

INHIBICIÓN DE LA SACIEDAD ALIMENTARIA INDUCIDA POR ACTIVACIÓN DE RECEPTORES CB1 HIPOTALÁMICOS

INHIBITION OF SATIETY INDUCED BY ACTIVATION OF HYPOTHALAMIC CB1 RECEPTORS

ANA MARÍA CRUZ MARTÍNEZ¹, BRENDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ², NANCY MÓNICA CEN-
DEJAS TREJO³, JUAN MANUEL MANCILLA DÍAZ³, BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO⁴, RODRI-
GO ERICK ESCARTÍN PÉREZ^{3,4,*}

¹ SECCIÓN EXTERNA DE FARMACOLOGÍA DEL CINVESTAV

² FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

³ LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA DE LA ALIMENTACIÓN, FES IZTACALA, UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

⁴ DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS DEL CINVESTAV

Resumen

El sistema de los endocannabinoides participa de manera importante en la modulación de la ingesta de alimento, principalmente vía receptores a cannabinoides CB1 (CB1R). Los CB1R se expresan en el núcleo paraventricular hipotalámico (NPH) y se ha propuesto que éstos participan en la modulación canabinoide de la alimentación, aunque el mecanismo conductual asociado no ha sido plenamente dilucidado. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el papel que juegan los CB1R del NPH en la expresión de la saciedad alimentaria mediante el análisis de la secuencia de saciedad conductual (SSC). Ratas macho Wistar fueron canuladas unilateralmente en el NPH del lado derecho y recibieron una inyección intrahipotalámica del agonista de los CB1R, ACEA (0.25 μ g); inmediatamente después de la inyección, se evaluó la SSC durante 2 horas. El análisis de la SSC mostró que la inyección de ACEA previno la expresión de la saciedad y el efecto fue bloqueado por

* Proyecto financiado por UNAM DGAPA IN 309008. Contribución de los autores: Colección y análisis de datos: AMCM, NMCT, REEP. Obtención de recursos: JMMD, REEP. Preparación del manuscrito: AMCM, BGH, JMMD, BFG, REEP. Se agradece al QFB Francisco Javier Paz Bermúdez por su asistencia técnica en la realización de los experimentos reportados en el presente escrito. Correspondencia: R. Erick Escartín P. Laboratorio de Neurobiología de la Alimentación. UNAM FES Iztacala. Av. de los Barrios #1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, EDOMEX, CP 54090, México. Tel (+5255) 56231333 ext. 39816, Fax (+5255) 53907604, correo-e: escartin@campus.iztacala.unam.mx, erick_escartin@yahoo.com

el antagonista de los receptores CB1, AM 251 (0.1 μ g). Los resultados del presente estudio indican que los receptores CB1 del NPH tienen un papel inhibitorio del proceso de saciedad, lo que permite sugerir que el mecanismo conductual asociado a los efectos de los cannabinoides sobre la alimentación involucra a la inhibición de la expresión de la saciedad.

Palabras clave: cannabinoides, receptores CB1, núcleo paraventricular hipotalámico (NPH), secuencia de saciedad conductual (SSC), ratas.

Abstract

The endocannabinoid system plays an important role in feeding behavior regulation, mainly via CB1 receptors (CB1R). The CB1R are expressed in the paraventricular hypothalamus (PVN) and it has been proposed that these receptors are mediators of the cannabinoid-induced hyperphagia; however, the behavioral mechanism has not been fully characterized. The aim of the present study was to assess the role of PVN CB1R on the expression of satiety using the behavioral satiety sequence analysis (BSS). Male Wistar rats were cannulated unilaterally in the right PVN, they were injected with the CB1R agonist, ACEA (0.25 μ g), and the BSS was evaluated during 2 hours. The BSS analysis showed that ACEA administration prevented the satiety expression and the CB1R antagonist, AM 251 (0.25 μ g), blocked the effect. The present results showed that the CB1R play a inhibitory role on satiety, which strongly suggest that the behavioral mechanism related to the cannabinoid-induced effects involves the inhibition of satiety expression.

Keywords: Cannabinoids, CB1 receptors, PVN, BSS, food intake, rats.

