



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Caracterización conductual y electrofisiológica de fármacos supresores
del apetito derivados de la anfetamina y su interacción con precursores de
la serotonina en la inducción de pérdida de peso corporal en ratas**

Tesis que presenta

M. en C. Claudia Ibeth Pérez Díaz

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

FARMACOLOGÍA

Director de tesis:

Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza

Ciudad de México, México

Julio, 2017

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo en el CINVESTAV en el laboratorio de Neurobiología del Apetito del Departamento de Farmacología, bajo la tutoría del Dr. Ranier Gutiérrez, con el apoyo de CONACyT a través de beca de doctorado para Claudia Ibeth Pérez, Fronteras de la ciencia FOINS-63, Problemas Nacionales 464 y Productos Medix 1020 (Ranier Gutiérrez)

LISTA DE CONTENIDO	PAG
Índice.....	i
Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	iv
Abreviaturas.....	v
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. La obesidad y su prevalencia en México.....	9
1.2. Neurobiología de la ingesta de alimento.....	9
1.3. El núcleo accumbens shell como un blanco terapéutico para el control de la obesidad	12
1.4. Dopamina y conducta alimentaria	14
1.5. Papel de la DA en la locomoción y el ciclo sueño-vigilia.....	15
1.6. Anatomía del núcleo accumbens	16
1.7. Mecanismos de acción de los fármacos supresores del apetito que actúan a nivel del sistema nervioso central.....	19
1.7.1. Fármacos que liberan dopamina y norepinefrina	20
1.8. Síndrome de alimentación nocturna	23
1.9. 5-hidroxitriptófano.....	25
1.10. La serotonina y su implicación en la conducta alimentaria	26
1.11. Interacción DA/5-HT en la conducta locomotora e ingesta de alimento.....	27
2. JUSTIFICACIÓN.....	32
3. HIPÓTESIS	32

4. OBJETIVOS	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Animales.....	34
5.2. Fármacos utilizados.....	34
5.3. Procedimientos quirúrgicos.....	34
5.4. Evaluación del efecto del DEP en la pérdida de peso en ratas durante dos fases de administración	37
5.5. Evaluación de la eficacia en la combinación de PHEN y el 5-HTP en la pérdida de peso en ratas	39
5.6. Histología	42
5.7. Análisis de datos.....	42
6. RESULTADOS (PRIMER OBJETIVO).....	43
6.1. Determinación de los metabolitos del DEP en plasma.	43
6.2. Efecto del DEP sobre el peso corporal y el consumo de alimento a diferentes tiempos de administración.....	44
6.2.1. Cambios en el peso corporal y el consumo de alimento	44
6.2.2. Cambios en los patrones de distribución (día-noche) en el consumo de alimento durante la administración crónica del DEP	46
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN (PRIMER OBJETIVO).....	50
8. RESULTADOS (SEGUNDO OBJETIVO).....	54
8.1. Curva dosis-respuesta de PHEN y el 5-HTP en la pérdida de peso.....	54
8.2. Evaluación de la combinación de PHEN y el 5-HTP en la pérdida de peso e ingesta de alimento	55
8.3. Efecto de la combinación de PHEN con el 5-HTP con respecto a la locomoción y la estereotipia.....	58
8.4. Efecto de la inactivación de los receptores D1 (SCH) y D2 (RAC) en el NAcSh sobre los efectos farmacológicos inducidos por PHEN	63
8.5. PHEN modula la actividad neuronal del NAcSh	67

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN (SEGUNDO OBJETIVO)	73
10. CONCLUSIÓN GENERAL	78
11. LIMITACIONES	78
12. BIBLIOGRAFÍA	79
13. PUBLICACIÓN REALIZADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación de la homeostasis energética.	11
Figura 2. Integración entre el sistema homeostático y el de recompensa.	12
Figura 3. Efecto de una infusión Intra-NAcSh de antagonistas dopaminérgicos (D1r y D2r) tras una administración sistémica de DEP.	13
Figura 4. Efecto en la locomoción y alimentación tras una administración de la L-DOPA i.p. (precursor de la DA) sola o en combinación con carbidopa (inhibidor de la descarboxilasa periférica) en ratones DA -/-	14
Figura 5. Efecto de la activación de D1r y D2r en la conducta de sueño-vigilia y la locomoción.....	16
Figura 6. Tipos de neuronas en el estriado y sus principales proyecciones.....	18
Figura 7. La liberación de la DA mediado por las anfetaminas.	20
Figura 8. Estructuras químicas de los fármacos análogos a las anfetaminas, todos considerados supresores del apetito.....	21
Figura 9. Prescripciones per cápita de fármacos supresores del apetito en Estados Unidos (1991-2011).	22
Figura 10. Efecto de fármacos supresores del apetito en ratas durante un tratamiento sistémico de 7 días.	23
Figura 11. Distribución de pacientes con NES de acuerdo a su índice de masa corporal (BMI).	24
Figura 12. Efecto de la administración del 5-HTP en el consumo de alimento en ratas privadas de alimento durante 24 horas.	26
Figura 13. Un agonista selectivo a receptores 5-HT _{1B} incrementa la liberación de DA en el NAcSh.....	28
Figura 14. El antagonista de receptores 5HT _{2B/2C} (SB 206553) potencializa la locomoción inducida por la anfetamina y la fenfluramina.	29

Figura 15. Efecto de la administración periférica de la anfetamina (AMPH) sola o en combinación con 5-HTP.....	30
Figura 16. Concentración del DEP y sus metabolitos en plasma de rata (n= 4) después de una administración i.p. única del DEP, usando una dosis de 20 mg/kg.....	44
Figura 17. Efecto del DEP20 (20 mg/kg) en el peso corporal y el consumo de alimento durante dos fases de administración (Fase Activa y Fase Inactiva).....	46
Figura 18. Patrones de distribución en el consumo de alimento durante la fase activa (6:00 pm – 6:00 am) y durante la fase inactiva (6:00 am – 6:00 pm) en los periodos de línea base (LB), tratamiento y después de retirar el tratamiento con el DEP (RT).....	49
Figura 19. Curva dosis efectiva en la pérdida de peso para el 5-HTP y PHEN en ratas.....	54
Figura 20. Efecto de PHEN sola o en combinación con el 5-HTP en la pérdida de peso y en el consumo de alimento en rata durante 7 días continuos de inyecciones i.p.....	58
Figura 21. Efecto de PHEN sola y en combinación con el 5-HTP sobre la locomoción y estereotipia durante 7 días continuos de tratamiento.	62
Figura 22. Infusiones de los antagonistas dopaminérgicos SCH23390 (D1r, SCH) y raclopride (D2r, RAC) en el NAcSh bajo el efecto de la administración periférica de PHEN durante un tratamiento de 7 días continuos.....	66
Figura 23. Actividad poblacional unitaria de 514 neuronas moduladas (de 696 neuronas registradas) durante el periodo de línea base, salina, carbidopa (CB) y tratamiento (PHEN y/o 5-HTP).....	69
Figura 24. Cambios en la conducta alimenticia y en la actividad poblacional del NAcSh durante el tratamiento de PHEN solo o en combinación con 5-HTP.....	72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Medicamentos prescritos comúnmente para el tratamiento de la obesidad, así como la frecuencia de prescripción.....	31
--	----

