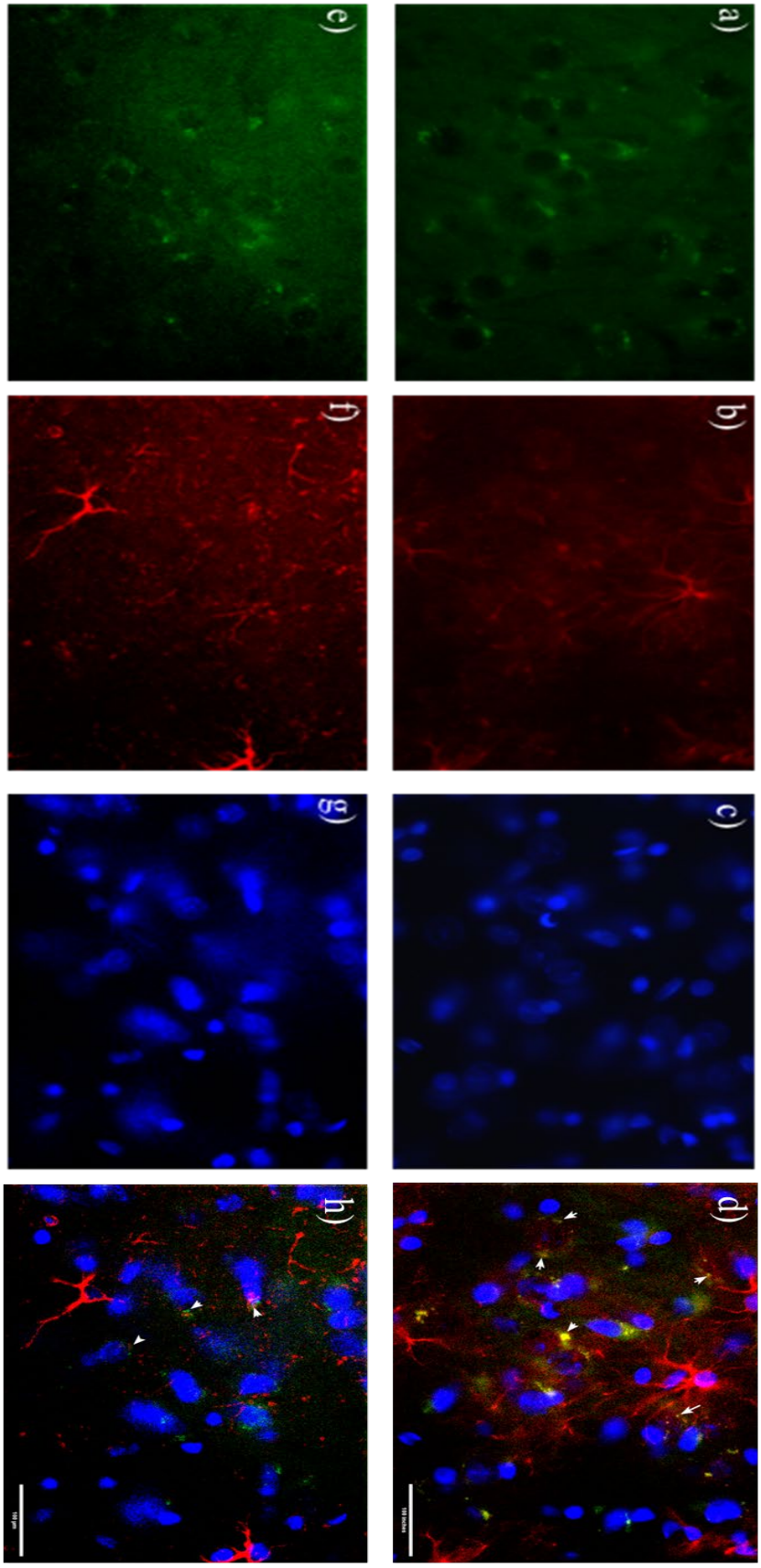


Fig. 12. Se muestra en a) y e) la inmunorreactividad de los sitios de reconocimiento para el rCB2 en el NAc de ratas Ctrl y HF respectivamente, en b) y f) se muestra la inmunorreactividad de células de estirpe neuronal positivas a GFAP del grupo Ctrl y HF respectivamente, en c) y g) se muestra la inmunorreactividad de los núcleos celulares positivos a DAPI del grupo Ctrl y HF respectivamente, en d) y h) se muestran las superposiciones (puntas de flecha) de los canales de CB2+GFAP+DAPI para determinar la presencia de los rCB2 en neuronas del Nac en las ratas expuestas al modelo OID. Escala en 100µm.

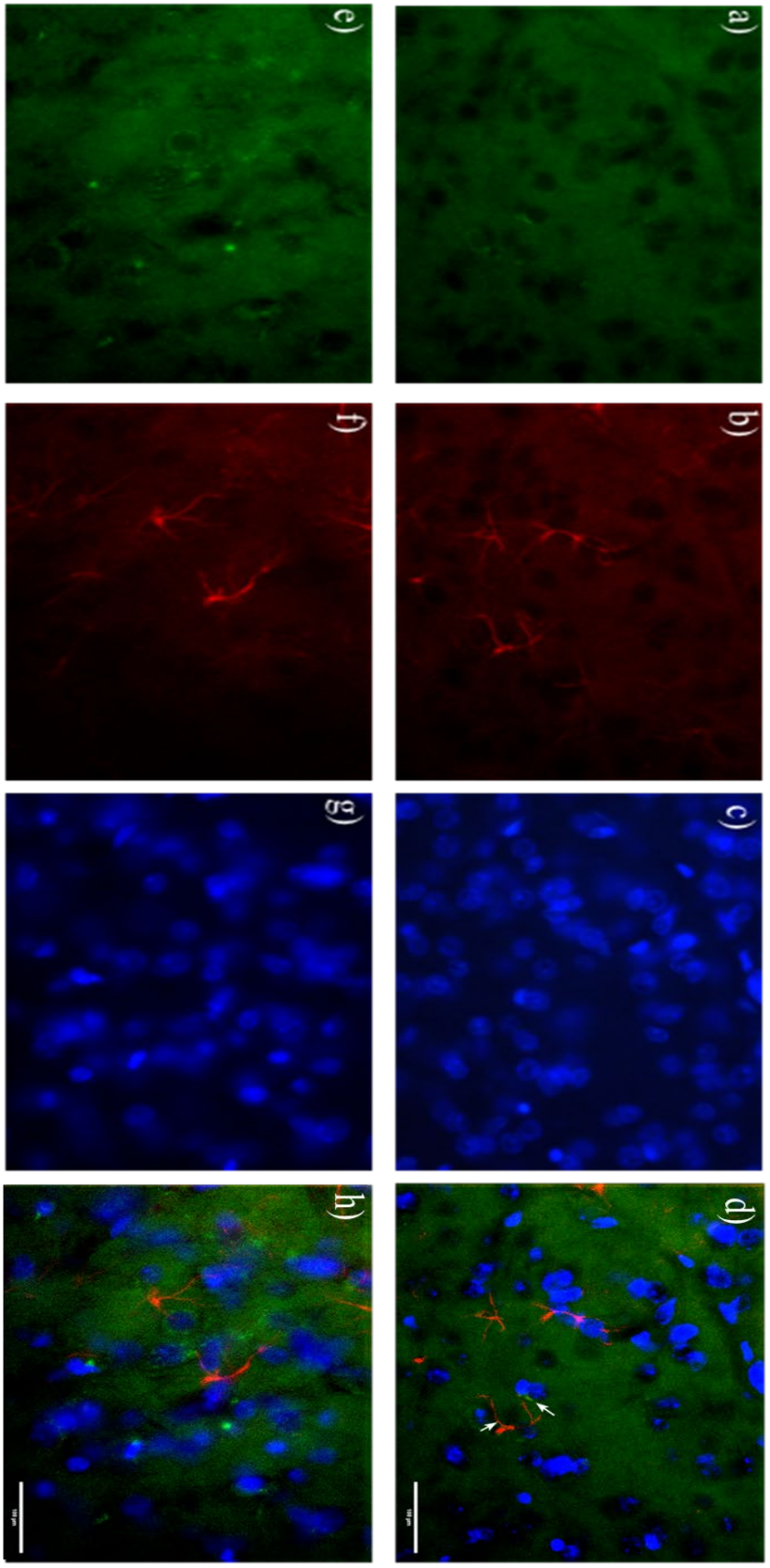
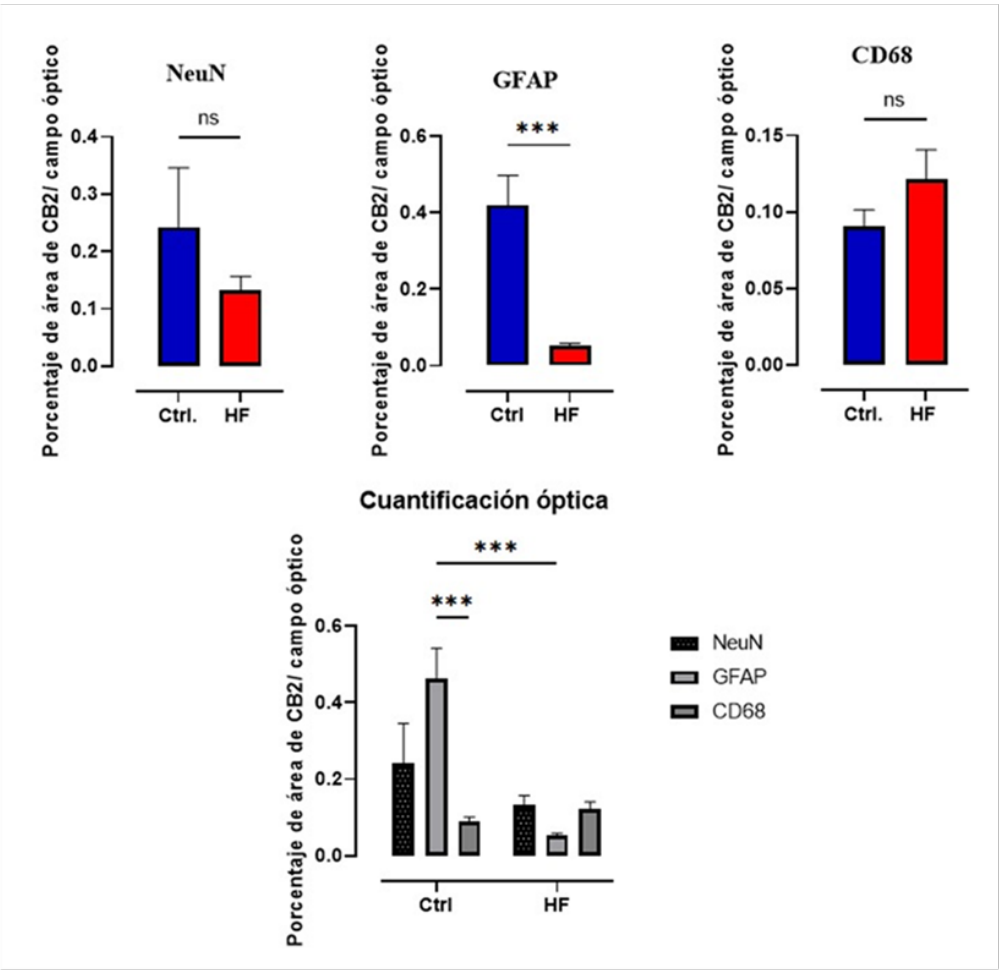