Introducción

De acuerdo con la evidencia experimental hasta ahora disponible, el sistema de los endocannabinoides juega un papel predominante en la regulación de la ingesta de alimento (Williams, Rogers & Kirkham, 1998; Di Marzo, et al., 2001; Fride, 2005) y gran parte de los efectos hiperfágicos de los agonistas cannabinoides son mediados por receptores CB1 (Williams & Kirkham, 1999), mismos que se encuentran expresados preferencialmente en el sistema nervioso central (Herkenham, et al., 1990). Empleando diferentes paradigmas, los experimentos conductuales han mostrado que la administración sistémica de agonistas de los receptores CB1 incrementa la ingesta de alimento (Avraham, et al., 2005; Escartín, et al., 2009). A pesar de que existe un componente modulador de la alimentación y del balance energético mediado por receptores CB1 a nivel periférico (Ravinet Trillou, et al., 2003; Matias, et al., 2006; Nakata & Yada, 2008), se ha propuesto que los receptores CB1 hipotalámicos constituyen una pieza clave en la modulación central de la ingesta de alimento (DiPatrizio & Simansky, 2008). A este respecto, se sabe que el hipotálamo

es el sitio primario de integración de diversos procesos homeostáticos; asimismo, las neuronas localizadas en esta región del cerebro producen mensajeros químicos, los cuales son liberados en las terminales nerviosas para estimular o inhibir la conducta alimentaria. Específicamente el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPH), es considerado como uno de los núcleos donde converge gran parte de la información necesaria para el control del balance del consumo y gasto energético (Mancilla-Díaz et al., 2003; López-Alonso et al., 2007).

Los receptores CB1 se expresan (principalmente) de manera presináptica en el NPH en terminales serotoninérgicas, NPYérgicas y GABAérgicas, lo que sugiere que los cannabinoides tienen un papel neuromodulador de las señales orexigénicas y anorexigénicas (Nakazi, Bauer, Nickel, Kathmann & Schlicker, 2000).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que los agonistas CB1 incrementan sustancialmente la ingesta de alimento en ratas saciadas (Escartín, et al., 2009). De acuerdo con lo anterior, se ha reportado que los agonistas de los receptores CB1 incrementan las propiedades reforzantes del alimento (Williams & Kirkham, 2002), al igual que aumentan la reactividad al sabor (Mahler, Smith & Berridge, 2007), lo que ayuda a explicar del efecto hiperfágico de los agonistas cannabinoides. Así, aunque la evidencia experimental disponible indica que el sistema de los cannabinoides juega un papel importante en la regulación de la conducta alimentaria, el mecanismo específico mediante el cual la activación de los receptores cannabinoides CB1 estimulan la ingesta de alimento no ha sido plenamente dilucidado. En consistencia con lo anterior, el objetivo del presente estudio consistió en evaluar el papel que juegan los receptores CB1 del NPH en la expresión de la saciedad alimentaria mediante el análisis de la secuencia de saciedad conductual (SSC).

Método

Sujetos

Ratas macho de la cepa Wistar (22 en total) pesando entre 200 y 220 g al inicio de las sesiones experimentales. Las ratas fueron mantenidas en cajas habitación individuales con el ciclo de luz/oscuridad de 12 x 12 horas invertido (las luces se apagaban a las 08:00 h) y a una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio general del CINVESTAV. Los procedimientos empleados en el presente estudio son acordes con las Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio establecidos en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Fármacos

AM 251 (Antagonista CB1) [1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H-pirazol-3-carbo-xamida, ACEA (agonista CB1) (Araquidonil-2-cloroetilamida) (ambos comprados a Tocris Bioscience, UK). El ACEA se adquirió en una solución con etanol (5mg/ml), por lo que para su administración se resuspendió en

dimetilsulfoxido (DMSO) y mientras se sonicaba la solución, se agregaron gotas de Nitrógeno líquido para la evaporación de etanol. La solución obtenida libre de alcohol, se diluyó con solución salina al 0.9% para posteriormente realizar la inyección (DMSO 5%). El AM 251 se disolvió con DMSO y posteriormente se diluyó con solución salina al 0.9% (DMSO 5%).

Dieta y programa de alimentación restringida

Los sujetos experimentales fueron expuestos a un programa de alimentación restringida (5 días), que consistió en la presentación diaria (durante 2 horas) de alimento estándar de laboratorio (los sujetos solamente tenían acceso al alimento en este periodo de tiempo), mientras que el agua estaba disponible ad libitum. La presentación del alimento se realizaba en el inicio de la fase oscura del ciclo de luz/oscuridad. Este programa tuvo la finalidad de evaluar el efecto de los tratamientos farmacológicos en la ingesta de alimento y la saciedad con una ingesta basal alta. El alimento fue pesado al inicio y final de cada hora de registro (hora 1 y hora 2). Posterior a este período, se procedió a la cirugía estereotáxica para la implantación de cánulas. Los sujetos que no se adaptaron al programa de alimentación (consumo total durante las 2 horas menor al 80% del promedio de todos los sujetos) fueron excluidos de las sesiones experimentales.