ABREVIATURAS

PHEN: Fentermina

DEP: Dietilpropión

5-HTP: 5-Hidroxitriptófano

CB: Carbidopa

NAcSh: Núcleo accumbens shell

D1r: Receptores dopaminérgicos D1

D2r: Receptores dopaminérgicos D2

FDA: Food and Drug Administration

VTA: Área ventral tegmental

BMI: Índice de masa corporal

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

CCK: colecistoquinina

PYY₃₋₃₆: Péptido YY

GLP-1: Péptido similar al glucagón

NTS: Núcleo del tracto solitario

AP: Área postrema

ARC: Núcleo arcuato

AgrP: proteína r-agouti

POMC: proopiomelanocortina

FFAs: Ácidos grasos libres

AMY: Amígdala

LHA: Hipotálamo lateral

CB₁: Receptor cannabinoide

i.g.: vía intragástrica

i.p.: vía intraperitoneal

RAC: Raclopride (antagonista a D2r)

SCH: SCH23390 (antagonista a D1r)

DA: Dopamina

REM: Movimientos oculares rápidos

SKF: SKF-82958 (agonista a D1r)
5-HT: Serotonina
L-DOPA: Precursor de la DA
MSN: Neuronas espinosas medianas
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
FSI: Interneuronas de disparo rápido
NE: Norepinefrina
ACh: Acetilcolina
DAT: Transportador a DA
VMAT: transportador de monoaminas vesiculares.
METH: Metanfetamina
BUP: Bupropión
NES: Síndrome de alimentación nocturna
AADC: L-aminoácido aromático descarboxilasa
BHE: Barrera hematoencefálica
NAc: Núcleo accumbens
AMPH: Anfetamina
FEN: Fenfluramina
SB: SB 206553 (antagonista a los receptores 5HT_{2B/2C})
ANOVA-RM: ANOVA de repetidas medidas

RESUMEN

La obesidad y sobrepeso es un problema de salud pública que ha alcanzado proporciones epidémicas en las últimas tres décadas. Aunque una dieta balanceada y ejercicio son la mejor opción para prevenir y combatir a la obesidad, ambas actividades pueden ser complementadas con el uso de fármacos supresores del apetito. Estos fármacos han sido utilizados para el tratamiento de la obesidad por más de 50 años y son regularmente derivados de las anfetaminas, tal es el caso del dietilpropión (DEP) y la fentermina (PHEN), cuyos efectos están mediados a través de la liberación de neurotransmisores como la serotonina (5-HT), la norepinefrina (NE) y principalmente de la dopamina (DA). Su efecto secundario más importante es el insomnio, el cual está ligado al síndrome de alimentación nocturna (que es un predictor del desarrollo de la obesidad), por lo que es importante determinar cuál es el mejor horario para la administración de estos supresores del apetito. Un primer objetivo de esta tesis fue precisamente caracterizar los efectos del tratamiento del DEP en ratas administrado intraperitonealmente en dos fases distintas del día: 1) durante su fase activa (de noche) y 2) durante su fase inactiva (de día), ya que los roedores son animales nocturnos. Encontramos que la administración del DEP durante la fase inactiva (cuando las ratas están durmiendo), no sólo les produjo insomnio, sino también incrementó su conducta de alimentación durante su fase inactiva, produciendo un efecto similar al reportado en humanos que padecen el síndrome de alimentación nocturna. La administración del DEP durante la fase activa también indujo una pérdida de peso mayor que la inducida durante la fase inactiva. Estos datos son importantes no solo porque resaltan la necesidad de controlar rigurosamente el horario de administración para evitar más efectos secundarios, sino también para potenciar su efecto terapéutico. Por otra parte, los especialistas en el tratamiento de la obesidad suelen prescribir cocteles de medicamentos que en ocasiones no han sido ampliamente estudiados o que no han sido aprobados por la Federal Drug Administration (FDA), tal es el caso de la combinación del PHEN con compuestos precursores de la 5-HT (e.g. 5-hidroxitriptófano, 5-HTP), además de que se desconoce su mecanismo de acción y en qué región del cerebro actúan. Por tal motivo, un segundo objetivo de esta tesis fue evaluar la participación del núcleo accumbens shell (NAcSh), un centro de recompensa del cerebro, en el efecto farmacológico de PHEN y su combinación con un agente serotoninérgico que induce anorexia (i.e. 5-HTP). El NAcSh es una región que recibe entradas dopaminérgicas, del área ventral tegmental, participa en la alimentación y en el control de la actividad motora. Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo estos supresores del apetito modulan su actividad. Para ello, evaluamos los efectos de la combinación de PHEN más 5-HTP sobre la conducta de alimentación y la actividad locomotora en ratas, así como su modulación de la actividad neuronal del NAcSh. Con respecto a la combinación farmacológica de PHEN más 5-HTP, encontramos que la combinación potencia la pérdida de peso y disminuye el consumo de alimento más allá de lo conseguido por si solos. De manera relevante, la combinación farmacológica no solo indujo mayor pérdida de peso, también disminuyó significativamente los efectos secundarios inducidos por PHEN (como son la locomoción y la estereotipia -movimiento de cabeza en forma de vaivén). Por otra parte, debido a que recientemente demostramos que el DEP actúa a través de la activación de los receptores dopaminérgicos del NAcSh (Kalyanasundar et al. 2015), en esta tesis también quisimos probar si otro derivado de la anfetamina, el PHEN, actuaba de la misma manera. Encontramos que la pérdida de peso y la locomoción inducida por PHEN también fue atenuada tras la infusión directamente en el NAcSh de antagonistas a receptores dopaminérgicos SCH23390 (antagonista de receptores a dopamina D1r) y raclopride (antagonista D2r), lo cual demuestra que el efecto de PHEN (al igual que el DEP) depende de la activación de estos receptores dopaminérgicos en el NAcSh, indicando que estos receptores desempeñan un papel muy importante en el mecanismo de acción de diversos supresores del apetito derivados de la anfetamina. Finalmente, también se realizaron registros de la actividad unitaria extracelular del NAcSh, mientras los animales recibieron el tratamiento intraperitoneal de PHEN y/o 5-HTP durante 7 días. Encontramos que la coadministración de 5-HTP no afecta drásticamente la capacidad de PHEN para inhibir la actividad neuronal del NAcSh, lo que puede permitir el efecto aditivo de estos dos fármacos. En resumen, estos

resultados soportan la viabilidad de utilizar la combinación PHEN + 5HTP-carbidopa como un nuevo posible tratamiento para el sobrepeso y la obesidad.

