

Original

G1359A polimorfismo del receptor CB1 endocanabinoide (CNR1) en parámetros antropométricos y riesgo cardiovascular en pacientes con obesidad mórbida

D. A. de Luis, M. González Sagrado, R. Aller, O. Izaola, R. Conde, J. L. Pérez Castrillón y E. Romero

Instituto de Endocrinología y Nutrición. Facultad de Medicina y Unidad de Investigación. Hospital Universitario Río Hortega. Universidad de Valladolid. Valladolid. España. RETICEF 056/0013.

Resumen

Introducción: Recientemente se ha descrito un polimorfismo (1359 G/A) del receptor CB1, presentando el alelo A una frecuencia elevada en población europea. El objetivo de nuestro estudio fue evaluar el efecto del polimorfismo (G1359A) del receptor CB1 en parámetros antropométricos, factores de riesgo cardiovascular y niveles de adipocitoquinas en una muestra de pacientes con obesidad mórbida.

Material y métodos: Se analizó una muestra de 66 pacientes con obesidad mórbida. A todos los pacientes se les determinaron el peso, la presión arterial, glucemia en ayunas, proteína C reactiva (PCR), insulina, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos y adipocitoquinas, así como el genotipo del polimorfismo C1359A del receptor CB1 endocanabinoide.

Resultados: Un total de 38 pacientes (57,6%) presentaron un genotipo G1359G (grupo salvaje) y 28 pacientes G1359A (42,4%) (grupo mutante). El peso ($117,4 \pm 17,4$ kg vs $109,4 \pm 13,8$ kg; $p < 0,05$), índice de masa corporal ($45,4 \pm 4,7$ vs $43,3 \pm 3,4$; $p < 0,05$), masa grasa ($60,1 \pm 13,4$ kg vs $53,6 \pm 12,8$ kg; $p < 0,05$), la circunferencia de la cintura ($126,3 \pm 10,8$ cm vs $122,9 \pm 12,6$ cm; $p < 0,05$), proteína C reactiva ($11,2 \pm 8,8$ mg/dl vs $7,8 \pm 4,6$ mg/dl; $p < 0,05$), insulina ($23,5 \pm 19,8$ mUI/L vs $18,4 \pm 17,1$ mUI/L; $p < 0,05$) y HOMA ($6,46 \pm 6,2$ vs $4,70 \pm 4,6$; $p < 0,05$) fueron inferiores en los obesos mórbidos con el genotipo G1359A, el resto de parámetros no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Conclusión: La presencia del alelo A1359 del receptor CB1 en pacientes con obesidad mórbida se relaciona con un menor peso, índice de masa corporal, masa grasa y circunferencia de la cintura, así como con un mejor perfil metabólico, con valores más bajos de insulina, HOMA y proteína C reactiva.

(Nutr Hosp. 2009;24:688-692)

DOI:10.3305/nh.2009.24.6.4453

Palabras clave: Adipocitoquinas. Receptor canabinoide. Obesidad. Polimorfismo. Factores de riesgo cardiovascular.

Correspondencia: D. A. de Luis.
Profesor Asociado de Nutrición.
Director del Instituto de Endocrinología y Nutrición.
Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.
C/Los Perales, 16.
47130 Simancas, Valladolid, España.
E-mail: dadluis@yahoo.es

Recibido: 10-IV-2009.
Aceptado: 21-VII-2009.

G1359A POLYMORPHISM OF THE CANNABINOID RECEPTOR GENE (CNR1) ON ANTHROPOMETRIC PARAMETERS AND CARDIOVASCULAR RISK FACTORS IN PATIENTS WITH MORBID OBESITY

Abstract

Background: A polymorphism (1359 G/A) of the CB1 gene has been described, it was reported as a common polymorphism in European populations. The aim of our study was to investigate the influence of this polymorphism of CB1 receptor gene on obesity anthropometric parameters, cardiovascular risk factors and adipocytokines in morbid obese patients.