Cirugía

Los sujetos fueron anestesiados con hidrato de cloral (350 mg/kg vía intraperitoneal, ip) y posteriormente se implantó unilateralmente una cánula de inyección en el área suprayacente del NPH. Las coordenadas estereotáxicas que se emplearon fueron (relativo a bregma): Antero-posterior (AP) -0.04, latero-medial (LM) -0.045, dorso-ventral (DV) -0.65 (Paxinos & Watson, 1998). Las cánulas implantadas se fijaron al cráneo mediante tornillos de acero y cemento acrílico. Los animales tuvieron un período de 5 días para recuperarse de la cirugía.

Análisis de la secuencia de saciedad conductual

Para el análisis de la secuencia de saciedad conductual, cada una de las 2 horas de registro fueron divididas en 12 segmentos (5 minutos c/u) y se cuantificó la duración (s) de 5 categorías conductuales mutuamente excluyentes: alimentación, ingesta de agua, acicalamiento, actividad y descanso. Al no encontrarse diferencias significativas (por efecto de los tratamientos) en las duraciones de las categorías conductuales de beber agua y acicalamiento, estas duraciones fueron incorporadas a la categoría actividad, mostrándose en la sección de los resultados únicamente las categorías alimentación, actividad y descanso. Los datos fueron expresados en términos de medias \pm el error estándar de la media (EEM) de las duraciones (s) de las categorías conductuales de cada registro (hora 1 y hora 2). La SSC está definida como la progresión ordenada de la alimentación al descanso (McGuirk, Muscat & Willner, 1992; Halford, Wanninayake & Blundell, 1998), de tal forma que inicial-

mente se determinó el periodo promedio en el que los sujetos dejan de alimentarse para descansar, este momento se representa gráficamente con una línea vertical en la SSC. Para el análisis cuantitativo de la secuencia de saciedad conductual, a partir de los datos de las duraciones de cada una de las 3 categorías conductuales, se calculó el área bajo la curva (ABC) y se expresó en términos de medias \pm el EEM.

Diseño experimental

Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a grupos independientes de 5-7 ratas y se habituaron de acuerdo al paradigma de restricción alimentaria descrito anteriormente. El diseño experimental que se empleó para determinar los efectos de los diferentes tratamientos incluyó a los siguientes grupos: 1) Vh + Vh (Salina 0.9 %, DMSO 5%) (n= 5), 2) Vh + ACEA (0.25 μ g) (n= 7), 3) AM 251 (0.1 μ g) + ACEA (0.25 μ g) (n= 5), 4) AM 251 (0.1 μ g) + Vh (n= 5). El volumen de inyección fue de 0.5 μ l infundido a una velocidad de 0.25 μ l/minuto en 2 minutos (el inyector permaneció un minuto adicional dentro de la cánula guía). Posterior a las inyecciones, los sujetos fueron colocados de nuevo en sus cajas habitación donde el alimento pre-pesado se encontraba en el comedero y, simultáneamente con el inicio la fase oscura del ciclo de luz, se realizaron los registros de duración continua (hora 1 y hora 2).

Histología

Al final de las sesiones experimentales los animales fueron anestesiados y sometidos a perfusión intracardiaca de solución salina al 0.9% y posteriormente solución fijadora (formaldehído en solución al 10%). Los cerebros fueron removidos y permanecieron en la solución fijadora durante un día para su fijación. Cortes coronales de 200 μ m fueron realizados para verificar que el sitio donde se implantó la cánula de inyección haya sido el NPH (Figura 1).

Análisis estadístico

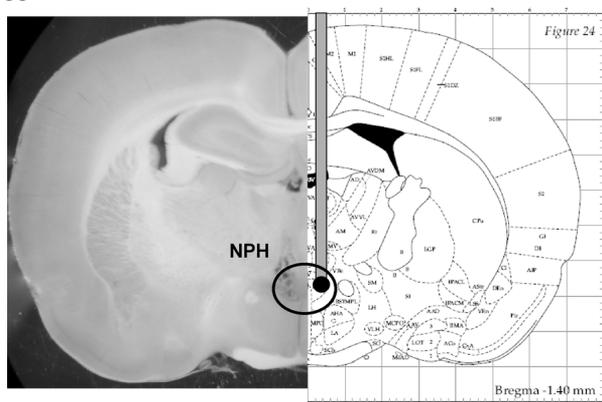


Figura 1. Esquema de corte coronal y fotografía de cerebro de rata donde se muestra el sitio en el que se realizaron las inyecciones intracerebrales. NPH= Núcleo paraventricular.

El análisis cuantitativo de los datos correspondientes a la SSC se llevó a cabo mediante el cálculo de las áreas bajo la curva (ABC) de cada una de las categorías conductuales, mismas que posteriormente fueron tratadas estadísticamente con diferentes ANOVA de dos vías. Para dicho análisis estadístico se consideró el tratamiento (factor grupo) y la hora de registro (Hora 1 y Hora 2, factor hora registro). Posterior al ANOVA significativo, se realizó la prueba *post hoc* de Bonferroni para las comparaciones múltiples. El software empleado para el análisis estadístico fue el Graph Pad Prism 5.0. El criterio para determinar la significancia estadística de las diferencias fue $p < 0.05$.