ABSTRACT

Obesity and overweight are a worldwide health problem that has reached epidemic proportions in the last decades. Although diet and exercise are the primary treatments for obesity, these activities are often supplemented by the use of pharmacological appetite suppressants. These compounds are frequently amphetamine congeners like diethylpropion (DEP) and phentermine (PHEN) whose effects are mediated through serotonin, norepinephrine and dopaminergic pathways. The principal side effect is insomnia, approaching with the nocturnal feeding syndrome (NES) (an obesity predictor). It is important to determine the schedule for the administration of this compound. Therefore, we characterize behavioral response to short-term treatment of DEP in rats in two phases, where the animal received daily intraperitoneally injection of DEP during 1) their active phase (at night) and 2) their inactive phase (daytime). We found, that the administration of DEP during the inactive phase of the rats, alters their feeding behavior, similar to what has been reported in humans with NES. Regarding to DEP, we found that DEP's effect on weight loss was significantly greater when it was given in their active phase (at night) than during inactive phase. These data are important because it indicates that it is necessary that these types of medications should be administered in the morning to potentiate its therapeutic effects and to reduce its side effects. In many cases, specialists often prescribe drugs that have not been widely studied and/or have not received approval of the Federal Drug Administration (FDA), such is the case of phentermine and serotonergic compounds (e.g. 5-Hydroxytryptophan, 5-HTP). In addition, it is not known what are its mechanism of action and in which brain region they are acting. For this reason, a second goal of this thesis, was to evaluate the involvement of the nucleus accumbens shell (NAcSh) in the pharmacological effect of some of the appetite suppressants such as PHEN and its combination with serotonergic agents that induce anorexia (such as 5-HTP). The NAcSh receives dopaminergic inputs from ventral tegmental area, and participates in food and motor activity. However, little is known about how these appetite suppressants modulate their activity. To do this, we evaluated the effects of the combination of PHEN plus 5-HTP on feeding behavior and locomotor activity in rats, as well as their modulation of the neuronal activity of NAcSh. We found that the combination of PHEN plus 5-HTP potentiate weight loss and decrease food intake more than each drug alone. More important, the combination decrease phentermine-induced side effects (like locomotion and stereotypy-head weaving). Otherwise, recently demonstrated that DEP acts through activation of dopaminergic receptors in NAcSh, so in this study we also tested if another amphetamine congener, PHEN, could be acting in a similar way as DEP. Our results indicated that PHEN-induced weight loss and locomotion were attenuated following the administration of dopamine antagonist SCH23390 (D1r) or raclopride (D2r) into the NAcSh. These data revealed that appetite suppressant-induced behavioral and neuronal activity recorded in the NAcS depend on to dopaminergic activation, demonstrating a significant role for D1/D2-like receptors in NAcSh in the mechanism of action for these anorexic compounds. Finally, we recorded the neuronal activity in NAcSh while the rat received an intraperitoneal infusion of PHEN and/or 5-HTP across 7 days. We found that the administration of 5-HTP does not affect the ability of PHEN to inhibit neuronal activity into NAcSh. This preclinical evidence indicates that the combination PHEN+5-HTP produced a potentiation effect in weight loss –reduce motor side effects– and can be a potential treatment for overweight and obesity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La obesidad y su prevalencia en México

La obesidad es causada por un incremento en el consumo y a una disminución del gasto energético, generando un almacenamiento de grasa en el organismo (Adan et al. 2008). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) la obesidad se clasifica de acuerdo al índice de masa corporal (BMI, por sus siglas en inglés): a partir de 30 kg/m² son considerados con obesidad, mientras que en sujetos con sobrepeso el BMI oscila entre 25-29.9 kg/m² (Li et al. 2005). El aumento en la prevalencia de obesidad en México se encuentra entre los más rápidos a nivel mundial. Datos reportados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de 1988 a 2012 indican que el sobrepeso en mujeres mayores de 20 años se incrementó de 25 a 35.3% y la obesidad de 9.5 a 35.2%; mientras que, en hombres, el sobrepeso aumentó un 3.1% y de obesidad incrementó un 38.1% (durante el periodo 2000-2012). Aunque las estadísticas reportadas por la ENSANUT muestran una desaceleración hacia el 2012, el problema persiste, lo que resalta la importancia de implementar nuevas estrategias para reducir estos altos porcentajes de sobrepeso y obesidad en nuestro país.

1.2. Neurobiología de la ingesta de alimento

Qué comer, cuánto y a qué hora hacerlo son decisiones que hacemos constantemente y que están influenciadas por una gran variedad de señales internas y externas (Flier 2007). En el momento que entra comida en el organismo se empiezan a secretar una serie de hormonas que regulan la cantidad de alimento consumido (Adan et al. 2008). Estas hormonas generan señales periféricas que llegan al cerebro (vía el nervio vago o por medio del tercer ventrículo a través del núcleo arcuato del hipotálamo), que ocasiona la terminación del consumo de la comida (Figura 1). La alteración de estas señales periféricas puede desencadenar un incremento en el consumo de alimento (aumentando la cantidad y la frecuencia de las comidas)(Yang et al. 1992). Una de las principales señales periféricas gastrointestinales y pancreáticas son la colecistoquinina (CCK), amilina, insulina y el glucagón, las cuales son secretadas durante el consumo de alimento y su efecto principal es limitar el tamaño de la

comida (Woods et al. 2006; Näslund and Hellström 2007). Otras hormonas que afectan el tamaño de la comida es el péptido YY (PYY₃₋₃₆), péptido similar al glucagón (GLP-1) y oxintomodulina, los cuales son liberados de la células L del intestino (Näslund and Hellström 2007). Los niveles periféricos de estas hormonas proveen información acerca del metabolismo vía el nervio vago el cual activa a el núcleo del tracto solitario (NTS) o en el área postrema (AP) en el cerebro, para controlar el tamaño de la comida (Adan et al. 2008).

El PYY₃₋₃₆, la oxintomodulina, el GLP-1 actúan directamente en el hipotálamo (Schwartz et al. 2000). Los niveles plasmáticos de estas hormonas se elevan después de la terminación de una comida, afectando principalmente el inicio de la siguiente comida, es decir, son señales a corto plazo (Schwartz et al. 2000). Otras hormonas son la leptina y la insulina, las cuales actúan a largo plazo y están relacionadas con la cantidad de tejido adiposo almacenado y actúan en el sistema nervioso central en proporción a los niveles plasmáticos. Específicamente, en el fondo del tercer ventrículo cerebral, dentro del hipotálamo, existe la región del núcleo arcuato (ARC), que es el centro de integración de varias señales periféricas importantes. Estas señales son propagadas posteriormente hacia otras regiones del cerebro. Dichas señales actúan activando o inhibiendo a dos grupos de neuronas unas orexigénicas (las AgrP) y otras anorexigénicas (las POMC). Los niveles circulantes de la leptina no fluctúan en función del consumo de una comida sino por el nivel total de grasa periférica (relacionada al tamaño de los adipocitos). Es decir, cuando los adipocitos son pequeños los niveles de leptina son bajos, lo cual manda una señal orexigénica al hipotálamo (activando a neuronas -AgrP e inhibiendo a las -POMC del núcleo arcuato), lo que desencadena el consumo de alimento. Por el contrario, si los adipocitos crecen entonces se libera más leptina (y se activan a las neuronas -POMC e inhiben a las -AgrP) y los sujetos dejan de comer. De esta manera la leptina regula el peso corporal a largo plazo (Schwartz et al. 2000; Morton et al. 2014).