Fig. 13. Se muestra en a) y e) la inmunorreactividad de los sitios de reconocimiento para el rCB2 en el NAc de ratas Ctrl y HF respectivamente, en b) y f) se muestra la inmunorreactividad de células de estirpe neuronal positivas a CD68 del grupo Ctrl y HF respectivamente, en c) y g) se muestra la inmunorreactividad de los núcleos celulares positivas a DAPI del grupo Ctrl y HF respectivamente, en d) y h) se muestran las superposiciones (cabezas de flecha) de los canales de CB2+CD68+DAPI para determinar la presencia de los rCB2 en microglia del Nac en las ratas expuestas al modelo OID. Escala en 100µm.

Figura 14

Cuantificación del porcentaje del área del rCB2 por campo óptico



Nota. Cuantificación del porcentaje de área del rCB2 por campo óptico de las microfotografías de las tres preparaciones para NeuN (arriba-izquierda), GFAP (arriba-derecha), y el resumen (debajo) de todas las estirpes celulares que se evaluaran en ambos grupos alimentados con la dieta alta en grasas (HF, barras azules), y el alimentado con dieta control (Ctrl, barras rojas). Datos expresados en términos de medias ± E.S.M. ***p<.05; ns=no significativo, n=6.

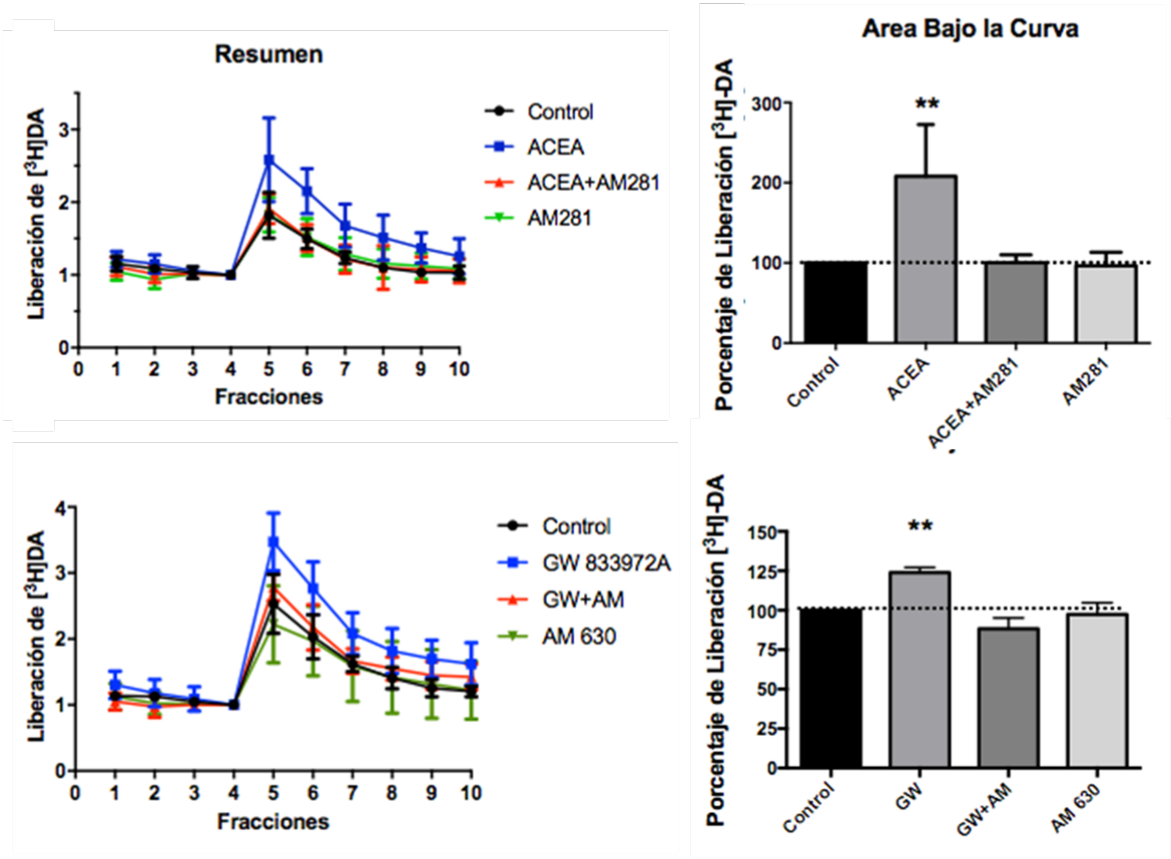
Evaluación de los Efectos de la Activación de los rCB2 sobre la Liberación de [^{3}H]DA en el NAc

Como último objetivo particular se estableció evaluar un mecanismo efector de la activación de los rCB2 en el NAc, considerando que ante el consumo de reforzadores naturales y sintéticos se libera DA en el este núcleo cerebral (Xi et al., 2011; Melis et al., 2007). Así, en un primer momento se evaluaron los efectos de la activación de los rCB1 sobre la liberación de [^{3}H]DA en tejidos de NAc de la rata y encontramos un aumento significativo de la liberación de DA marcada como resultado de la adición al medio del agonista de los rCB1, ACEA (100nM). Dicho efecto fue completamente prevenido por la adición del antagonista selectivo de los rCB1, AM 281 (100nM). A partir de lo anterior, establecimos un sistema *in vitro* válido y sensible, para posteriormente determinar si los rCB2 también contribuyen con la regulación de la liberación de DA inducida por el aumento de la concentración de K^+ en explantes del NAc.

De acuerdo con nuestros resultados, la liberación de [^{3}H]DA inducida por el pulso despolarizante con K^+ en el NAc fue estimulada por la presencia del agonista farmacológico de los rCB2, GW833972A (100nM). Este incremento fue significativo ($F_{(1,6)}$= 9.565, p< .001; n= 6) respecto a la condición vehículo. En la misma serie de experimentos incluimos una condición en la que los rCB2 fueron bloqueados con el antagonista AM 630 (100nM) y encontramos que el efecto estimulatorio del GW833972A fue completamente prevenido por la adición del antagonista. Los hallazgos anteriores proporcionan la evidencia de la selectividad farmacológica del GW833972A sobre los rCB2 del NAc (Fig. 15)

Figura 15

Liberación fraccional de [3H]DA en tejidos del NAc



Nota. Liberación fraccional de [3H]DA inducida por el pulso despolarizante de la adición de solución con alto K^+ (15nM) a partir de la fracción 5 en las diferentes condiciones farmacológicas de las manipulación de los rCB1 (arriba-izquierda), rCB2 (abajo-izquierda). Los insertos de la derecha muestran el cálculo del área bajo la curva expresado en porcentajes de la liberación fraccional basal de [3H]DA (colectas de las fracciones 1-4) en las distintas condiciones farmacológicas de la manipulación de los rCB1 (arriba-derecha), rCB2 (abajo-derecha). Datos expresados en términos de medias ± E.E.M. La línea punteada horizontal señala el promedio porcentual de referencia de la liberación basal de [3H]DA. **p<.01 vs la situación control, n=6.