Resultados

Análisis de la secuencia de saciedad conductual

El análisis de la SSC, mostró que en los sujetos que recibieron la inyección del vehículo (Salina 0.9%, DMSO 5%), la expresión de la saciedad (posprandial) se presentó alrededor de los 95 minutos (periodo 19) posterior a la inyección, donde los sujetos dejan de comer para descansar (Figura 2 B). Por su parte, la administración de ACEA (0.25 μ g) en el NPH provocó que los sujetos no dejaran de alimentarse en las dos horas de registro, inhibiendo la expresión de la saciedad (Figura 2 C y D). El efecto de la inhibición de la expresión de la saciedad por la administración de ACEA fue totalmente bloqueado por el pretatamiento con el antagonista de los receptores CB1, AM 251 (0.1 μ g), ya que la transición de la alimentación al descanso ocurre en el periodo 16 de la segunda hora (Figura 2 F), además de que durante la primer hora de registro se observa una tendencia a incrementar el tiempo de descanso (Figura 2 E). Finalmente, se observó que la administración de AM 251 por si misma no altera el patrón conductual de la secuencia de saciedad, sin embargo, la transición de la alimentación al descanso aparece más temprano (periodo 15) (Figura 2 H), incluso se observa la tendencia a incrementar el tiempo de descanso durante la primer hora de registro (Figura 2 G).

Mediante el cálculo del área bajo la curva (ABC) fue posible analizar cuantitativamente los datos correspondientes a las duraciones de la SSC. De tal forma, se observó que las inyecciones intrahipotalámicas produjeron cambios significativos dependientes del factor tratamiento ($F^{(2,40)} = 14.98$; $p < 0.001$) y del factor hora de registro ($F^{(1,40)} = 24.29$; $p < 0.001$). Posteriormente, las comparaciones múltiples evidenciaron que en el grupo tratado con ACEA se incrementó significativamente el tiempo que los sujetos emplean para alimentarse en comparación con el grupo Vh + Vh durante las dos horas de registro (Figura 3 A); además, la duración del descanso disminuyó significativamente en los sujetos tratados con ACEA (Figura 3 C). El consumo por unidad de tiempo (tasa local de alimentación) y la duración de la actividad no fueron afectados por las inyecciones intrahipotalámicas (Figura 3 B y D).