Design: A population of 66 morbid obese patients was analyzed. An indirect calorimetry, tetrapolar electrical bioimpedance, blood pressure, a serial assessment of nutritional intake with 3 days written food records and biochemical analysis (lipid profile, adipocytokines, insulin, CRP and lipoprotein-a) were performed. The statistical analysis was performed for the combined G1359A and A1359A as a group and wild type G1359G as second group, with a dominant model.

Results: Thirty eight patients (57.6%) had the genotype G1359G (wild type group) and 28 (42.4%) patients G1359A (40.0%) (mutant type group). Weight (117.4 ± 17.4 kg vs 109.4 ± 13.8 kg; $p < 0.05$), BMI (45.4 ± 4.7 vs 43.3 ± 3.4 ; $p < 0.05$), fat mass (60.1 ± 13.4 kg vs 53.6 ± 12.8 kg; $p < 0.05$), waist circumference (126.3 ± 10.8 cm vs 122.9 ± 12.6 cm; $p < 0.05$), C reactive protein (11.2 ± 8.8 mg/dl vs 7.8 ± 4.6 mg/dl; $p < 0.05$), insulin (23.5 ± 19.8 mUI/L vs 18.4 ± 17.1 mUI/L; $p < 0.05$) and HOMA (6.46 ± 6.2 vs 4.70 ± 4.6 ; $p < 0.05$) were lowers in patients with G1359A genotype. No differences were detected between groups in other parameters.

Conclusion: The mutant genotype G1359A is associated with a better cardiovascular profile (weight, BMI, fat mass, waist circumference, insulin, HOMA and c reactive protein) than wild type group.

(Nutr Hosp. 2009;24:688-692)

DOI:10.3305/nh.2009.24.6.4453

Key words: Adipocytokines. Cannabinoid receptor. Obesity. Polymorphism. Cardiovascular risk factors.

Introducción

El tejido adiposo se considera en la actualidad un órgano endocrino capaz de enviar señales que modulan el apetito, el gasto energético, la resistencia a la insulina, así como los procesos inflamatorios¹.

Dentro de la complejidad de funcionamiento de este tejido, en la última década se ha redescubierto el papel del sistema endocanabinoide. Desde la antigüedad se conocen los efectos psicológicos de *Cannabis sativa* (marihuana), incluyendo su efecto sobre el apetito y el peso corporal², sin embargo las bases biológicas de estas relaciones han sido descritas recientemente^{3,4}. Este sistema consiste en dos ligandos endógenos; el 2-arachidonoilglycerol (2-AG) y anandamide (ADA) y dos tipos de receptores acoplados a proteínas G. El receptor endocanabinoide tipo-1 (CB1), localizado en diversas localizaciones del cerebro y en tejidos periféricos como el tejido graso y el receptor CB2, localizado fundamentalmente en el sistema inmune⁵. El interés por este sistema se ha incrementado al demostrarse como en estudios de animales con una delección del receptor CB1, presentaban un fenotipo delgado y eran resistentes a la obesidad inducida por una dieta rica en grasa⁶. Recientemente se ha descrito un polimorfismo (1359 G/A) de este receptor que produce una sustitución de G a A en la posición 1359 en el codón 435 (Thr), presentando el alelo A una frecuencia en población europea que oscila entre el 24-32%⁷ (A).

Teniendo en cuenta esta relación entre el sistema endocanabinoide y aspectos metabólicos⁸, nos propusimos evaluar estas asociaciones en pacientes con obesidad mórbida. El objetivo de nuestro estudio fue evaluar el efecto del polimorfismo (G1359A) del receptor CB1 en parámetros antropométricos, factores de riesgo cardiovascular y niveles de adipocitoquinas en una muestra de pacientes con obesidad mórbida.

Pacientes y métodos

Pacientes

Se analizó de manera prospectiva una muestra de 66 obesos mórbidos (índice de masa corporal > 40). Los pacientes fueron evaluados en una Unidad de Nutrición Clínica y firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio. Los criterios de exclusión fueron una historia previa de patología isquémica cardiovascular o cerebral en los 36 meses previos, elevación del colesterol > 300 mg/dl, triglicéridos > 400 mg/dl, presión arterial > 140/90 mmHg, glucosa en ayunas > 126 mg/dl, así como la toma de cualquier fármaco que pudiera modificar el metabolismo lipídico o de los hidratos de carbono.