Discusión

El presente estudio tuvo como principal objetivo establecer si en los sujetos con obesidad inducida por la exposición crónica a una dieta con alto contenido de grasas se producían cambios en la motivación por alimento palatable, además de conocer si esta condición se acompaña de alteraciones en la respuesta a la activación de los rCB2 del NAc de la rata. Así, nuestro principal hallazgo consiste en que los sujetos a los que se les indujo obesidad fueron menos sensibles a las propiedades reforzantes del alimento palatable, pues cuando se evaluaron con el programa de RP tuvieron puntos de ruptura menores. Este efecto que no se explica por una capacidad motora disminuida ya que, aunque los sujetos eran significativamente más pesados y con mayor grasa corporal acumulada, la prueba de campo abierto no evidenció alteraciones motoras. Asimismo, después de que los sujetos fueron expuestos crónicamente a la dieta obesogénica, la activación de los rCB2 falló en producir el aumento en los puntos de ruptura en el programa de reforzamiento de RP observado en los sujetos alimentados con la dieta control cuando se les administró el agonista de los rCB2 en el NAc. Finalmente, los resultados descritos se asociaron a una menor densidad de expresión de la proteína de los rCB2 en el NAc y en el hipotálamo ventral.

De acuerdo con los parámetros de Hariri y Thibault (2010), el modelo de OID implementado en este estudio es equivalente a una obesidad moderada, ya que la ganancia de peso corporal entre el grupo expuesto a la dieta alta en grasas fue en promedio 25% mayor que los controles (se considera obesidad severa cuando la diferencia alcanza el 40%). Lo anterior permitió emular las condiciones iniciales del desarrollo de la obesidad para identificar los cambios en la motivación por alimento palatable y en la expresión funcional de los rCB2 que potencialmente podrían contribuir con el mantenimiento de la ganancia de peso hasta llegar a estadios más avanzados de la obesidad.

Aunque nosotros no evaluamos todos los parámetros antropométricos equivalentes para el diagnóstico de la obesidad en humanos, sí se incorporaron otros indicadores como la acumulación de grasa corporal y la evaluación de la química sanguínea. De tal forma, nuestros resultados son consistentes con otros reportes que muestran que las dietas altas en grasas facilitan la adipogénesis (principalmente en regiones retroperitoneal, perirrenal, inguinal, mesentérico y total), así como el incremento de las concentraciones plasmáticas de glucosa, triglicéridos y colesterol (Hariri & Thibault, 2010).

Por otro lado, la evaluación de la motivación mediante los puntos de ruptura usando programas de RP es ampliamente reportada en la literatura para determinar preferencias de la ingestión de azúcar, leche endulzada, soluciones alcohólicas y no alcohólicas en términos de *liking* y *wanting* (Kissileff & Herzog, 2018). El uso del programa de reforzamiento de RP permitió evaluar el costo de esfuerzo que está dispuesto a realizar un sujeto por un estímulo reforzante, lo que ofrece información experimentalmente válida sobre la motivación por el alimento palatable con base en la respuesta operante. Así, el modelo de OID que se empleó en este trabajo permitió establecer las condiciones idóneas para caracterizar las alteraciones conductuales en términos de motivación a la vez que se evaluó la respuesta a la manipulación farmacológica de los rCB2.

Aunque el desempeño operante de los sujetos durante la fase de entrenamiento (previo a la cirugía, con programas de RF) no difirió significativamente por efecto de la dieta, cuando los sujetos se evaluaron con el programa de RP, se observó desde la primera sesión que las ratas del grupo alimentado con la dieta alta en grasas tuvieron menores puntos de ruptura que el grupo control. Este efecto negativo de la dieta alta en grasas sobre el desempeño en la prueba que evalúa la motivación por alimento palatable es consistente con los hallazgos reportados en modelos animales de anhedonia en primates no-humanos y ratones (Alexander et al., 2019; Ferenczi et al., 2016). Tal es el caso de los primates no humanos que tras ser sometidos a

protocolos de inducción de depresión por sobreestimulación de receptores a glutamato en la corteza cingulada anterior, disminuyeron su motivación por agua dulce aun ante una privación de líquidos.

En concordancia con lo anterior, en el experimento de Ferenczi et al. (2016), encontraron que ratones a los que se les aplicó sobre excitación de la CPF y el silenciamiento de las fibras dopaminérgicas en el ATV, disminuyen la búsqueda de alimento y son menos sensibles a las propiedades reforzantes de los estímulos, semejante a lo que sucede ante al aumento crónico del tono dopaminérgico en el NAc sumado a la sobre excitación en la CPF.

Por otro lado, nuestro resultado de que la activación de los rCB2 con GW 405833 en el NAc únicamente estimuló la motivación por alimento palatable en el grupo control, a pesar de que durante la fase de entrenamiento ambos grupos tuvieron un desempeño operante semejante, confirma la idea de que el SEC está alterado en la condición de obesidad. Este hallazgo es compatible con los estudios que han encontrado cambios en las concentraciones plasmáticas de endocannabinoides (humanos y animales), así como de la expresión de rCB1 (Schultz et al., 2021), aunque hasta donde sabemos, este es de los primeros reportes que encuentran que la obesidad no sólo está asociada a la disminución de respuesta a la activación de los rCB2, sino que también se producen cambios en la expresión de estos receptores en el NAc.

El efecto específico sobre la respuesta a la activación de los rCB2 que encontramos en los sujetos sometidos al protocolo de OID es consistente con reportes previos que mostraron que la obesidad disminuye la expresión funcional de los rCB2 en tejidos periféricos (Deveaux et al., 2009), aunque nosotros extendimos este hallazgo al encontrar que en el sistema nervioso y particularmente en el circuito de la recompensa disminuye la respuesta a los agonistas de los rCB2, además de que la expresión de la proteína del receptor también disminuye. Lo anterior sugiere que, en condiciones normales, los rCB2 podrían cumplir una función protectora contra la ganancia de peso excesivo, pero con el consumo constante de la dieta hipercalórica y con la

resultante disminución de la expresión de estos receptores, eventualmente los sujetos desarrollan obesidad. Lo anterior está sustentado en los reportes que muestran que la administración crónica con agonistas selectivos de los rCB2 previene la obesidad en modelos de OID en ratón (Verty et al., 2015). Adicionalmente, cabe señalar que la expresión funcional de los rCB2 en el NAc naturalmente cambia durante las distintas etapas del desarrollo, pues por ejemplo en la vejez, se ha observado que la expresión de estos receptores disminuye y esto se correlaciona con disminución de la motivación por alimento palatable (Amancio-Belmont et al., 2016).

La exposición a dietas altas en grasas y dietas ricas en azúcares a edades tempranas han mostrado promover alteraciones epigenéticas, principalmente en células somáticas en las que el transcriptoma es susceptible de modificaciones por la información del ambiente, incluso hay disponible un banco de CpG (5´-C-fosfato-G-3´), residuos de dinucleótidos, que metilan al ADN en la secuencia de una citosina seguida por una guanina que se correlacionan con el incremento del IMC, en humanos y murinos (Ling & Rönn, 2019).

Con los experimentos que realizamos para determinar si la OID produce cambios en la expresión de los rCB2 en distintos núcleos del circuito de la recompensa, mediante Western Blot encontramos que el rCB2 se expresa en la fracción sinaptosomal de las distintas regiones analizadas y, más importante aún, que tiende a disminuir en el NAc cuando los sujetos son alimentados con la dieta alta en grasas. Específicamente, encontramos que la exposición a la dieta alta en grasas produce disminución de la proteína del receptor en el NAc y en el Hv, mientras que, en la CPF, HD y en el ATV tiende a aumentar. Paralelamente, con el análisis inmunohistoquímico logramos determinar que los rCB2 se expresan tanto en neuronas como en células gliales y, particularmente la inmunorreactividad contra rCB2 + GFAP (astroglia) disminuyó su significativamente en los sujetos que fueron alimentados con la dieta alta en grasas.

Con base en los resultados de los análisis de expresión de los rCB2, estudios posteriores deberían establecer en qué tipo de neurona se expresan estos receptores y específicamente el compartimento celular en el que se encuentran. Particularmente importante es nuestro hallazgo de que los rCB2 se expresan en astroglia, ya que esto es compatible con la idea de que los cannabinoides modulan el tono glutamatérgico de regiones específicas del cerebro. Lo anterior se fundamenta en los hallazgos de que los rCB2 en células gliales pueden modular la actividad neuronal en la CPF (Serrat et al., 2021), así como en el hipocampo (Li & Kim, 2017), pues también es conocido que los rCB2 pueden modular potenciales de acción (Atwood et al., 2012; de Boon et al., 2012; de Boon et al., 2014; Stempel et al., 2016).