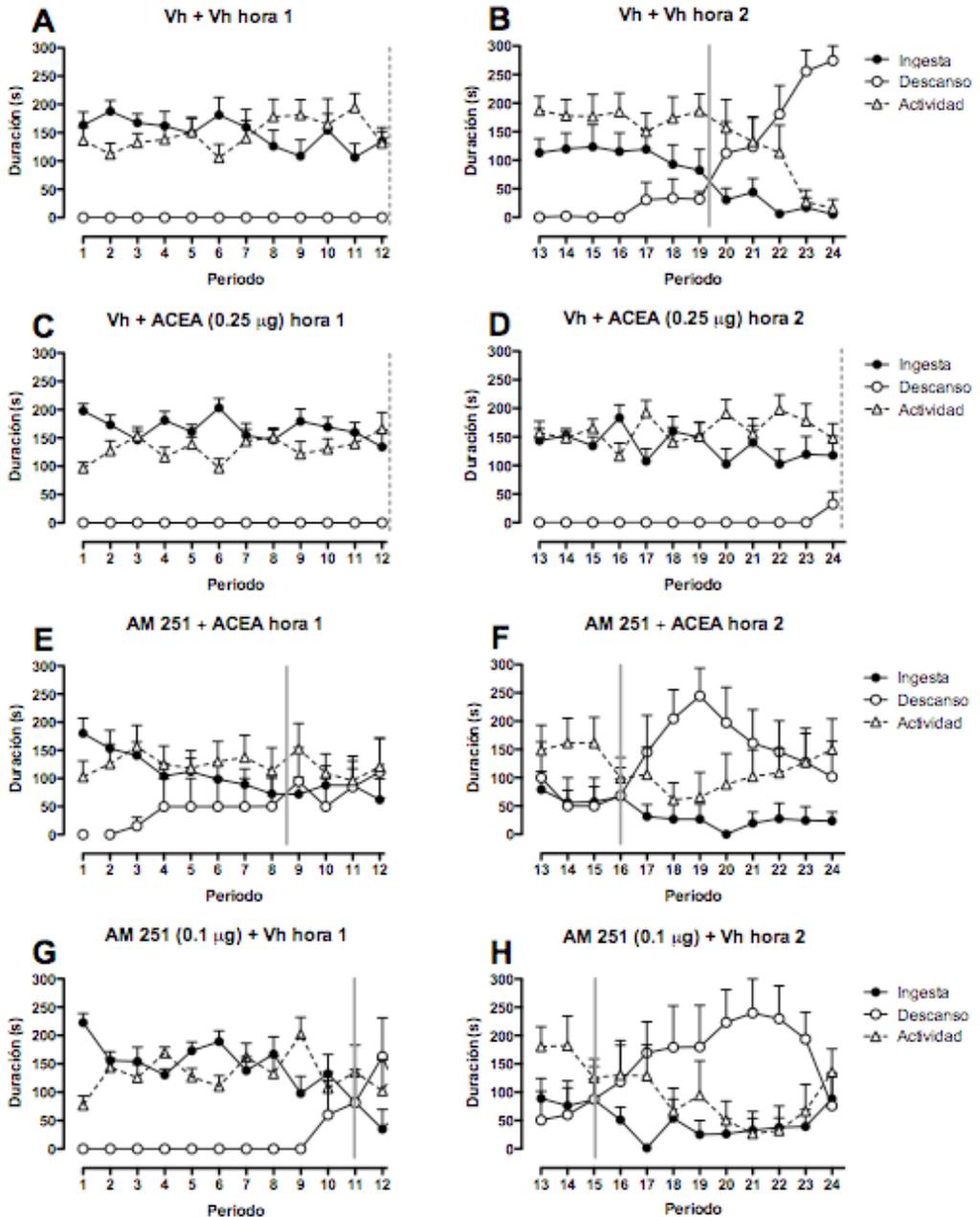


Figura 2. Duración media del tiempo \pm EEM que emplean los sujetos en las categorías conductuales de ingesta (círculos llenos), descanso (círculos vacíos) y actividad (triángulos vacíos) en las distintas condiciones; Vehículo, Vh +Vh (A, B; n= 5); Vh + ACEA (0.25 µg; C, D; n= 7); AM 251 (0.1 µg) + ACEA (0.25 µg; E, F; n= 5); AM 251 (0.1 µg) + Vh (G, H). La línea vertical gris continua representa la transición de la ingesta al descanso (expresión de la saciedad), cuando es discontinua dicha transición no se presenta durante el tiempo de registro.

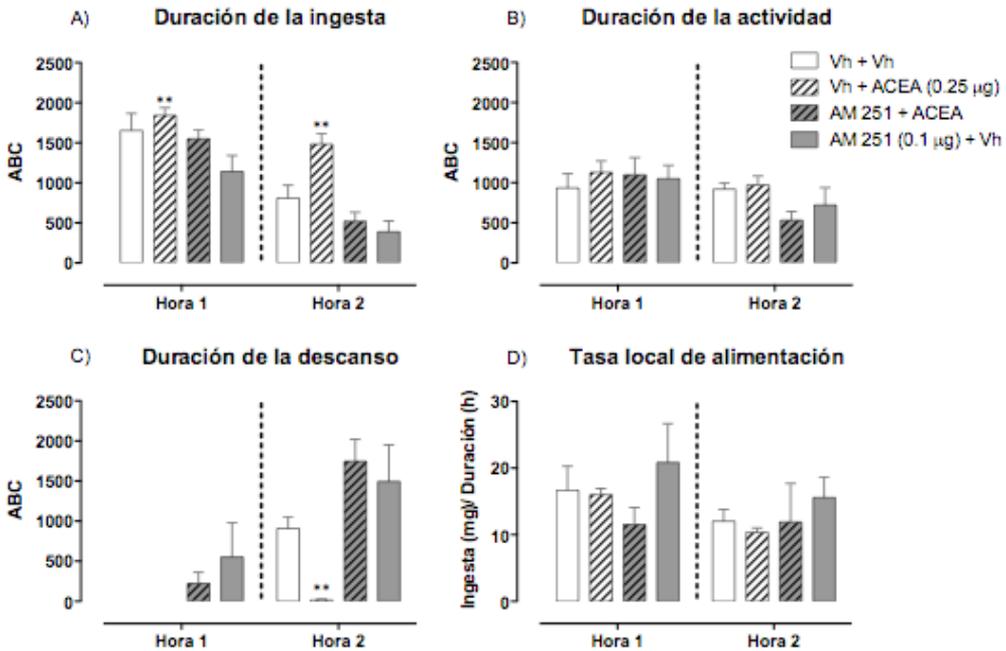


Figura 3. Media \pm EEM del área bajo la curva (ABC) de las duraciones de las diferentes categorías conductuales (A ingesta, B actividad y C descanso) y tasa local de alimentación (D) de los periodos de registro (hora 1 y hora 2). ** $p < 0.01$ vs Vh + Vh.