Procedimiento

A todos los pacientes se les determinaron el peso, la presión arterial, glucemia en ayunas, proteína C reac-

tiva (PCR), insulina, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos y adipocitoquinas (leptina, adiponectina, resistina, TNF α , e interleukina 6).

Genotipado del receptor CB1

Los cebadores (Oligonucleotide primers) y las sondas para los experimentos fueron diseñadas mediante el programa Beacon Designer 4.0 (Premier Biosoft International®, LA, CA). La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se realizó con 50 ng DNA genómico, 0.5 μ L de primers (primer forward: 5'-TTC ACA GGG CCG CAG AAA G-3'; and reverse 5'-GAG GCA TCA GGC TCA CAG AG-3'), y 0.25 uL de cada sonda (sonda salvaje: 5'-Fam-CTG TCT CAG GCC CCA AGG CAG G-BHQ-1-3') y (sonda mutante: 5'-Texas red- ATC AAG AGC ACA GTC AAG ATT GCC -BHQ-1-3') en un volumen final de 25 uL (Termociclador iCycler IQ (Bio-Rad®, Hercules, CA). El DNA fue desnaturalizado a 95°C durante 3 min; posteriormente se realizaron 50 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s, y anillamiento a 59.3°C durante 45 s). La RCP se realizó en un volumen final de 25 uL que contenía 12.5 μ L de IQTM Supermix (Bio-Rad®, Hercules, CA) con "hot start Taq DNA polymerase".

Determinaciones bioquímicas

Las concentraciones de colesterol y triglicéridos se determinaron mediante ensayos enzimocolorimétricos (Technicon Instruments, Ltd., New York, N.Y., USA). Los niveles de HDL colesterol se determinaron enzimáticamente en el sobrenadante tras precipitación con dextrano sulfato-magnesico.

Los niveles de glucosa se determinaron mediante un método automatizado de glucosa oxidasa (Glucose analyser 2, Beckman Instruments, Fullerton, California). La insulina fue medida mediante un ensayo enzimocolorimétrico (Insulina, WAKO Pure-Chemical Industries, Osaka, Japan) y se determinó la resistencia a la insulina mediante el modelo "homeostasis model assessment for insulin sensitivity" (HOMA)⁹.

La proteína C reactiva (PCR) se determinó mediante inmunoturbidimetría (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), con un rango de normalidad de (0-7 mg/dl) y una sensibilidad analítica de 0,25 mg/dl.

Adipocitoquinas

La resistina fue medida mediante ELISA (Biovendor Laboratory, Inc., Brno, Czech Republic) con una sensibilidad analítica de 0,2 ng/ml y un rango de normalidad de 4-12 ng/ml. La leptina fue medida mediante ELISA (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, USA) con una sensibilidad de 0,05 ng/ml y un rango de normalidad de 10-100 ng/ml. La adiponectina fue

determinada mediante ELISA (R&D systems, Inc., Mineapolis, USA) con una sensibilidad de 0,246 ng/ml y un rango de normalidad de 8,65-21,43 ng/ml. La interleukina 6 y el TNF α fueron medidos por ELISA (R&D systems, Inc., Mineapolis, USA) con una sensibilidad de 0,7 pg/ml y 0,5 pg/ml, respectivamente. Los valores de normalidad fueron para IL6 de (1,12-12,5 pg/ml) y para TNF α (0,5-15,6 pg/ml).

Calorimetría indirecta

Para la determinación del gasto energético, los sujetos fueron evaluados en una Unidad Metabólica. Tras doce horas de ayuno y reposo, los pacientes fueron sometidos en condiciones homogéneas a una calorimetría mediante máscara ajustable (Med-Gem; Health Tech, Golden, USA). Se calcularon el gasto energético basal (kcal/día) y el consumo de oxígeno (ml/min)¹⁰.