Por su parte, la ghrelina es la única hormona periférica reportada que incrementa el consumo de alimento. Esta hormona es secretada en el *fundus* del estómago y está asociada con la sensación de hambre y la iniciación de la alimentación, actuado a nivel del nervio vago y directamente en el ARC; ésta hormona activa a las neuronas -AgrP e inhibe a las -POMC (Cummings 2006).

Una comida altamente palatable, frecuentemente sobrepasa las señales de saciedad y promueve el sobreconsumo (Synowski et al. 2005). Por lo tanto, la palatabilidad de los alimentos es un determinante crucial para la decisión de qué comer y cuánto comer, aun cuando nuestro sistema homeostático este satisfecho. Sujetos que son susceptibles a ganar peso corporal debido al consumo excesivo de alimentos palatables, tienen una fuerte atracción hedónica por estos alimentos, lo que conlleva a sobre-consumirlos (Blundell et al. 2005). En roedores también se ha demostrado una interacción entre el sistema homeostático y el hedónico. Por ejemplo, en ratas con obesidad inducida por una dieta alta en grasa y azúcar, se observó que las ratas normopeso que inicialmente presentaban una mayor motivación por consumir azúcar eran las que más fácilmente ganaban peso, lo cual les incrementó aún más la motivación para obtener sacarosa, demostrando que la sacarosa en algunos sujetos susceptibles induce un círculo vicioso aumentando la motivación por la comida con alto valor calórico y también la obesidad, lo que puede explicar por qué el azúcar tiene algunas propiedades adictivas (la Fleur et al. 2007).

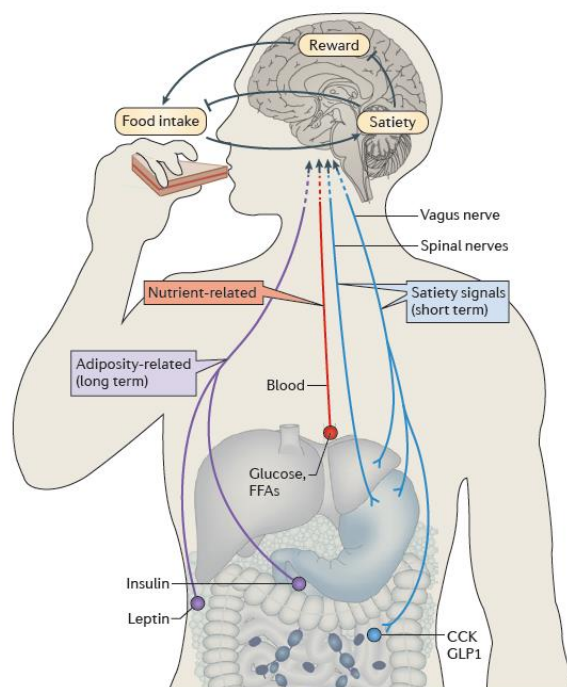


Figura 1. Regulación de la homeostasis energética. El sistema nervioso central integra las señales periféricas de largo plazo (como la leptina y la insulina) y de señales de corto plazo relacionadas a la iniciación de la comida (CCK, GLP-1, amilina, etc.). Estas señales regulan el consumo de alimento y el gasto energético de manera que mantiene estable los niveles de grasa en adipocitos. La privación de alimento genera un incremento en las propiedades recompensantes de los mismos, lo que desencadena un incremento en el consumo de alimento, hasta generar el balance energético idóneo. CCK= colecistoquinina, GLP-1= péptido similar al glucagón, FFAs= Ácidos grasos libres. Tomado de (Morton et al. 2014).

Por lo tanto, la alimentación está fuertemente influenciada por factores ambientales como el estrés y la palatabilidad, los cuales activan a otras áreas del cerebro (la Fleur et al. 2007; Adan et al. 2008). El circuito de la recompensa (i.e., el que procesa la información relacionada al valor hedónico de los alimentos y la motivación de trabajar para obtenerlos) es influenciado por las señales hormonales y metabólicas que indican el estado homeostático y energético del organismo (Figura 2). Este circuito de recompensa incluye a las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas del área ventral tegmental (VTA) que proyectan al núcleo accumbens y otras áreas del cerebro (Morton et al. 2014).

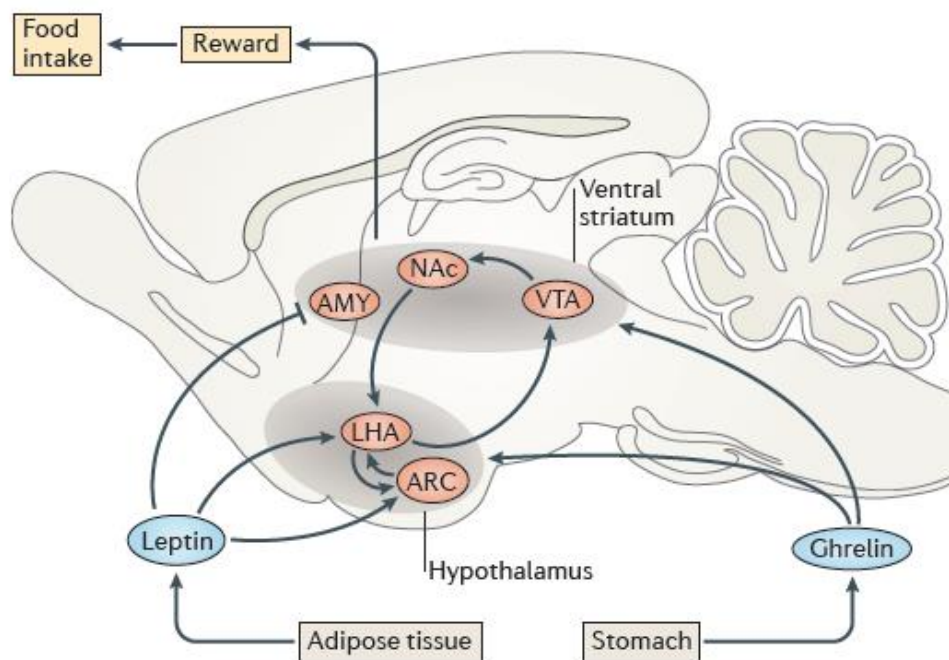


Figura 2. Integración entre el sistema homeostático y el de recompensa. Señales homeostáticas modulan la percepción de la comida (a partir del valor hedónico de la comida y la motivación por obtenerla). Las neuronas dopaminérgicas de área ventral tegmental (VTA) proyectan hacia el núcleo accumbens (NAC) y a otras áreas del cerebro. Las neuronas del hipotálamo lateral (LHA) integran señales del NAC y del núcleo arcuato (ARC). AMY: amígdala. Tomado de (Morton et al. 2014).