Discusión y conclusiones

El presente estudio fue diseñado para proporcionar evidencia que ayude a dilucidar el mecanismo conductual mediante el cual los cannabinoides vía los receptores CB1 producen sus efectos hiperfágicos. A este respecto, mediante el análisis de la SSC fue posible evaluar el efecto de la activación de los receptores CB1 del NPH sobre el proceso saciatorio de la ingestión de alimento, de tal forma que el perfil conductual asociado a la ingesta de alimento estimulada por la inyección de ACEA en el NPH, se caracterizó por la ausencia de la expresión de la saciedad, disminuyendo sustancialmente el tiempo de descanso durante la segunda hora de registro. Al realizar una cuantificación del tiempo que emplearon los animales para alimentarse y para descansar, se observó que los sujetos tratados con ACEA pasaron más tiempo consumiendo alimento que descansando y este efecto fue bloqueado por el pretratamiento con el antagonista selectivo de los receptores CB1, el AM 251. En conjunto, estos hallazgos sugieren fuertemente que los agonistas de los receptores a cannabinoides CB1 del NPH estimulan la ingesta de alimento por medio de la inhibición de la saciedad. Asimismo, los resultados del presente estudio son acordes con los reportes que sugie-

ren que los receptores CB1 localizados en el NPH desempeñan un papel importante en la modulación canabinoide de la ingesta de alimento, estimulando la ingesta de alimento e incrementando las propiedades reforzantes del alimento y/o aumentando la reactividad al sabor (Williams et al., 1998; Di Marzo et al., 2001; Fride, 2005, Di Marzo & Matias, 2005; Williams & Kirkham, 2002; Mahler, et al., 2007).

El hallazgo de que el ACEA estimuló la duración de la ingesta de alimento es consistente con los resultados de otros estudios donde se muestran que la administración intrahipotalámica de THC (núcleo ventromedial, hipotálamo lateral y el núcleo paraventricular) estimula la alimentación (Anderson-Baker, McLaughlin & Baile, 1979; Verty, McGregor & Maller, 2005). El mecanismo probable mediante el cual los canabinoides y los endocannabinoides producen este efecto puede involucrar la participación de péptidos orexigénicos, específicamente facilitando la transmisión NPYérgica vía la inhibición de señales saciatorias como las de serotonina. En efecto, como ya se ha mencionado el NPH es un centro integrador en el cual convergen vías neurales que modifican la alimentación (King & Williams, 1998; Yun, et al., 2005; Hagemann, et al., 1998; Williams & Kirkham, 1999; Verty, et al., 2005).

El uso preclínico del antagonista de los receptores CB1, Rimonabant (SR141716), para el tratamiento de la obesidad mostró su utilidad terapéutica al disminuir la ingesta de alimento y el peso corporal (Van Gaal, Rissanen, Scheen, Ziegler & Rossner, 2005). Resulta interesante, sin embargo, que los mecanismos conductuales y neuroquímicos por los cuales el Rimonabant produce dicho efecto aún no hayan sido plenamente esclarecidos. Los presentes resultados sugieren que el NPH desempeña un papel importante en la regulación de la conducta alimentaria y que el mecanismo conductual asociado a la activación de los receptores CB1 está relacionado con la inhibición de la saciedad. En consecuencia, es posible hipotetizar que el efecto estimulador de los receptores CB1 sobre la ingesta de alimento puede involucrar la facilitación de la transmisión de señales orexigénicas (como la del NPY), pues se ha observado que la activación de los receptores CB1 incrementa la liberación de NPY en el hipotálamo; si bien es cierto que los receptores CB1 están acoplados a proteínas G_i , la liberación de NPY podría ser modulada positivamente por receptores CB1 de manera indirecta por efecto del GABA, ya que se sabe que al ser activados los receptores CB1 disminuye la liberación de neurotransmisores incluyendo GABA (Schlicker & Kathman, 2001). Asimismo, los endocannabinoides podrían inhibir otras vías anorexigénicas como la de serotonina, pues existen estudios que han identificado el ARNm que codifica para el receptor CB1 en células serotoninérgicas en el núcleo del rafe (Häring, Marsicano, Lutz & Monory, 2007). Otros mecanismos mediante los cuales los receptores CB1 podrían estimular el apetito incluyen a los glucocorticoides (Di, Malcher-Lopes, Halmos & Tasker, 2003), las orexinas (Cota, et al., 2003; Hilairet, Bouaboula, Carriere, Le Fur & Casellas, 2003) y la α -MSH, ya que los receptores CB1 se encuentran colocalizados con péptidos anorexigénicos como la CRH y la CART (Cota, et al., 2003). A partir de la propuesta anterior, resulta necesario considerar también la influencia de las hormonas sexuales en los efec-