Determinaciones antropométricas

El peso fue medido mediante una báscula con una precisión de 0,1 kg y el índice de masa corporal se calculó con la fórmula (peso/talla²). Se determinó el perímetro de la cintura y de la cadera para calcular el índice cintura cadera (ICC). Se realizó una impedanciometría tetrapolar para determinar la composición corporal¹¹ (Biodynamics Model 310e, Seattle, WA, USA). Se utilizaron la resistencia y la reactancia para calcular el agua corporal total, la grasa y la masa libre de grasa.

La presión arterial fue determinada 2 veces con el paciente en reposo mediante un esfigmomanómetro de mercurio y se realizó el promedio de las dos determinaciones.

Ingesta dietética

Los pacientes fueron encuestados durante 3 días mediante un registro escrito de 24 horas para evaluar su ingesta dietética. Los registros fueron evaluados por un dietista utilizando un software con bases de alimentos nacionales¹². El ejercicio físico realizado por los pacientes fueron 3 sesiones de ejercicio aeróbico de una hora.

Análisis estadístico

El tamaño muestral fue calculado para detectar una diferencia de peso de 3 kg con un poder del 90% y un error alfa del 5% (n = 65). Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. La normalidad de las variables fue analizada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables cuantitativas con una distribución normal fueron analizadas con el test t de

Student's. Las variables no paramétricas fueron analizadas con los tests W-Wilcoxon test y U Mann Whitney. Las variables cualitativas fueron analizadas con el test de la chi-cuadrado, con la corrección de Yates cuando fue necesario y el test de Fisher. El análisis estadístico fue realizado con la combinación de los genotipos (G1359A y A1359A como grupo mutante) y del genotipo G1359G como grupo salvaje (modelo dominante). Se consideró estadísticamente significativa una p inferior a 0,05.

Resultados

Un total de 66 pacientes obesos mórbidos fueron reclutados, firmando el consentimiento informado. La edad media de los pacientes fue de 48,1 \pm 16,1 años con un índice de masa corporal (IMC) de 44,4 \pm 4,7, con un total de 17 varones (25,8%) y 49 mujeres (74,2%).

Un total de 38 pacientes (10 varones/28 mujeres) (57,6%) presentaron un genotipo G1359G (grupo salvaje) y 28 pacientes (7 varones/21 mujeres) G1359A (42,4%) (grupo mutante).

La tabla I muestra las variables antropométricas. El peso, índice de masa corporal, masa grasa y circunferencia de la cintura fueron inferiores en los obesos mórbidos con el genotipo G1359A, el resto de parámetros no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

La tabla II muestra los factores de riesgo cardiovascular. Los niveles de proteína C reactiva, insulina y HOMA fueron significativamente inferiores en los pacientes con genotipo mutante. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el resto de parámetros.

Tabla I
Variables antropométricas

| Parámetros | G1359G (n = 35) | (G1359A) (n = 28) |
|----------------|--------------------|----------------------|
| IMC | 45,4 \pm 4,7 | 43,3 \pm 3,4* |
| Peso (kg) | 117,4 \pm 17,4 | 109,4 \pm 13,8* |
| MLG (kg) | 55,6 \pm 6,9 | 53,9 \pm 7,1 |
| MG (kg) | 60,1 \pm 13,4 | 53,6 \pm 12,8* |
| CC (cm) | 126,3 \pm 10,8 | 122,9 \pm 12,6* |
| ICC | 0,93 \pm 0,1 | 0,92 \pm 0,07 |
| TAS (mmHg) | 139,3 \pm 11,4 | 135,7 \pm 13,8 |
| TAD (mmHg) | 88,4 \pm 7,9 | 86,1 \pm 9,2 |
| GEB (kcal/día) | 2,213 \pm 511 | 2,279 \pm 812 |

IMC: Índice de masa corporal. MLG: Masa libre de grasa. MG: Masa grasa. CC: Circunferencia de la cintura. ICC: Índice cintura cadera. TAS: Tensión arterial sistólica. TAD: Tensión arterial diastólica. GEB: Gasto energético basal. (*) P < 0,05.