1.3. El núcleo accumbens shell como un blanco terapéutico para el control de la obesidad

El núcleo accumbens Shell (NACSh) es una región del cerebro que integra varios aspectos sobre el consumo de alimento: motivacional, hedónico y cognitivo (Adan et al. 2008). Las proyecciones dopaminérgicas del VTA hacia el NACSh, median propiedades motivacionales

de la comida (Kelley et al. 2005). Mientras que las señales no dopaminérgicas dentro del NAc subyacen a las propiedades recompensantes de la comida; por ejemplo, la estimulación de los receptores canabinoides (CB₁) potencializa el valor de recompensa de la comida (Kelley et al. 2005).

Recientemente, nuestro laboratorio demostró que los receptores dopaminérgicos (D1r y D2r) expresados en el NAcSh están involucrados en la pérdida de peso inducida por el DEP ((Kalyanasundar et al. 2015). La infusión intra-NAcSh de antagonistas D1 y D2, atenuaron la pérdida de peso inducida por la administración periférica del DEP (Figura 3). Lo que indica que el NAcSh es un blanco farmacológico de algunos de los supresores del apetito derivados de la anfetamina. Sin embargo, aún no se ha probado si estos receptores también son parte del mecanismo de acción de la PHEN (ver más abajo).

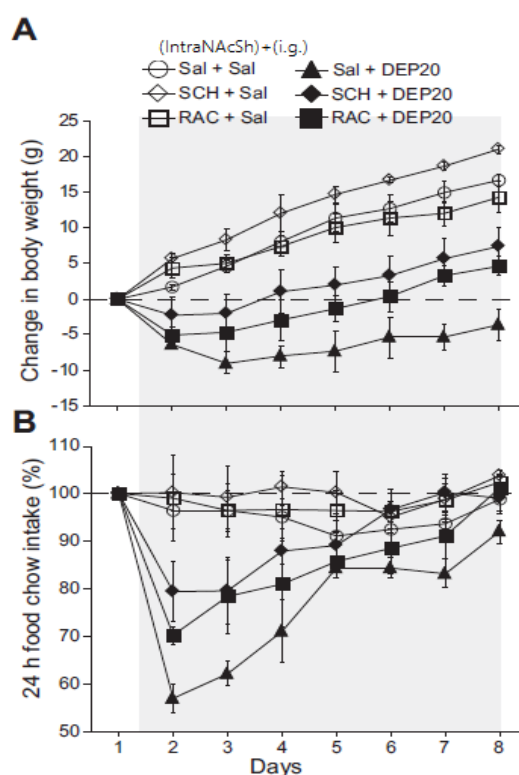


Figura 3. Efecto de una infusión intra-NAcSh de antagonistas dopaminérgicos (D1r y D2r) tras una administración sistémica de DEP. A) Cambio en el peso corporal (g) durante 7 días continuos de tratamiento. Cada grupo recibió dos administraciones: una directamente en el NAcSh (Sal, SCH, RAC) y la otra intragástrica (i.g. Sal o DEP). Las abreviaturas indican al grupo control (Sal), SCH (SCH23390), RAC (Raclopride), DEP20 (dietilpropión a dosis de 20 mg/kg). B) Cambio en el consumo de alimento (% respecto al peso un día antes de

iniciar el tratamiento) del mismo grupo de animales mostrados en A. Modificado de (Kalyanasundar et al. 2015).

1.4. Dopamina y conducta alimentaria

Existen varios estudios que indican una relación entre los niveles de dopamina (DA) y la conducta alimentaria, además de sus funciones motoras. Por ejemplo, ratones knockout incapaces de sintetizar DA (DA $-/-$), específicamente en neuronas dopaminérgicas (por la inactivación del gen de la tirosina hidroxilasa) no pueden comer normalmente y son hipoactivos. Szczypka y colaboradores (1999) y encontraron que dependiendo de la cantidad de DA liberada de las terminales dopaminérgicas, es el patrón de la conducta alimentaria. Por ejemplo, en ratones DA $-/-$, existe un rango óptimo de DA para generar un consumo de alimento similar a los ratones silvestres (Figura 4). Es decir, cuando los niveles de DA son muy bajos los animales no pueden moverse y tampoco comen, mientras que cuando los niveles de DA son muy altos se induce estereotipia (y se reduce la locomoción) lo que también evita que los animales coman.

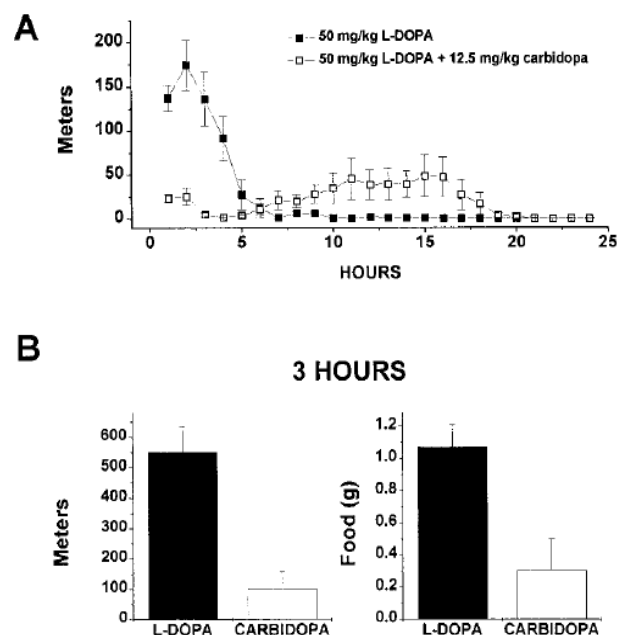


Figura 4. Efecto en la locomoción y alimentación tras una administración de la L-DOPA i.p. (precursor de la DA) sola o en combinación con carbidopa (CB, inhibidor de la descarboxilasa periférica) en ratones DA $-/-$. A) Actividad de locomoción de ratones DA $-/-$ (n=8), tratados con L-DOPA (50 mg/kg) o en combinación con carbidopa (12.5 mg/kg), siendo este último administrado una hora antes a la L-DOPA. B) Distancia total recorrida (metros; m) y la cantidad de comida consumida por los ratones durante las primeras 3 horas después de la inyección de L-DOPA sola (50 mg/kg), o en combinación con la carbidopa (50 mg/kg) la

cual aumenta aún más el nivel de DA. Se observa que, tras una administración con L-DOPA, existe un incremento de la locomoción durante las primeras 3 horas, mientras que con la ayuda de carbidopa (que induce un mayor incremento de L-DOPA en el cerebro y por ende mayor DA se disminuye la locomoción (porque se induce estereotipia dato no mostrado) y el consumo de alimento también se disminuye. Lo que indica que altos niveles de DA en ratones DA $-/-$, genera un aumento de estereotipia y una disminución en la locomoción y en la alimentación. Tomado de (Szczyпка et al. 1999).