tos hiperfágicos de los cannabinoides, ya que la evidencia actualmente disponible apunta a que los efectos de los cannabinoides sobre la ingesta de alimento puede ser diferente en machos y hembras (Craft, 2005); en apoyo a esta idea se ha reportado que la modulación canabinoide de la alimentación involucra a la inhibición presináptica glutamatérgica en el hipotálamo (Malcher-Lopes, 2006), específicamente en las neuronas que sintetizan proopiomelanocortina (POMC, péptido con efectos inhibidores de la ingestión de alimento) (Ho, Cox & Wagner, 2007) y dicho efecto está relacionado con las corrientes de K⁺ tipo A (I_A) en las neuronas positivas a POMC del núcleo arqueado, mismas que son moduladas diferencialmente en función del sexo por receptores CB1 (Tang, Tran & Wagner, 2005).

Finalmente, en concordancia con estudios previos, el tratamiento con ACEA no produjo cambios significativos sobre el nivel de actividad de los animales (Verte, et al., 2005), lo que muestra que el efecto del agonista está relacionado con una modificación de la relación entre la ingesta de alimento y el descanso que involucra la inhibición de la saciedad. La SSC es una herramienta que ayuda a distinguir el efecto hiperfágico o hipofágico de los fármacos sobre la conducta alimentaria. Además, el análisis de la SSC puede contribuir a aclarar si la hipofagia inducida por un fármaco se debe al desarrollo de la saciedad o a reacciones colaterales adversas como náusea, sedación, hiperactividad y/o paladeabilidad del alimento (McGuirk, et al., 1992; Gao, Harvey, Mook & Zeigler, 1998; Halford, et al., 1998; Vickers, Clifton, Dourish & Tecott, 1999; López-Alonso, Mancilla-Díaz & Escartín-Pérez, 2002).

La conclusión derivada de los resultados del presente estudio consiste en que la activación de los receptores CB1 del núcleo paraventricular hipotalámico incrementan consistentemente la duración de la ingesta de alimento (sin alterar la tasa local de alimentación) y previenen la expresión de la saciedad alimentaria (demostrando la secuencia de saciedad conductual). Los presentes resultados proporcionan evidencia de que los receptores a cannabinoides CB1 del núcleo NPH participan en el efecto estimulador de los agonistas cannabinoides sobre la ingesta de alimento.

Referencias

- Anderson-Baker, W. C., McLaughlin, C. L., & Baile, C. A. (1979). Oral and hypothalamic injections of barbiturates, benzodiazepines and cannabinoids and food intake in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 11(5), 487-491.
- Avraham, Y., Menachem, A. B., Okun, A., Zlotarav, O., Abel, N., Mechoulam, R., et al. (2005). Effects of the endocannabinoid noladin ether on body weight, food consumption, locomotor activity, and cognitive index in mice. *Brain Research Bulletin*, 65(2), 117-123.
- Cota, D., Marsicano, G., Tschop, M., Grubler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., et al. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 112(3), 423-431.

- Craft, R. M. (2005). Sex differences in behavioral effects of cannabinoids. *Life Sciences*, 77, 2471-2478.
- Di Marzo, V., & Matias, I. (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nature Neuroscience*, 8(5), 585-589.
- Di Marzo, V., Goparaju, S. K., Wang, L., Liu, J., Batkai, S., Jarai, Z., et al. (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, 410(6830), 822-825.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K. C., & Tasker, J. G. (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *Journal of Neuroscience*, 23(12), 4850-4857.
- DiPatrizio, N. V., & Simansky, K. J. (2008). Activating parabrachial cannabinoid CB1 receptors selectively stimulates feeding of palatable foods in rats. *Journal of Neuroscience*, 28(39), 9702-9709.
- 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 & Behavior*, 96(4-5), 646-650.
- Fride, E. (2005). Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior. *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders*, 4(6), 633-642.
- Gao, P., Harvey, M., Mook, D. G., & Zeigler, H. P. (1998). A "pre-satiety sequence" in rats drinking sucrose solutions. *Physiology & Behavior*, 65(2), 355-359.
- Hagemann, L. F., Costa, C. V., Zeni, L. Z., Freitas, C. G., Marino-Neto, J., & Paschoalini, M. A. (1998). Food intake after adrenaline and noradrenaline injections into the hypothalamic paraventricular nucleus in pigeons. *Physiology & Behavior*, 64(5), 645-652.
- Halford, J. C., Wanninayake, S. C., & Blundell, J. E. (1998). Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 61(2), 159-168.
- Häring, M., Marsicano, G., Lutz, B., & Monory, K. (2007). Identification of the cannabinoid receptor type 1 in Serotonergic cells of raphe nuclei in mice. *Neuroscience*, 146, 1212-1219.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., et al. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(5), 1932-1936.
- Hilairret, S., Bouaboula, M., Carriere, D., Le Fur, G., & Casellas, P. (2003). Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23731-23737.
- Ho, J., Cox, J. M., & Wagner, E. J. (2007). Cannabinoid-induced hyperphagia: Correlation with inhibition of proopiomelanocortin neurons? *Physiology & Behavior*, 92, 507-519.