Por otro lado, se ha establecido que la densidad de expresión de los rCB1 en el NAc es mayor que la de los rCB2 (Joshi & Onaivi, 2019), además de que los agonistas de los rCB1 producen consistentemente aumento de la liberación de DA (Oleson et al., 2013; Sperlágh, 2009). Con base en los resultados de nuestros experimentos de liberación de [^{3}H]DA del NAc, confirmamos el efecto estimulatorio de los rCB1 sobre la liberación [^{3}H]DA en el NAc y lo tomamos como referencia para establecer la contribución de los rCB2 en la modulación de la liberación de DA. Así, encontramos que con la activación de los rCB2 también se estimula la liberación de la DA marcada, aunque el efecto fue de menor magnitud de lo observado con el agonista de los rCB1. Cabe señalar que los experimentos de liberación de [^{3}H]DA en explantes del NAc fueron realizados en sujetos que no fueron expuestos a la dieta con alto contenido de grasas. Dado el patrón de expresión de ambos receptores, es posible que, aunque el efecto es cualitativamente semejante, los mecanismos que lo producen sean independientes. Con base en la evidencia conocida, la regulación cannabinoide de la liberación de DA mediada por el rCB1 podría ocurrir en la presinápsis de las espinosas medianas y probablemente en la post sinapsis de neuronas glutamatérgicas (Joshi & Onaivi, 2019), mientras que los rCB2 podría ejercer su acción moduladora probablemente sobre la DA modificando la actividad

glutamatérgica vía rCB2 en células gliales (Atwood et al., 2012; de Boon et al., 2012; de Boon et al., 2014; Li & Kim, 2017; Stempel et al., 2016; Serrat et al., 2021).

Considerando en conjunto los efectos de la exposición continua a la dieta alta en grasas sobre la motivación, así como en la expresión de los rCB2 en el NAc y su sensibilidad a la activación farmacológica, es posible sugerir que al disminuir la funcionalidad de los rCB2 también disminuye la sensibilidad a las propiedades reforzantes del alimento palatable, por lo que se pierde la acción inhibitoria de la alimentación de estos receptores, favoreciendo las condiciones para establecer un patrón de alimentación que facilitará la generación de obesidad (Frank et al., 2019). Esta hipótesis es compatible con la idea de que los rCB2 actúan como el *freno* de conductas asociadas a la impulsividad, la hiperlocomoción y con en el abuso de consumo de reforzadores que incluye el alimento palatable y/o el alto en grasas (Canseco-Alba et al., 2019; Liu et al., 2017). De tal forma, la exposición crónica a una dieta con alto contenido de grasas y carbohidratos (en este estudio con la sacarosa en solución) en etapas tempranas del desarrollo podría favorecer los cambios que posteriormente configuren un patrón conductual que mantiene la ganancia excesiva de peso, acumulación de grasa corporal y un circuito de la recompensa menos sensible, además de los cambios metabólicos característicos de la obesidad que precede a otras condiciones como la diabetes tipo II y el síndrome metabólico.

Limitaciones

Es pertinente mencionar que la tarea de RP no logra controlar el costo de demora en los ensayos al prolongar el requerimiento de respuesta, lo que puede desgastar la emisión de la operante, incluso tener un efecto de extinción. Así, desde la perspectiva de la economía conductual, se puede considerar el desgaste temporal de la respuesta (Cordony et al., 2018; Epstein et al., 2007). Sin embargo, aún con esta limitación metodológica en la tarea de RP, es posible aproximarse a los elementos de motivación tal y como se estableció en el presente

estudio, ya que el constructo *punto de ruptura* definido como el mayor costo de esfuerzo de un sujeto por un estímulo reforzante, es válido y permite evaluar cuantitativamente un criterio subjetivo presente en la conducta alimentaria en humanos y ratas, con ello, conocer una variable que es parte del modelo biopsicosocial de la obesidad (Wiss et al., 2020).

Conclusiones

Tomando en conjunto los resultados del presente estudio, concluimos que la obesidad inducida por la exposición crónica a una dieta con alto contenido de grasas genera que el circuito de la recompensa sea menos sensible a las propiedades reforzantes del alimento palatable, además de que disminuye la respuesta a la activación farmacológica de los rCB2 del NAc, efecto asociado a la disminución de la expresión de estos receptores en neuronas y células gliales (astroglia) en el NAc.

Perspectivas

Futuros estudios podrían integrar la participación de los rCB1 y rCB2 de neuronas y células gliales en un circuito local en el NAc. Dado que la liberación de DA en este núcleo determina en gran medida si una conducta se consuma o no, es necesario explicar cómo el procesamiento de la información en el NAc modifica la actividad de la CPF y viceversa, además de incorporar en la información de áreas infralímbicas, prelímbicas y la corteza cingulada anterior, que en su conjunto permiten la selección y emisión de un determinado comportamiento. Adicionalmente, es necesario conocer si hay cambios epigenéticos ante la exposición crónica de una dieta alta en grasas en edades tempranas y, de ser así, describir cuáles son. Por último, se pueden mejorar las tareas que evalúan motivación agregando en un programa de condicionamiento concurrente reforzadores dulces y salados, para conocer si los sujetos a los que se les induce obesidad están más motivados por alimentos palatables con diferentes propiedades organolépticas.

Referencias

Ahmed, S.A., Ross, S.A., Slade, D. Radwan, M.M., Zulfiar, F., Matsumoto, R.R., Xu, Y.T., Viard, E., Speth, R.C., Karamyan, V.T. & ElSohly, M.A. (2008). Cannabinoid ester constituents from high-potency Cannabis sativa. *Journal of natural products, 71*, 536–542. https://doi.org/10.1021/np070454a

Al-Zoubi, R., Morales, P., & Reggio, P. H. (2019). Structural Insights into CB1 Receptor Biased Signaling. *International journal of molecular sciences, 20*(8), 1837. https://doi.org/10.3390/ijms20081837

Alexander, L., Gaskin, P.L.R., Sawiak, S.S., Fryer, T.D., Hong, Y.T., Cockcroft, G.J., Clarke, H. & Roberts, A. (2019). Fractionating Blunted Reward Processing Characteristics of Anhedonia by Over-Activating Primate Subgenual Anterior Cingulate Cortex. *Neuron, 101*(2), 307–320 e6. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.021

Amancio-Belmont, O., Romano-López, A., Ruiz-Contreras, A.E., Méndez-Díaz, M. & Próspero-García, O. (2016). From adolescent to elder rats: Motivation for palatable food and cannabinoids receptors. *Developmental neurobiology, 77*(8), 917–927. https://doi.org/10.1002/dneu.22472

Amin, M. R., & Ali, D. W. (2019). Pharmacology of Medical Cannabis. *Advances in experimental medicine and biology*, *1162*, 151–165. https://doi.org/10.1007/978–3-030-21737-2_8

Aracil-Fernández, A., Trigo, J.M., García-Gutiérrez, M., Ortega-Álvaro, A., Ternianov, A., Navarro, D., Robledo, P., Berbel, P., Maldonado, R. & Manzanares, J. (2012). Decreased Cocaine Motor Sensitization and Self-Administration in Mice Overexpressing Cannabinoid CB2 Receptors. *Neuropsychopharmacology,* 37, 1749–1763. http://dx.doi.org/10.1038/npp.2012.22

Archer, E. & Lavie, C.J. (2022). Obesity Subtyping: The Etiology, Prevention, and Management of Acquired versus Inherited Obese Phenotyopes. *Nutrients, 14*(11), 2286. https://doi.org/10.3390/nu14112286

Archer, E., Lavie, C.J. & Hill, J.O. (2018). The Contributions of 'Diet', 'Genes', and Physical Activity to the Etiology of Obesity: Contrary Evidence and Consilience. *Progress in cardiovascular diseases*, *61*(2), 89–102. https://doi.org/10.1016/j.pcad.2018.06.002

Asociación Americana de Psiquiatría (2022). *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales DSM-5-TR* (5a ed., Text Revision). Arlington: American Psychiatric Publishing

Ashton, J.C., Deborah, F., Darlington, C.L., Smith, P.F. (2006). Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: An immunohistochemical study. *Neuroscience Letters, 396*, 113–116. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.038

Atwood, B.K., Straiker, A. & Mackie, K. (2012). CB2 cannabinoid receptors inhibit synaptic transmission when expressed in cultured autaptic neurons. *Neuropharmacology,* 63(4), 514–523. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.024

Bainier, C. Mateo, M., Felder-Schmittbuhl, M.P. & Mendoza, J. (2017). Circadian Rhythms of Hedonic Drinking Behavior in Mice. *Neuroscience*, 349, 229–238. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.03.002

Behl, T., Chadha, S., Sachdeva, M., Sehgal, A., Kumar, A., Dhruv, Venkatachalam, T., Hafeez, A., Aleya, L., Arora, S., El-Saber Batiha, G., Nijhawan, P. & Bungau, S. (2021). Understanding the possible role of endocannabinoid system in obesity. *Prostaglandins other lipid mediators, 152*, 106520. https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2020.106520

Berridge, K. C. (2009). “Liking” and “wanting” food rewards: Brain substrates and roles in eating disorders. *Physiology and Behavior, 97*(5), 537–550. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.044