1.5. Papel de la DA en la locomoción y el ciclo sueño-vigilia.

El ciclo de sueño-vigilia está orquestado por procesos circadianos, homeostáticos y también motivaciones (Eban-Rothschild and de Lecea 2017). Los ciclos circadianos sincronizan los periodos de sueño a una hora apropiada del día (durante la noche en animales diurnos y durante el día en animales nocturnos). Además, las circunstancias ambientales y necesidades internas (por ejemplo, bajos niveles de glucosa o hambre), afectan fuertemente el estado de sueño-vigilia (Borbély, Alexander A 1977; Rattenborg et al. 2016). Diversos estudios indican que el sistema dopaminérgico está implicado en el estado de vigilia (Oishi and Lazarus 2017; Eban-Rothschild and de Lecea 2017). Se ha demostrado que la vigilia inducida por la activación de las neuronas dopaminérgicas en el VTA, es bloqueada por la administración de antagonistas a receptores de DA (D2/D3), receptores que también están expresados en el NAcSh (Oishi and Lazarus 2017). Además, la estimulación optogenética de las terminales dopaminérgicas del VTA hacia el NAcSh, pero no en otras áreas del cerebro (i.e., corteza prefrontal, estriado dorsal-lateral) incrementa el estado de vigilia, por lo tanto el efecto de vigilia generado por la activación optogenética de las neuronas dopaminérgicas del VTA puede estar mediado por el NAcSh (Eban-Rothschild et al. 2016). Por ejemplo, estudios de microdiálisis indican que durante el periodo de luz (cuando las ratas típicamente están dormidas) los niveles de DA están disminuidos, tanto en el estriado como en la corteza prefrontal (Smith et al. 1992; Feenstra et al. 2000). Aunado a esto, estudios de microdiálisis *in vivo* indican un incremento de DA en el NAc durante periodos REM (movimientos oculares rápidos, por sus siglas en inglés) así como durante la vigilia en comparación a la fase de Slow Wave Sleep (sueño de ondas lentas) (Léna et al. 2005).

Estos incrementos de DA durante periodos REM pueden indicar que la DA genera un estado similar al de la vigilia independientemente de sus efectos en el movimiento (Lazarus et al. 2012). Stuart et al, (2003) demostraron que una infusión intra-cerebro-ventricular de

agonistas dopaminérgicos de los receptores D1 y D2 promueve el estado de vigilia y simultáneamente suprime el estado de sueño (durante la fase de luz). Además, ambos agonistas inducen un estado activo del animal, similar a lo reportado en ratas normales (Figura 5). Estos datos sugieren que los receptores D1 y D2 son necesarios para inducir y estabilizar el periodo de vigilia en condiciones normales.

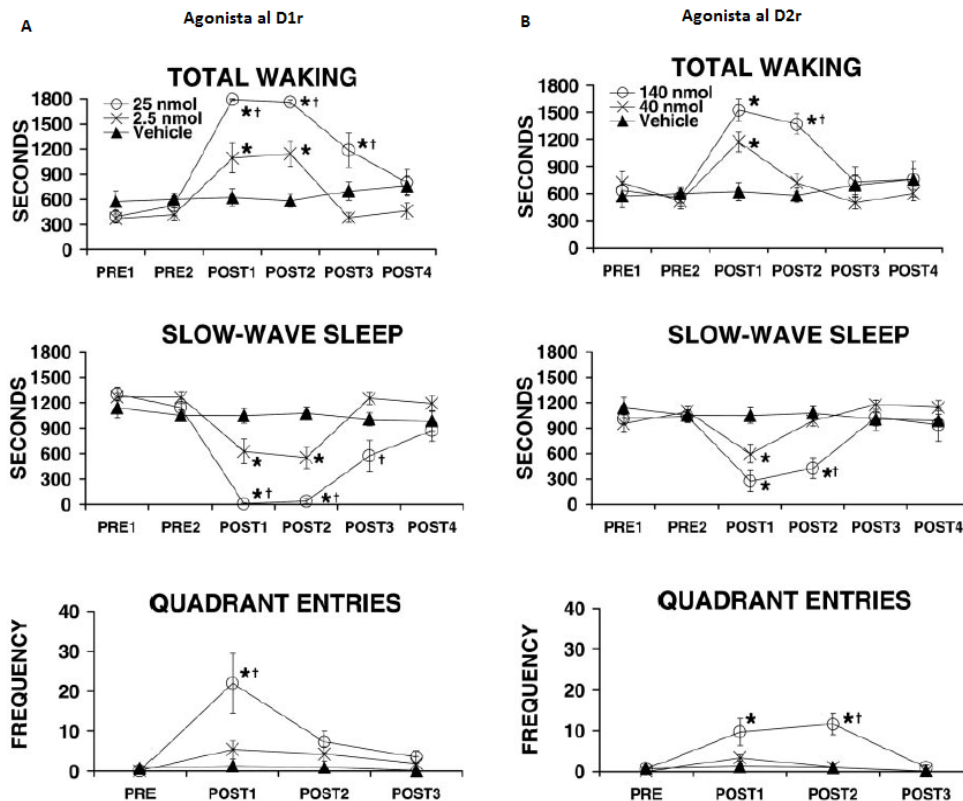


Figura 5. Efecto de la activación de D1r y D2r en la conducta de sueño-vigilia y la locomoción. A) Se muestra el efecto de la infusión intracráneo-ventricular de vehículo o de SKF-82958 (agonista a D1r) a dosis de 2.5 y 25 nmol, sobre el tiempo total de permanencia en estado despierto (total waking) y durante el periodo de sueño (SWS). PRE1 y PRE2 indican dos periodos antes de la infusión; POST1, POST2 y POST3 indican los periodos después de la infusión del agonista. Además, se analizó la conducta de locomoción (medida como entradas a los cuadrantes: quadrant entries). Los símbolos representan la media + SEM cada 30 minutos de periodo. B) Se muestra las mismas variables que en el apartado A, pero con la infusión del vehículo y de quinpirole (agonista a D2r) a dosis de 40 y 140 nmol. * $p < 0.05$ con respecto al vehículo, † $p < 0.05$ con respecto a 2.5 nmol de SKF o 140 nm de quinpirole. Modificado de (Stuart and Berridge 2003).

1.6. Anatomía del núcleo accumbens

El estriado es un punto de convergencia de entradas glutamatérgicas provenientes

principalmente de la corteza y el tálamo, así como de aferentes dopaminérgicas mesolímbicas del VTA (Kincaid et al. 1998; Bolam et al. 2000), las cuales están relacionadas tanto a la sensación de recompensa, incluyendo a producida por la alimentación (Prado et. al. 2016). Una disfunción de esta región está implicada a desórdenes neurológicos como el Parkinson, Huntington, distonías musculares y desordenes obsesivos-compulsivos y adicciones (Graybiel 2008; Breakefield et al. 2008).