Tabla II
Factores de riesgo cardiovascular

| Parámetros | G1359G (n = 38) | (G1359A) (n = 28) |
|-------------------|--------------------|----------------------|
| Glucosa (mg/dl) | 105,2 ± 23,3 | 102,6 ± 13,8 |
| Col-Total (mg/dl) | 206,6 ± 32,7 | 199,9 ± 40,5 |
| LDL-col. (mg/dl) | 128,1 ± 26,6 | 121,1 ± 36,4 |
| HDL-col. (mg/dl) | 52,7 ± 10,4 | 55,1 ± 11,9 |
| TG (mg/dl) | 138,7 ± 61,9 | 116,4 ± 44,3 |
| Insulina (mUI/L) | 23,5 ± 19,8 | 18,4 ± 17,1* |
| HOMA | 6,46 ± 6,2 | 4,70 ± 4,6* |
| PCR (mg/dl) | 11,2 ± 8,8 | 7,8 ± 4,6* |

Col: Colesterol total. TG: Triglicéridos. PCR: proteína c reactiva. HOMA: Homeostasis model assessment.

La tabla III muestra la ingesta dietética de estos pacientes, siendo similar en ambos grupos. En la tabla IV se muestran los niveles de adipocitoquinas, presentando ambos genotipos los mismos niveles de leptina, resistina, adiponectina, interleukina 6 y TNF alfa.

Discusión

El principal hallazgo de nuestro estudio es la asociación del genotipo G1359A con unos niveles más bajos de proteína C reactiva, insulina y HOMA que los pacientes con genotipo G1359G del receptor endocanabinoide CB1.

No existe una clara explicación fisiopatológica de esta relación existente entre el genotipo G1359A y el perfil

Tabla III
Encuesta nutricional con ingestas dietéticas

| Parámetros | G1359G (n = 38) | (G1359A) (n = 28) |
|------------------------|--------------------|----------------------|
| Energía (kcal/día) | 1.727,1 ± 520 | 1.718,9 ± 511 |
| CH (g/día) | 171,7 ± 60,1 | 172,4 ± 61,9 |
| Grasa (g/día) | 74,8 ± 28,9 | 73,4 ± 21,8 |
| Grasa-S (g/día) | 21,8 ± 11 | 21,3 ± 11,5 |
| Grasa-M (g/día) | 35,6 ± 10,3 | 35,2 ± 12,5 |
| Grasa-P (g/día) | 7,2 ± 4,0 | 7,4 ± 3,8 |
| Proteína (g/día) | 85,2 ± 21,3 | 83,9 ± 21,5 |
| Ejercicio (hs./semana) | 1,41 ± 3,0 | 1,39 ± 3,2 |
| Fibra dietética | 14,3 ± 6,2 | 14,2 ± 6,1 |

CH: Carbohidratos. Grasa S: grasa saturada. Grasa-M: grasa monoinsaturada. Grasa-P: grasa poliinsaturada. No existieron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla IV
Niveles séricos de adipocitoquinas

| Parámetros | G1359G (n = 38) | (G1359A) (n = 28) |
|----------------------|--------------------|----------------------|
| IL 6 (pg/ml) | 4,3 ± 3,9 | 4,6 ± 3,4 |
| TNF-α (pg/ml) | 6,7 ± 4,9 | 6,9 ± 6,2 |
| Adiponectina (ng/ml) | 44,1 ± 32,1 | 38,4 ± 29,8 |
| Resistina (ng/ml) | 4,1 ± 1,7 | 4,6 ± 3,1 |
| Leptina (ng/ml) | 134,2 ± 108,9 | 135,1 ± 114,8 |

IL-6: Interleukina 6. No existieron diferencias estadísticamente significativas.

metabólico en los pacientes con obesidad mórbida. Los conocimientos de la literatura permiten intuir una relación entre la actividad del sistema endocanabinoide a nivel central, el comportamiento nutricional y los parámetros metabólicos¹³. De este modo la presencia de este polimorfismo podría convertirse en un factor de prevención frente a parámetros antropométricos y bioquímicos relacionados con el riesgo cardiovascular en los pacientes obesos. Por otra parte, el receptor CB1 se expresa a nivel periférico, pudiéndose relacionarse con el control metabólico del paciente obeso. Se ha detectado una regulación negativa de la amida hidrolasa de ácidos grasos en pacientes obesos a nivel del tejido adiposo, pudiendo contribuir a modular la actividad endocanabinoide¹⁴.