Berridge, K. C. (2018). Evolving Concepts of Emotion and Motivation. *Frontiers in psychology*, *9*, 1647. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.01647

Berridge, K. C., Ho, C. Y., Richard, J. M. & Difeliceantonio, A. G. (2010). The tempted brain eats: Pleasure and desire circuits in obesity and eating disorders. *Brain research*, *1350*, 43–64. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.04.003

Berridge, K. C. & Kringelbach, M. L. (2015). Pleasure Systems in the Brain. *Neuron*, *86*(3), 646–664. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.018

Blanco-Gandia, M.C., Ledesma, J.C., Aracil-Fernández, A., Navarrete, F., Montagud-Romero, S., Aguilar, M.A., Manzanares, J., Miñarro, J. & Rodríguez-Arias, M. (2017). The rewarding effects of ethanol are modulated by binge eating of high-fat diet during adolescence. *Neuropharmacology, 121*, 219–230. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.040

Bonini, S.A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M. & Mastinu, A. (2018). Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology, 277*(5), 300–315. https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.004

Bray, B., Sadowski, A., Bray, C., Bradley, R. & Zwickey, H. (2023). Clinical aspects of binge eating disorder: A cross -sectional mixed-methods study of binge eating disorder experts´ perspectives. *Frontiers in Psychiatry, 13*, 1087165. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2022.1087165

Cabral, G. A. & Griffin-Thomas, L. T. (2009). Emerging role of the cannabinoid receptor CB 2 in immune regulation: Therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert reviews in molecular medicine,* 11, e3. https://doi.org/10.1017/S1462399409000957

Canseco-Alba, A., Schanz, N., Sanabria, B., Zhao, J., Lin, Z., Liu, Q. R. & Onaivi, E. S. (2019). Behavioral effects of psychostimulants in mutant mice with cell-type specific deletion of CB2 cannabinoid receptors in dopamine neurons. *Behavioral brain research*, *360*, 286–297. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.11.043

Cao, Q., Martínez, M., Zhang, J., Sanders, A.R., Badner, J.A., Cravchik, A., Markey, C.J., Beshah, E., Guroff, J.J., Mazwell, M.E., Kazuba, D.M., Whiten, R., Goldin, L.R., Gershon, E.S., & Gejman, P.V. (1997). Suggestive evidence for a schizophrenia susceptibility locus on chromosome 6q and a confirmation in an independent series of pedigrees. *Genomics,43*, 1–8. https://doi.org/10.1006/geno.1997.4815

Chen, D., Gao, M., Gao, F., Su, Q. & Wu, J. (2016). Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. *Acta pharmacologica Sinica*, *38(3),* 312–316. https://doi.org/10.1038/aps.2016.149

Cone, R.D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature neuroscience*, *8*(5), 571–578. http://refhub.elsevier.com/S1550-4131(17)30609-5/sref36

Cone, R.D., Cowley, M.A., Butler, A.A., Fan, W., Marks, D.L. & Low, M.J. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, *25 Suppl 5*, S63–S67. http://refhub.elsevier.com/S1550-4131(17)30609-5/sref37

Cordony, M.B., Chow J.Y.L. & Boakes, R.A. (2018) Motivation to run measured by progressive ratio test: Failure to support the addiction hypothesis for rats. *Learning & Behavior, 47*, 13–140. https://doi.org/10.3758/s13420-018-0348-8

Cortés-Salazar, F., Mancilla-Díaz, J. M., López-Alonso, V.E., González-Hernández, B., Estartín-Pérez, R.E. (2012). Relationship between CB1 receptors in the nucleus accumbens shell and hedonic value of food. *International Journal of Hispanic Psychology*, *5*(1), 29–38. https://www.proquest.com/scholarly-journals/relationship-between-cb1-receptors-nucleus/docview/1726666746/se-2

Cortés-Salazar, F., Suárez-Ortiz, J.O., Cendejas-Trejo, N.M., Mancilla-Díaz, J.M., López-Alonso, V. E. & 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. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=79832492007

Cox, A.J, West, N.P. & Cripps, A.W. (2015). Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *The Lancet, Diabetes & Endocrinology, 3*(3), 207–215. https://doi.org/10.1016/s2213-8587(14)70134-2

Crocq, M.A. (2022). History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues in Clinical Neuroscience, 22*(3), 223–228. https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/mcrocq

Cruz-Martínez, A. M., Tejas-Juárez, J. G., Mancilla-Díaz, J. M., Florán-Garduño, B., López-Alonso, V. E. & 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, 28*(11), 1247–1259. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.08.002

D'Addario, C., Micioni Di Bonaventura, M. V., Pucci, M., Romano, A., Gaetani, S., Ciccocioppo, R., Cifani, C. & Maccarrone, M. (2014). Endocannabinoid signaling and

food addiction. *Neuroscience and biobehavioral reviews, 47*(1), 203–224. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.08.008

de Araujo, I.E. (2011). Multiple Reward Layers in Food Reinforcement. Neurobiology of Sensation and Reward. In J. A. Gottfried (Ed.), *Neurobiology of Sensation and Reward*. CRC Press/Taylor & Francis.

Dhopeshwarkar, A. & Mackie, K. (2016). Functional selectivity of CB2 cannabinoid receptor ligands at a canonical and noncanonical pathways. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, *358*(2), 342–351. https://doi.org/10.1124/jpet.116.232561

den Boon, F., Chameau, P., Houthuijs, K., Bolijn, S., Mastrangelo, N., Kruse, C., Maccarrone, M., Wadman, W. & Werkman, T. (2014). Endocannabinoids produced upon action potential firing evoke a CL- current via type-2 cannabinoid receptors in the medial prefrontal cortex. *European journal of physiology, 466*, 2257–2268. https://doi.org/10.1007/s00424-014-1502-6

den Boon, F.S., Chameau, P., Schaafsma-Zhao, Q., van Aken, W., Bari, M., Oddi, S., Kruse, C.G., Maccarrone, M., Wadman, W.J. & Werkman, T.R. (2012). Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. *Proceedings of the national academy of sciences, 109*(9), 3534–3539. https://doi.org/10.1073/pnas.1118167109

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science, 258*, 1946–1949. https://doi.org/10.1126/science.1470919

Deveaux, V., Cadoudal, T., Ichigotani, Y., Teixeira-Clerc, F., Louvet, A., Manin, S., Tran-Van Nhieu, J., Belot, M.P., Zimmer, A., Even, P., Cani, P.D., Knauf, C., Burcelin, R., Bertola,A., Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Mallat, A. & Lotersztajn, S. (2009).

Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance and hepatic steatosis. *PloS ONE,* 4(6), e5844. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005844

DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annual review of physiology*, *69*, 483–510. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749

Di Marzo, V. (2006). A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends in Pharmacological Sciences, 27* (3), 134–140. https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.01.010

Epstein, L.H., Leddy, J.J. & Temple, J.L. (2007). Food reinforcement and eating: A multilevel analysis. *Psychological Bulletin, 133*(5), 884–906. https://doi.org/10.3758/s13420-018-0348-8

Escartín-Pérez, R. E., Cendejas-Trejo, N. M., Cruz-Martínez, A. M., González-Hernández, B., Mancilla-Díaz, J. M. & Florán-Garduño, B. (2009). Role of cannabinoid CB1 receptors on macronutrient selection and satiety in rats. *Physiology and Behavior, 96*(4–5), 646–650. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.12.017

Ferenczi, E.A., Zalocusky, K.A., Liston, C. Grosenick, L., Warden, M. R., Amatya, D., Katovich, K., Mehta, H., Patenaude, B., Ramakrishnan, C., Kalanithi, P., Etkin, A., Knutson, B., Glover, G. H. & Deisseroth, K. (2016). Prefrontal cortical regulation of brain wide circuit dynamics and reward-related behavior. *Science, 351*(6268), aac9698. https://doi.org/10.1126/science.aad9698

Frank, G. K. W., Shott, M. E. & DeGuzman, M. C. (2019). The Neurobiology of Eating Disorders. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America, 28*(4), 629–640). https://doi.org/10.1016/j.chc.2019.05.007

Franklin, J. M., Vasiljevik, T., Prisinzano, T. E. & Carrasco, G. A. (2013). Cannabinoid agonists increase the interaction between β-Arrestin 2 and ERK1/2 and upregulate β-Arrestin 2 and 5-HT(2A) receptors. *Pharmacological research*, *68*(1), 46–58. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.002

Fulton, S. (2010). Appetite and reward. *Frontiers in Neuroendocrinology, 31*(1), 85–103. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.002

Funahashi, H., Takenoya, F., Guan, J.L., Kageyama, H., Yada, T. & Shioda, S. (2003). Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. *Anatomical Science International, 78*(3), 123–138. https://doi.org/10.1046/j.0022-7722.2003.00055.x

Gábor, T., Lázló, H., Turu, G. & Hunyady, L. (2010). Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *Journal molecular endocrinology, 44*, 75—85. https://doi.org/10.1677/jme-08-0190

Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G. & Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European journal of biochemistry*, *232*(1), 54–61. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x