El estriado es una región muy vasta del cerebro que está subdividida en la parte dorsal y ventral. En su región ventral, contiene al núcleo accumbens (NAc), el cual a su vez se subdivide en la parte “Core” y “Shell”. En esta tesis sólo nos enfocaremos en la región shell (NAcSh), debido a que está más relacionada a la alimentación, ya que sus neuronas son las únicas del estriado que proyectan hacia el hipotálamo lateral (Jennings et al. 2015; O’Connor et al. 2015). Las neuronas estriatales pueden ser clasificadas a nivel anatómico, histoquímico y fisiológico. A nivel anatómico se clasifican como las neuronas espinosas medianas (MSN) y las interneuronas no espinosas (Kreitzer 2009)(Figura 6) Las MSN representan más del 95% de la población total, son neuronas GABAérgicas y pueden ser clasificadas en base a sus proyecciones hacia la sustancia nigra, parte reticulada (vía directa) o hacia el globo pálido (vía indirecta). Las proyecciones estriato-nigrales expresan a los receptores D1 (MSND1+), muscarínicos M4, así como a la sustancia P, de adenosina A₁ (Gerfen 1992; Ince et al. 1997). En contraste, las proyecciones estriato-palidales se caracterizan por su alta expresión de los receptores D2 (MSND2+) y de adenosina A_{2A}, así como inmunoreactividad para la encefalina (Schiffmann et al. 1991; Gerfen 1992). En particular en el NAcSh las neuronas MSND1+ son las únicas que proyectan al hipotálamo lateral (O’Connor et al. 2015). Mientras que las MSND2+ proyectan principalmente al núcleo pálido ventral.

Las interneuronas GABAérgicas conforman alrededor del 2% de la población, se clasifican en tres tipos neuroquímicamente: 1) aquellas que expresan a la somatostatina, neuropéptido Y (NPY), sintasa de óxido nítrico y NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato); 2) aquellas que expresan las proteínas de unión a calcio parvo-albúmina y 3) las proteínas de unión a calcio calretinina (Tepper and Bolam 2004).

Las interneuronas que expresan a la somatostatina, NPY, sintasa de óxido nítrico y NADPH se caracterizan electrofisiológicamente como interneuronas de disparo de bajo umbral (LTS, por sus siglas en inglés) y comprenden ~0.8% de la población (Kawaguchi 1993).

Las interneuronas que expresan a la parvo-albúmina se caracterizan por sus propiedades electrofisiológicas, llamándose también interneuronas de disparo rápido (FSI por sus siglas en inglés) (Kawaguchi 1993). El diámetro del soma de este tipo neuronal es alrededor de 16-18 μm .

El tercer tipo de interneuronas son las que expresan a la calretinina, las cuales son de tamaño mediano, no espinosas. Existe poca evidencia acerca de su electrofisiología, pero al igual que las FSI, estas generan una poderosa inhibición sobre las MSNs (Tepper and Bolam 2004).

Otro tipo de interneuronas presentes en el estriado son las colinérgicas, las cuales se caracterizan por tener un diámetro de soma de aproximadamente 40 μm . Comprenden cerca del 0.3% de la población (Rymar et al. 2004). Electrofisiológicamente se caracterizan por disparar de manera lenta y regular, con potenciales de acción de larga duración y periodos largos de repolarización (Wilson et al. 1990).

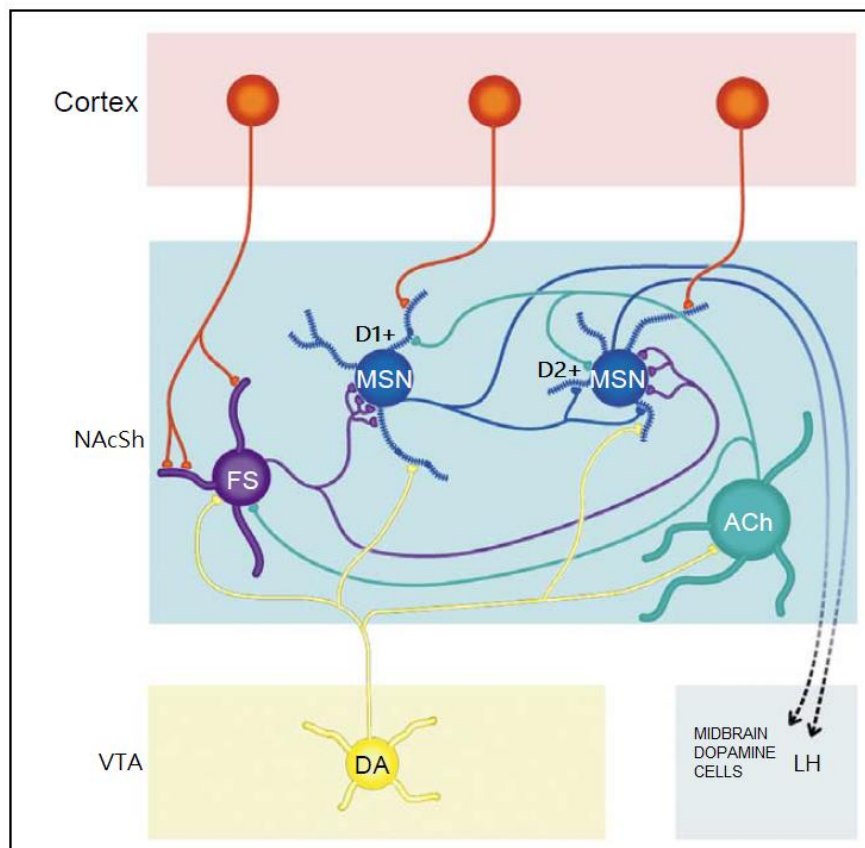


Figura 6. Tipos de neuronas en el estriado y sus principales proyecciones. El microcircuito en el NAcSh comprende a dos tipos de neuronas espinosas medianas (MSN): las MSND1+ y las MSND2+, además de interneuronas GABAérgicas de disparo rápido (FS) y las interneuronas colinérgicas (ACh). Además, se marcan

las aferentes dopaminérgicas y glutamatérgicas de SNc y corteza hacia estriado. Las FS y las ACh están involucradas en el control de disparo de las MSN. VTA: Área ventral tegmental, LH: hipotálamo lateral, DA: Dopamina. Tomado de (Bolam JP et al. 2005)

1.7. Mecanismos de acción de los fármacos supresores del apetito que actúan a nivel del sistema nervioso central

La comunicación entre las neuronas dentro del sistema nervioso central (SNC) se realiza en una región altamente especializada a nivel morfológico y funcional: la sinapsis. Las sinapsis son conexiones entre los botones de los extremos terminales del axón de una neurona (pre-sináptica) y la membrana de otra neurona (pos-sináptica). Cuando un potencial de acción se trasmite a lo largo del axón, los botones que están en su extremo terminal liberan un neurotransmisor, una sustancia química que produce despolarizaciones o hiperpolarizaciones de la membrana pos-sináptica. Estos potenciales pos-sinápticos finalizan principalmente por dos mecanismos: 1) Por inactivación enzimática, e.g., la acetilcolina es inactivada por la enzima acetilcolinesterasa. 2) Por la recaptura de los neurotransmisores del espacio sináptico a través de transportadores, que se sitúan en la membrana presináptica (Arias et al. 2009). Este tipo de captación es común para los neurotransmisores de DA, NE y 5-HT.