En relación a la prevalencia del genotipo mutado, nuestro trabajo presenta una prevalencia (42,4%) similar a la de otros estudios; 43,5%¹⁵ y 33,1%¹⁶, aunque superior a la referenciada se ha encontrado en otros trabajos; 19,6%¹⁷.

Con respecto a la relación de este polimorfismo del receptor canabinoide CB1 con los datos antropométricos de pacientes obesos, otros trabajos como el de Gazerro y cols.¹⁵ con el mismo polimorfismo (G1359A) y también con otros polimorfismos de el receptor CB1 (A3813G, A4895G, G1422A A3813A y A4895A)¹⁸⁻¹⁹. Por ejemplo, el alelo 1422A¹⁸ muestra un mayor riesgo de obesidad en varones y el alelo 3813G¹⁹ se relaciona con un mayor depósito de grasa abdominal. Estos resultados han sido descritos por Benzinou y cols.²⁰ con los polimorfismos A10908G y T5489C del receptor CB1. La variabilidad en la prevalencia de este polimorfismo, así como la diferente fuerza de asociación con parámetros antropométricos y bioquímicos, pueden reflejar la complejidad en la interacción entre las características genéticas de los pacientes y la interacción con el ambiente. Por otra parte el diseño de los trabajos referenciados puede también intervenir en los resultados obtenidos. Los diferentes criterios de inclusión utilizados, como por ejemplo índice de masa corporal y edad de los pacientes, así como la ingesta dietética que no ha sido controlada en ninguno de los estudios previamente publicados.

Con respecto a las modificaciones bioquímicas, el trabajo de Ravinet y cols.⁶ muestra como los ratones defi-

cientes en el gen del receptor CB-1 eran más delgados y resistentes a aumentar de peso con dietas hipercalóricas, mostrando unos niveles de leptina e insulina inferiores. En nuestra muestra de pacientes con obesidad mórbida, los niveles de insulina, HOMA y proteína C reactiva fueron inferiores en los individuos con el alelo mutado (A1359), siendo muy similares a los resultados obtenidos por Gazeerro y cols.¹⁵. Esta asociación del alelo A1359 con un mejor perfil metabólico ha sido también descrito por Alberle y cols.¹⁷ en un estudio de intervención. En este trabajo los pacientes obesos con un alelo A del receptor CB1 y tras ser sometidos a una dieta hipocalórica presentaban una mayor disminución de peso y de LDL colesterol que los pacientes con el genotipo salvaje. Posiblemente la explicación para esta asociación metabólica pueda deberse a la modulación que realiza el sistema endocannabinóide a través del receptor CB1 en una gran cantidad de vías metabólicas a nivel celular. Por ejemplo en el tejido adiposo marrón, el tratamiento con antagonistas del receptor CB1 es capaz de estimular el gasto energético, mediado por la disipación de energía a través de la producción de calor mitocondrial²¹. Otra posible vía metabólica es la sobreexpresión de adiponectina inducida por los antagonistas del receptor CB1, demostrada in vitro en la línea adipocitaria 3T3 F442A²² e in vivo en ratones obesos²³. No obstante nuestro trabajo no ha conseguido demostrar esta vía de las adipocitoquinas, no detectando ninguna diferencia en los niveles séricos entre ambos genotipos. Una tercera vía metabólica, pudiera ser una acción directa del propio receptor sobre el metabolismo lipídico y de los hidratos de carbono, de este modo se han descrito alteraciones en el perfil lipídico relacionadas con variantes genéticas del receptor CB1, sin existir ninguna relación con el índice de masa corporal²⁴.