Gallistel, C.R., Shizagal, P. & Yeomans, J.S. (1981). A portrait of the substrate for self-stimulation. *Psychol Rev., 88*, 228–273. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6264530

Gardner, E.L. (2011). Addiction and Brain Reward and Antireward Pathways. *Advances in Psychosomatic Medicine. 30*, 22–60. https://doi.org/10.1159/000324065

Gonsiorek, W., Lunn, C., Fan, X., Narula, S., Lundell, D. & Hipkin, R.W. (2000). Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2

cannabinoid receptor: Antagonist by anandamide. *Molecular Pharmacology, 57*, 1045–1050. http://www.worldcat.org/issn/1521-0111

Guegan, T., Cutando, L., Gangarossa, G., Santini, E., Fisone, G., Martinez, A., Valjent, E., Maldonado, R. & Martin, M. (2013). Operant behavior to obtain palatable food modifies ERK activity in the brain reward circuit. *European Neuropsychopharmacology, 23*(3), 240–252. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.04.009

Gupta, A., Osadchiy, V. & Mayer, E.A. (2020). Brain-gut-microbiome interactions in obesity and food addiction. Gastroenterology & Hepatology, *Nature Reviews, 17*, 655–672. https://doi.org/10.1038/s41575-020-0341-5

Gutiérrez, G. (1999). Ivan Petrovich Pavlov (1849-1936). *Revista latinoamericana de psicología, 31*(3), 557–560. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=80531311

Hariri, N. & Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. Nutrition Research Reviews, *23*(2), 270–299. https://doi.org/10.1017/S0954422410000168

Hebert-Chatelain, E., Desprez, T., Serrat, R., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Busquets-Garcia, A., Pagano Zottola, A. C., Delamarre, A., Cannich, A., Vincent, P., Varilh, M., Robin, L. M., Terral, G., García-Fernández, M. D., Colavita, M., Mazier, W., Drago, F., Puente, N., Reguero, L., … Marsicano, G. (2016). A cannabinoid link between mitochondria and memory. *Nature, 539*(7630), 555–559. https://doi.org/10.1038/nature20127

Howlett, A.C. (2002). The cannabinoid receptors. *Prostaglandins & other lipid mediators, 68*(69), 619–631. https://doi.org/10.1016/s0090-6980(02)00060-6

Hussain, Z., Uyama, T., Kawai, K., Binte Mustafiz, S.S., Tsuboi, K., Araki, N. & Ueda, N. (2018). Phosphatidylserine-stimulated production of N-acyl-phosphatidylethanolamines by Ca^{2+}-dependent N-acyltransferase. *Biochimica et*

Biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids, 1863(5), 493–502. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.02.002

Ignatowska, B., Jankowski, M. & Swiergiel, A.H. (2011). Cannabidiol decreases body weight gain in rats: involvement of CB2 receptors. *Neuroscience letters, 490*(1), 82–84. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.12.031

Instituto Mexicano para la Competitividad A.C. (2015, 27 de enero). Kilos de más, pesos de menos: los costos de la obesidad en México https://imco.org.mx/kilos-de-mas-pesos-de-menos-obesidad-en-mexico/

Jacob, A. & Todd, A.R. (1940). 119. Cannabis indica. Part II. Isolation of cannabidiol from Egyptian hashish. Observations on the structure of cannabinol. *Journal of the Chemical Society,* 649–653. https://doi.org/10.1039/JR9400000649

Jamshidi, N. & Taylor, D.A. (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *British journal of pharmacology, 134*(6), 1151–1154. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704379

Jeninngs, J.H., Rizzi, G., Stamatakis, A.M., Ung, R.L. & Stuber, G.D. (2013). The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science, 341*, 1517–1521. http://refhub.elsevier.com/S1550-4131(17)30609-5/sref81

Jiang, M. & Bajpayee, N.S. (2009). Molecular mechanism of Go signaling. *Neurosignals, 17*(1), 23–41. https://doi.org/10.1159%2F000186688

Jiang, X., Lautermilch, N. J., Watari, H., Westenbroek, R. E., Scheuer, T. & Catterall, W. A. (2008). Modulation of CaV2.1 channels by Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(1), 341–346. https://doi.org/10.1073/pnas.0710213105

Joshi, N. & Onaivi, E.S. (2019). Endocannabinoid system components: Overview and tissue distribution. *Advances in experimental medicine and biology,* 1162, 1-12. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_1

Karsak, M., Malkin, I., Toliat, M. R., Kubisch, C., Nürnberg, P., Zimmer, A. & Livshits, G. (2009). The cannabinoid receptor type 2 (CNR2) gene is associated with hand bone strength phenotypes in an ethnically homogeneous family sample. *Human genetics*, *126*(5), 629–636. https://doi.org/10.1007/s00439-009-0708-8

Kalon, E., Hong, J. Y., Tobin, C., & Schulte, T. (2016). Psychological and Neurobiological Correlates of Food Addiction. *International review of neurobiology*, *129*, 85–110. https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.06.003

Katona, I., Sperlágh, B., Sík, A., Käfalvi, A., Vizi, S., Mackie, K. & Freund, T. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *The Journal of Neuroscience, 19*(11), 4544–4558. https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-11-04544.1999

Kissileff, H.R. & Herzog, M. (2018). Progressive ratio (PR) schedules and the sipometer: Do they measure wanting, linking, and/or reward? A tribute to Anthony Sclafani and Karen Ackroff. *Appetite, 122*, 44–50. https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.09.014

Koob, G.F. (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in pharmacological sciences, 13*(5), 177–184. https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90060-j

Koob, G. & Volkow, N. (2010). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology, 35*(1), 217–238. https://doi.org/10.1038/npp.2009.110

Konttinen, H. (2020). Emotional eating and obesity in adults: The role of depression, sleep and genes. *Proceedings of the Nutrition Society, 79(*3), 283–289. https://doi.org/10.1017/S0029665120000166

Kringelbach, M.L. & Berridge, K.C. (2010). The functional neuroanatomy of pleasure and happiness. *Discovery medicine*, *9*(49), 579–587.

Kure Liu, C., Joseph, P. V., Feldman, D. E., Kroll, D. S., Burns, J. A., Manza, P., Volkow, N. D. & Wang, G. J. (2019). Brain Imaging of Taste Perception in Obesity: A Review. *Current nutrition reports, 8*(2), 108–119. https://doi.org/10.1007/s13668-019-0269-y

Lau, B.K., Cota, D., Cristino, L. & Borgland, S. (2017). Endocannabinoid modulation of homeostatic and non-homeostatic feeding circuits. *Neuropharmacology, 124*, 38–51. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.05.033

Levinson, D.F., Holmans, P., Straub, R.E., Owen, M.J., Wildenauer, D.B., Gejman, P.V.Pulver, A.E., Laurent, C., Kendler, K.S., Walsh, D., Norton, N., Williams, M., Scwab, S.G., Lerer, B., Mowry, B.J., Sanders, A.R., Antonarakis, S.E., Blouin, J.L., DeLeuze, J.F. & Mallet, J. (2000). Multicenter linkage study of schizophrenia candidate regions on chromosomes 5q.6q,10p, and 13q: schizophrenia linkage collaborative group III. *American journal of human genetics*, *67*(3), 652–663. https://doi.org/10.1086/303041

Li, Y. & Kim, J. (2017). Distinct roles of neuronal and microglial CB_2 cannabinoid receptors in the mouse hippocampus. *Neuroscience, 5*(363), 11–25. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.08.053

Li, W.L., Chen, M.L., Liu, S.S., Li, G.L., Gu, T.Y., Liang, P., Qin, Y.M., Zhan, Y.H., Quan, Y. & Zhang, G.H. (2013). Sweet preference modified by early experience in mice and the related molecular modulations on the peripheral pathway. *Journal of molecular neuroscience, 51*, 225–236. https://doi.org/10.1007/s12031-013-0011-y

Ling, C. & Rönn, T. (2019). Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell metabolism, 29*(5), 1028–1044. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.009

Liu, Q. R., Canseco-Alba, A., Zhang, H. Y., Tagliaferro, P., Chung, M., Dennis, E., Sanabria, B., Schanz, N., Escosteguy-Neto, J. C., Ishiguro, H., Lin, Z., Sgro, S., Leonard, C. M., Santos-Junior, J. G., Gardner, E. L., Egan, J. M., Lee, J. W., Xi, Z. X. & Onaivi, E.S. (2017). Cannabinoid type 2 receptors in dopamine neurons inhibits psychomotor behaviors, alters anxiety, depression and alcohol preference. *Scientific Reports, 7*(1),17410. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17796-y

López, G., Sánchez, R.E., Ávalos, A., Sierra, J.J., Paz, F., Leyva, G., Segovia, J., Cortés, H. & Florán, B. (2020). D_2 autoreceptor switches CB_2 receptor effects on [3H]-dopamine release in the striatum. *Synapse, 74*(3): e22139. https://doi.org/10.1002/syn.22139

Lu, H.C. & Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biological psychiatry. Cognitive neuroscience and neuroimaging*, *6*(6), 607–615. https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016