- King, P. J., & Williams, G. (1998). Role of ARC NPY neurons in energy homeostasis. *Drug News & Perspective*, *11*(7), 402-410.
- López-Alonso, V. E., Mancilla-Díaz, J. M., & Escartín-Pérez, R. E. (2002). Secuencia de saciedad conductual: un análisis de la conducta de alimentación. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta/ Mexican Journal of Behavior Analysis*, *28*(2), 131-144.
- Lopez-Alonso, V. E., Mancilla-Diaz, J. M., Rito-Domingo, M., Gonzalez-Hernandez, B., & Escartin-Perez, R. E. (2007). The effects of 5-HT1A and 5-HT2C receptor agonists on behavioral satiety sequence in rats. *Neuroscience Letters*, *416*(3), 285-288.
- Mahler, S. V., Smith, K. S., & Berridge, K. C. (2007). Endocannabinoid hedonic hot-spot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology*, *32*(11), 2267-2278.
- Malcher-Lopes, R., Di, S., Marcheselli, V. S., Weng, F. J., Stuart, C. T., Bazan, N. G., & Tasker, J.G. (2006) Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *Journal of Neuroscience*, *26*(24), 6643-6650.
- Mancilla-Diaz, J. M., Escartin-Perez, R. E., & Lopez-Alonso, V. E. (2003). The effect of 5-HT on feeding behaviour in mianserin- or cyproheptadine-pretreated rats. *Eating and Weight Disorders*. *8*(4), 268-273.
- Matias, I. Gonthier, M.P. Orlando, P. Martiadis, V. De Petrocellis, L. Cervino, C. Petrosino, S. Hoareau, L. Festy, F. Pasquali, R. Roche, R. Maj, M. Pagotto, U. Monteleone P, Di Marzo, V. (2006). Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *91*(8),3171-80.
- McGuirk, J., Muscat, R., & Willner, P. (1992). Effects of the 5-HT uptake inhibitors, femoxetine and paroxetine, and a 5-HT1A/B agonist, eltoprazine, on the behavioural satiety sequence. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *41*(4), 801-805.
- Nakata, M., & Yada, T. (2008). Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca²⁺ oscillation in islet β -cells via CB1 receptors. *Regulatory Peptides*, *145*(1-3), 49-53.
- Nakazi, M., Bauer, U., Nickel, T., Kathmann, M., & Schlicker, E. (2000). Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *361*, 19-24.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed.
- Ravinet Trillou, C., Arnone, M., Delgorge, C., Gonalons, N., Keane, P., Maffrand, J. P., & Soubrie, P. (2003). Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *284*(2), R345-53.

- Schlicker, E., & Kathmann, M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11), 565-572.
- Tang, S. L., Tran, V., & Wagner, E. J. (2005). Sex differences in the cannabinoid modulation of an A-Type K⁺ current in neurons of the mammalian hypothalamus. *Journal of Neurophysiology*, 94, 2983-2986.
- Van Gaal, L. F., Rissanen, A. M., Scheen, A. J., Ziegler, O., & Rossner, S. (2005). Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*, 365(9468), 1389-1397.
- Verty, A. N., McGregor, I. S., & Mallet, P. E. (2005). Paraventricular hypothalamic CB(1) cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology*, 49(8), 1101-1109.
- Vickers, S. P., Clifton, P. G., Dourish, C. T., & Tecott, L. H. (1999). Reduced satiating effect of d-fenfluramine in serotonin 5-HT(2C) receptor mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 143(3), 309-314.
- Williams, C. M., & Kirkham, T. C. (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 143(3), 315-317.
- Williams, C. M., Rogers, P. J., & Kirkham, T. C. (1998). Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. *Physiology & Behavior*, 65(2), 343-346.
- Williams, C. M., & Kirkham, T. C. (2002). Observational analysis of feeding induced by Delta9-THC and anandamide. *Physiology & Behavior*, 76(2), 241-50.
- Yun, R., Dourmashkin, J. T., Hill, J., Gayles, E. C., Fried, S. K., & Leibowitz, S. F. (2005). PVN galanin increases fat storage and promotes obesity by causing muscle to utilize carbohydrate more than fat. *Peptides*, 26(11), 2265-2273.