En conclusión, la presencia del alelo A1359 del receptor CB1 en pacientes con obesidad mórbida se relaciona con un menor peso, índice de masa corporal, masa grasa y circunferencia de la cintura, así como con un mejor perfil metabólico, con valores más bajos de insulina, HOMA y proteína C reactiva.

Referencias

- Matsuzawa Y. Adipocytokines: Emerging therapeutic targets. *Current Atherosclerosis Reports* 2005; 7: 58-62.
- Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 1999; 58: 315-348.
- Brown SM, Warger-Miller J, Mackie K. Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1576: 255-264.
- Fride E. Endocannabinoids in the central nervous system an overview. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty acids* 2002; 66: 221-233.
- Felder CC, Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 179-200.
- Ravinet TC, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrie P. CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 640-648.
- Gadzicki D, Muller-Vahl K, Stuhmann M. A frequent polymorphism in the coding exon of the human cannabinoid receptor (CNR1) gene. *Mol Cell Probes* 1999; 13: 321-323.
- Duart MJ, Arroyo CO, Moreno JL. Validation of an insulin model for the reactions in RIA. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 1161-1167.
- Mathews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-414.
- Feurer ID, Mullen JL. Bedside measurement of resting energy expenditure and respiratory quotient via indirect calorimetry. *Nutr Clin Pract* 1986; 1: 43-49.
- Pichard C, Slosman D, Hirschel B, Kyle U. Bioimpedance analysis: an improved method for nutritional follow up. *Clin Res* 1993; 41: 53.
- Mataix J, Mañas M. Tablas de composición de alimentos españoles. Ed: University of Granada, 2003.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. Leptin. Regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001; 410: 822-825.
- Engeli S, Jana B, Mareike F, Kerstin G, Jürgen J, Sandor B. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005; 54: 2838-2843.
- Gazzerro P, Caruso MG, Notarnicola M, Misciagna G, Guerra V, Laezza C, Bifulco M. Association between cannabinoid type 1 receptor polymorphism and body mass index in a southern Italian population. *Int J Obes* 2007; 31: 908-912.
- Jaeger J, Mattevi V, Callegari-Jacques SD, Hutz MH. Cannabinoid type 1 receptor gene polymorphisms are associated with central obesity in a Southern Brazilian population. *Disease Markers* 2008; 25: 67-74.
- Aberle J, Flitsch J, Alessia N, Mann O, Busch P, Peitsmeier P, Ulrich F. Genetic variation may influence obesity only under conditions of diet: analysis of three candidate genes. *Molecular Genetics and Metabolism* 2008; 95: 188-191.
- Russo P, Strazzullo P, Cappuccio F, Tregouet D, Lauria F, Loguercio M, Barba G y cols. Genetic variations at the endocannabinoid type 1 receptor gene (CNR1) are associated with obesity phenotypes in Men. *J Clin Endo and Metab* 2007; 92: 2382-2389.
- Peeters A, Beckers S, Mertens I, Van Hul W, Van Gaal L. The G1422A variant of the endocannabinoid receptor gene is associated with abdominal adiposity in obese men. *Endocr* 2007; 31: 138-141.
- Benzinou M, Chevre JC, Ward K, Lecoer C, Dina C, Lobbens S, y cols. Endocannabinoid receptor 1 gene variations increase risk for obesity and modulate body mass index European population. *Human Molecular Genetics* 2008; 17: 1916-1921.
- Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Pelleriaux A. The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J* 2005; 19: 1567-1569.
- Bensaid M, Gary Bobo M, Esclangron A, Maffrand JP, Le Fut G, Oury DONat F. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acip 30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultures adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 908-914.
- Poirier B, Bidoauard JP, Cadrouvele C, Marniquet X, Staels B, O'Connor SE. The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabetes, Obes, Metab* 2005; 7: 65-72.
- Baye TM, Zhang Y, Smith E, Hillard CJ, Gunnell J, Myklebust J, James R, Kissebah AH y cols. Genetic variation in cannabinoid receptor 1 (CNR1) is associated with derangements in lipid homeostasis, independent of body mass index. *Pharmacogenomics* 2008; 9:1647-1656.