Luchtman, D. W., Chee, M. J. S., Doslikova, B., Marks, D. L., Baracos, V. E. & Colmers, W. F. (2015). Defense of elevated body weight setpoint in Diet-Induced obese rats on low energy diet is mediated by loss of melanocortin sensitivity in the paraventricular hypothalamic nucleus. *PLoS one, 10*(10), e0139462. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139462

Ma, Z., Gao, F., Larsen, B., Gao, M., Luo, Z., Chen, D., Ma. X., Qiu, S., Zhou, Y., Xie, J., Xi, Z.X. & Wu, J. (2019). Mechanism of cannabinoid CB2 receptor-mediated reduction of dopamine neuronal excitability in mouse ventral tegmental area. *eBioMedicine, 42*, 225–237. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.040

Mailleux, P. & Vanderhaeghen, J. J. (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: A comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience, 48*(3), 655–668. https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90409-U

Martínez-Gras, I., Hoenicka, J., Ponce, G., Rodríguez-Jiménez, R., Jiménez-Arriero, M. A., Pérez-Hernandez, E., Ampuero, I., Ramos-Atance, J. A., Palomo, T. & Rubio, G. (2006). (AAT)n repeat in the cannabinoid receptor gene, CNR1: association with schizophrenia in a Spanish population. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, *256*(7), 437–441. https://doi.org/10.1007/s00406-006-0665-3

Martinez, M., Goldin, L.R., Cao, Q., Zhang, J., Sanders, A.R., Nancarrow, D.J. Taylor, J. M., Levinson, D. F., Kirby, A., Crowe, R. R., Andreasen, N. C., Black, D. W., Silverman, J. M., Lennon, D. P., Nertney, D. A., Brown, D. M., Mowry, B. J., Gershon, E. S., & Gejman, P. V. (1999). Follow-up study on a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 6q. *American journal medical genetics, 88*(4), 337–343.

Mateo, Y., Johnson, K. A., Covey, D. P., Atwood, B. K., Wang, H. L., Zhang, S., Gildish, I., Cachope, R., Bellocchio, L., Guzmán, M., Morales, M., Cheer, J. F. & Lovinger, D. M. (2017). Endocannabinoid Actions on Cortical Terminals Orchestrate Local Modulation of Dopamine Release in the Nucleus Accumbens. *Neuron, 96*(5), 1112-1126.e5. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.11.012

Melis, T., Succu, S., Sanna, F., Boi, A., Argiolas, A. & Melis, M. (2007). The cannabinoid antagonist SR 141716A (Rimonabant) reduces the increase of extra-cellular dopamine release in the rat nucleus accumbens induced by a novel high palatable food. *Neuroscience letters, 419*, 231–235. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.04.012

Michael, N.J., Simonds, S.E., van den Top, M., Cowley, M.A. & Spnaswick, D. (2017). Mitochondrial uncoupling in the melanocortin system differentially regulates NPY and POMC neurons to promote weight-loss. *Molecular metabolism, 6*(10), 1103–1112. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.07.002

Mlost, J., Bryk, M. & Starowicz, K. (2020). Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. *International journal of molecular sciences, 21*(22), 8870. https://doi.org/10.3390/ijms21228870

Molina-Holgado, E., Vela, J. M., Arévalo-Martín, A., Almazán, G., Molina-Holgado, F., Borrell, J. & Guaza, C. (2002). Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: Involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *Journal of neuroscience, 22*(22), 9742–9753. https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-22-09742.2002

Natarajan, V. Schmid, P.C., Reddy, P.V., Zuzarte-Agustin, M.L. & Schmid, H.H.O. (1983). Biosynthesis of N-acylethanolamine phospholipids by dog brain preparations. *Journal neurochem, 41*(1), 1303–1312. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1983.tb00825.x

Navarrete, F., Pérez, J.M. & Manzanares, J. (2012). Cannabinoid CB2 receptor-mediated regulation of impulsive-like behavior in DBA/2 mice. *British Journal Pharmacology, 165*(1), 260–73. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01542.x

Navarrete, F., Rodríguez-Arias, M., Martín-García, E., Navarro, D., García-Gutiérrez, M., Aguilar, M., Aracil-Fernández, A., Berbel, P., Miñarro, J., Maldonado, R. & Manzanares, J. (2013). Role of CB2 Cannabinoid Receptors in the Rewarding, Reinforcing, and Physical Effects of Nicotine. *Neuropsychopharmacology, 38*, 2515–2524. https://www.nature.com/articles/npp2013157

National Center for Biotechnology Information (09 de septiembre de 2023). *CNR1 cannabinoid receptor 1 [Mus musculus (house mouse)].* https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12801

Núñez, E., Benito, C., Pazos, M.R., Barbachano, A., Fajardo, O., González, S., Tolón, R.M. & Romero, J. (2004). Cannabinoid CB2 Receptors Are Expressed by Perivascular

Microglial Cells in the Human Brain: An Immunohistochemical Study. *Synapse, 53*, 208–213.

Olds, J. & Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of comparative and physiological psychology, 47*(6), 419. https://doi.org/10.1037/h0058775

Oleson, E.B., Cachope, R., Fitoussi, A., Tsutsui, K., A., Wu, S., Gallegos, J.A. & Cheer, J.F. (2013). Cannabinoid receptor activation shifts temporally engendered patterns of dopamine release. *Neuropsychopharmacology, 39*(6), 1441–1452. https://doi.org/10.1038/npp.2013.340

Pertwee, R. G., Howlett, A. C., Abood, M. E., Alexander, S. P. H., Di Marzo, V., Elphick, M. R., Greasley, P. J., Hansen, H. S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R., & Ross, R. A. (2010). Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacological Reviews, 62(*4), 588–631. https://doi.org/10.1124/pr.110.003004.588

Pertwee, R.G. (2014). *Handbook of Cannabis.* Oxford University Press: United Kingdom, First edition. ISBN 978–0-19-966268-5

Pertwee, R.G. (2015). Endocannabinoids and Their Pharmacological Actions. In: Pertwee, R. (eds) Endocannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology,* 231. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_1

Petrovich G. D. (2013). Forebrain networks and the control of feeding by environmental learned cues. *Physiology & behavior*, *121*, 10–18. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.03.024

Piazza, P. V., Cota, D. & Marsicano, G. (2017). The CB1 Receptor as the Cornerstone of Exostasis. *Neuron, 93*(6), 1252–1274. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.002

Piché, M.E., Tchernof, A. & Després, J.P. (2023). Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circulation Research: Obesity, Metabolic Syndrome, and*

CVD Compendium. *126*, 1477–1500. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316101

Prus, A., James, J.R. & Rosecrans, J. (2009). C*onditioned Place Preference. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. (2nd edition, Capitulo 4). Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk5229/

Quarta, C., Bellocchio, L., Mancini, G., Mazza, R., Cervino, C., Braulke, L. J., Fekete, C., Latorre, R., Nanni, C., Bucci, M., Clemens, L. E., 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*(4), 273–285. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.02.015

Quraishi, S. A. & Paladini, C. A. (2016). A Central Move for CB2 Receptors. *Neuron, 90*(4), 670–671. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.012

Randolph, T. G. (1956). The descriptive features of food addiction; addictive eating and drinking. *Quarterly journal of studies on alcohol*, *17*(2), 198–224.

Ravinet Trillou, C., Delgorge, C., Menet, C., Arnone, M., & Soubrié, P. (2004). CB1 Cannabinoid Receptor Knockout in Mice Leads to Leanness, Resistance to Diet-Induced Obesity And Enhanced Leptin Sensitivity. *International journal of obesity, 28*(4), 640–648. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802583

Reeves, P.G., Nielsen, F.H. & Fahey, G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The journal of nutrition, 123*(11), 1939–1951. https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939

Reiter, E. & Lefkowitz, R.J. (2006). GRKs and β-arrestins: Roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends endocrinologic metabolism, 17*, 159–165. https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.03.008

Robson, P. (2001). Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. *British Journal psychiatry, 178*, 107–115. https://doi.org/10.1192/bjp.178.2.107

Rojo-Bustamante, E., Íñigo-Marco, I., Abellanas, M.A., Vinueza-Gavilanes, R., Baltanás, A., Luquin, E., Arrasate, M. & Aymerch, M.S. (2020). CB2 Receptors and Neuron-Glia Interactions Modulate Neurotoxicity Generated by MAGL Inhibition. *Biomolecules, 10*, 1198. https://doi.org/10.3390/biom10081198

Rossi, M. & Stuber, G. (2017). Overlapping brain circuits for homeostatic and hedonic feeding. *Cell metabolism*, *27,* 42–56. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.021

Rueda, D., Galve-Roperh, I., Haro, A., & Guzmán, M. (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Molecular pharmacology, 58*, 814–820. https://doi.org/10.1124/mol.58.4.814

Russo, E.B. (2007). History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemestry & biodiversity, 4*(8), 1614–1648. https://doi.org/10.1002/cbdv.200790144

Sánchez-Zavaleta, R., Cortés, H., Avalos-Fuentes, J. A., García, U., Segovia-Vila, J., Erlij, D. & Florán, B. (2018). Presynaptic cannabinoid CB2 receptors modulate [3 H]-Glutamate release at subthalamo-nigral terminals of the rat. *Synapse, 72*(11). https://doi.org/10.1002/syn.22061

Schaumberg, K, Anderson, D., Reily, E.E. & Anderson, L.M. (2015). Does short-term fasting promote pathological eating patterns? *Eating behaviors, 19,* 168–172. https://doi.org/10.1016/j.eatbeh.2015.09.005

Schmind, H.H.O., Schmind, P.C. & Natarajan, V. (1990). N-acylated glycerophospholipids and their derivates. *Progress in lipid research, 29*(1), 1–43. https://doi.org/10.1016/0163-7827(90)90004-5

Schultz, W. (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology, 80*(1), 1–27. https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.1.1

Schultz, P., Hryhorowicz, S., Rychter, A.M., Zawada, A., Slomski, R., Dobrowolska, A. & Krela-Kaźmierczak, I. (2021). What role does the endocannabinoid system play in the pathogenesis of obesity? *Nutrients, 13*(373), 1–24. https://doi.org/10.3390/nu13020373

Serrat, R., Covelo, A., Kouskoff, V., Delcasso, S., Ruiz-Calvo, A., Chenouard, N., Stella, C., Blancard, C., Salin, B., Julio-Kalajzic, F., Cannich, A., Massa, F., Varilh, M., Deforges, S., Robin, L.M., Stefani, D., Busquets-García, A., Gambino, F., Beyeler, A., Pouvreau, S. & Marsicano, G. (2021). Astroglial ER-mitochondria calcium transfer mediates endocannabinoid-dependent synaptic integration. *Cell reports, 37*(12): 110133. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110133

Shonesy, B. C., Wang, X., Rose, K. L., Ramikie, T. S., Cavener, V. S., Rentz, T., Baucum, A. J., Jalan-Sakrikar, N., MacKie, K., Winder, D. G., Patel, S. & Colbran, R. J. (2013). CaMKII regulates diacylglycerol lipase-α and striatal endocannabinoid signaling. *Nature neuroscience, 16*(4), 456–463. https://doi.org/10.1038/nn.3353

Simon, J. J., Wetzel, A., Sinno, M. H., Skunde, M., Bendszus, M., Preissl, H., Enck, P., Herzog, W., & Friederich, H. C. (2017). Integration of homeostatic signaling and food reward processing in the human brain. *JCI insight*, *2*(15), e92970. https://doi.org/10.1172/jci.insight.92970

Singh, R. K., Kumar, P., & Mahalingam, K. (2017). Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. *In Comptes rendus-biologies, 340*(2), 87–108. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2016.11.007

Sperlágh, B., Windisch, K., Andó, R.D. & Vizi, E.S. (2009). Neurochemical evidence that stimulation of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic nerve terminals activates the dopaminergic reward system by increasing dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Neurochemistry international, 54*(7), 452–457. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.01.017

Stellar, J.R. & Stellar, E. (1985). The neurobiology of motivation and reward. New York, NY: Springe Science+Business. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8032-4

Stempel, A. V., Stumpf, A., Zhang, H. Y., Özdoğan, T., Pannasch, U., Theis, A. K., Otte, D. M., Wojtalla, A., Rácz, I., Ponomarenko, A., Xi, Z. X., Zimmer, A. & Schmitz, D. (2016). Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus. *Neuron, 90*(4), 795–809. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.034

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A. & Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and biophysical research communications, 215*(1), 89–97. https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437

Szabo, B. & Schicker, E. (2008). Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handbook of experimental pharmacology, 168*, 327–365. https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_11

Takako Ohno-Shosaku, Yuki Hashimotodani , Takashi Maejima, M. K. (2005). ohno-shosaku, 2005. Calcium signaling and synaptic modulation Regulation of endocannabinoid-mediated synaptic modulation by calcium. *Cell calcium, 38*(3–4), 369–374. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.014

Taylor, S. S., & Kornev, A. P. (2016). PKA and the structural kinome. *Periodicum biologorum, 118*(4), 329–342. https://doi.org/10.18054/pb.v118i4.4846

Travers, J.B. (2009). Motor Control of Feeding and Drinking. *Encyclopedia of neuroscience, Academic Press,* 1001–1007. https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00449-6

Tsuboi, *K*., Uyama, T., Okamoto, Y., & Ueda, N. (2018). Endocannabinoids and related N-acylethanolamines: biological activities and metabolism. *Inflammation and Regeneration, 38*(1). https://doi.org/10.1186/s41232-018-0086-5

Turcotte, C., Blanchet, M.R., Laviolette, M. & Flamand, N. (2016). The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cellular and molecular life sciences, 73*, 4449–4470. https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00018-016-2300-4.pdf?pdf=button

Turner, C.E., ElSohly, M.A. & Boeren, E.G. (1980). Constituents of Cannabis sativa L. XVII. A review of the natural constituents. *Journal of natural products, 43*, 169–234. https://doi.org/10.1021/np50008a001

Turu, G. & Hunyady, L. (2010). Signal trasnduction of the CB1 cannabinoid receptor. *Journal of molecular endocrinology, 44*(2), 75–85. https://doi.org/10.1677/jme-08-0190

van Strien, T. (2018). Causes of Emotional Eating and Matched Treatment of Obesity. *Current diabetes reports, 18*(6). https://doi.org/10.1007/s11892-018-1000-x

Verty, A., Stefanidis, A., McAinch, A., Hryciw, D. & Oldfield, B. (2015). Anti-obesity effects of the CB2 receptor agonist JWH-015 in diet-induced obese mice. *PLoS one, 10*(11), 1–19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140592

Williams, C.M. & Kirkham, T.C. (1999). Anandamide induces overeating: mediation by entral cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology, 143*(3), 315–317. https://doi.org/10.1007/s002130050953

Wise, R.A. & Bozarth, M.A. (1984). Brain reward circuitry: four circuit elements “wired” in apparent series. *Brain research bulletin*, *12*(2), 203–208. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6609751

Wiss, D., Avena, N. & Gold, M. (2020). Food addiction and psychological adversity: Biological embedding, contextual factors, and public health implications. *Nutrients, 12*(11), 3521. https://doi.org/10.3390/nu12113521

Wu, Q., Ma, Y., Liu, Y., Wang, N., Zhao, X. & Wen, D. (2020). CB2R agonist JWH-133 attenuates chronic inflammation by restraining M1 macrophage polarization via Nrf2/HO-1 pathway in diet-induced obese mice. *Life Sciences, 260*, 118424. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118424

Xi, Z. X., Peng, X. Q., Li, X., Song, R., Zhang, H. Y., Liu, Q. R., Yang, H. J., Bi, G. H., Li, J. & Gardner, E. L. (2011). Brain cannabinoid CB2 receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nature Neuroscience, 14*(9), 1160–1168. https://doi.org/10.1038/nn.2874

Zhan, C., Zhou, J., Feng, Q., Zhang, J.E., Lin, S., Bao, J., Wu, P. & Luo, M. (2013). Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 33*(8), 3624–3632. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013

Zhang, H.-Y., Gao, M., Liu, Q.-R., Bi, G.-H., Li, X., Yang, H.-J., Gardner, E. L., Wu, J. & Xi, Z.-X. (2014). Cannabinoid CB 2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 111*(46), E5007–E5015. https://doi.org/10.1073/pnas.1413210111

Zhang, H.Y., Gao, M., Shen, H., Bi, G.H., Yang, H.J., Liu, Q.R., Wu, J., Gardner, E.L. Bonci, A. & Xi, Z.X. (2017). Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addiction Biology. 22*(3), 1–14. https://doi.org/10.1111/adb.12367

Zhang, P.W., Ishiguro, H., Ohtsuki, T., Hess, J., Carillo, F., Walther, D., Onaivi, E.S., Arinami, T. & Uhl, G.R. (2004). Human cannabinoid receptor 1:5´exons, candidate regulatory

regions, polymorphisms, haplotypes, and association with polysubstance abuse. *Molecular Psychiatry, Nature publishing group, 9*, 916–931. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001560

Ziemens, D., Touma, C. & Rappeneau (2022). Neurobiological Mechanisms Modulating Emotionality, Cognition and Reward-Related Behavior in High Fat Diet-Fes Rodents. *International Journal of molecular sciences, 23,* 7952. https://doi.org/10.3390/ijms23147952

Zoppi, S., Madrigal, J.L., Caso, J.R., García-Gutiérrez, M.S., Manzanares, J., Leaza, J.C. & García-Bueno, B. (2014). Regulatory role of the cannabinoid CB2 receptor in stress-induced neuroinflammation in mice. *British Journal of Pharmacology, 171,* 2814–2826. https://doi.org/10.1111/bph.12607

Zou, M., Li, D., Li, L., Wu, L., & Sun, C. (2019). Role of the endocannabinoid system in neurological disorders. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, *76*, 95-102. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.03.002

Zulfiqar, F., Ross, S.A., & Slade, D. (2012). Cannabinol, a novel Δ9-THC dimer possessing a unique methylene bridge, isolated from Cannabis sativa. *Tetrahedron letters, 53*, 3560–3562. https://doi.org/10.1016%2Fj.tetlet.2012.04.139