Los fármacos análogos de las anfetaminas inducen su efecto debido a la inhibición de la recaptura de la DA, pero su efecto más importante es mediado a través de la liberación de DA desde las terminales sinápticas (Figura 7). Lo que hace la anfetamina es unirse al transportador de la DA llamado DAT (de sus siglas en inglés, Dopamine transporter). La anfetamina entra al citoplasma de la neurona presináptica y provoca la liberación de DA de las vesículas y provoca su liberación al espacio sináptico invirtiendo la dirección del flujo del transportador (Figura 7B). Esto da como resultado un incremento de DA en el espacio extracelular (Figura 7C) aún mayor, en comparación a si sólo se bloqueara el transportador (Rothman et al. 2006).

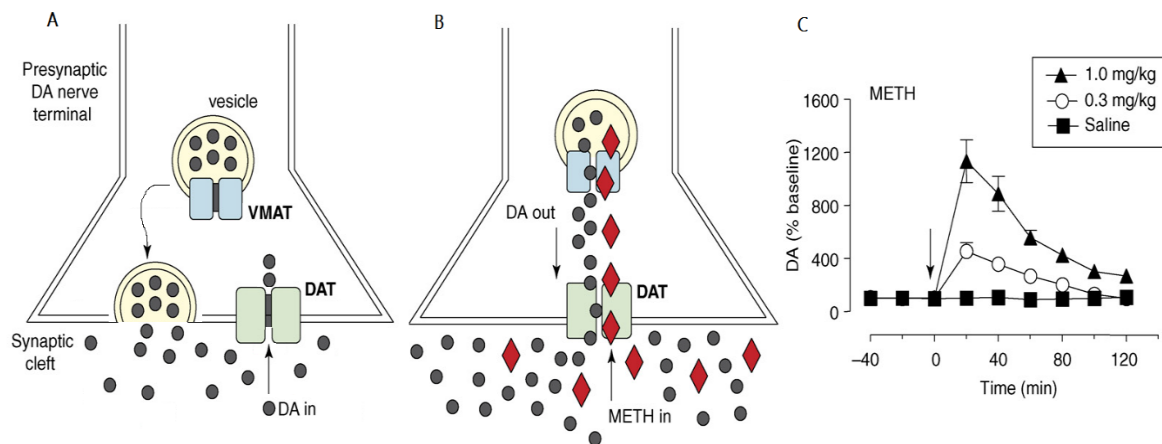


Figura 7. La liberación de la DA mediado por las anfetaminas. A) Esquema de una neurona dopaminérgica y el funcionamiento normal durante la liberación de DA (círculos grises). Tras una serie de señalizaciones previas, la vesícula se fusiona a la membrana y libera la DA al espacio sináptico; mientras que el transportador a DA (DAT) permite su recaptura. B) La metanfetamina (METH, forma de diamante) se une al DAT e ingresa al citoplasma de la terminal nerviosa, generando un incremento de la liberación de DA mediante la reversión del flujo del DAT. C) El incremento de DA a nivel extracelular utilizando diferentes dosis de la METH (este incremento de DA no es dependiente de la exocitosis vesicular) y no genera un feedback negativo. VMAT (transportador de monoaminas vesiculares). Tomado y editado de (Rothman et al. 2006).

1.7.1. Fármacos que liberan dopamina y norepinefrina

Aunque la dieta y el ejercicio es la mejor opción para prevenir y combatir el sobrepeso y la obesidad, ambas actividades pueden ser complementadas con fármacos supresores del apetito (Wilbert et al. 2011). Los supresores del apetito como el DEP y la PHEN (fármacos análogos a las anfetaminas) (Figura 8) se han utilizado ampliamente en pacientes que tienen un índice de masa corporal a partir de 30 kg/m² o en pacientes que son propensos a desarrollar otras enfermedades (diabetes mellitus, hipertensión, enfermedades cardiovasculares) (Hampp et al. 2013; Yanovski and Yanovski 2014). En la actualidad existen en el mercado varios fármacos supresores del apetito, que actúan a nivel periférico como el Orlistat (aunque con menor eficacia terapéutica) y otros que actúan a nivel central. En la Figura 8 se muestran sus estructuras químicas.

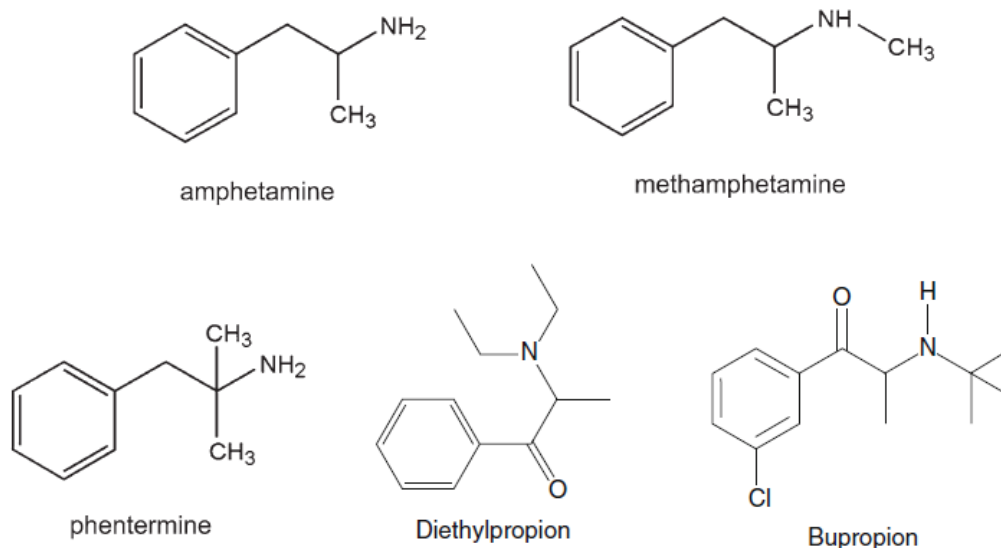


Figura 8. Estructuras químicas de los fármacos análogos a las anfetaminas, todos considerados supresores del apetito.

1.7.1.1. Fentermina

La PHEN es un supresor del apetito que tiene como principal mecanismo de acción, el incremento de la DA y la NE en el cerebro (Balcioglu and Wurtman 1998). Fue aprobado por la FDA desde 1959 como supresor del apetito, se permite su uso a corto plazo (<12 semanas) ya que desarrolla tolerancia, aunque frecuentemente se ha prescrito por periodos más largos de hasta un año (Yanovski and Yanovski 2014). Estudios de meta análisis indican que la PHEN es el fármaco de primera elección para el tratamiento de la obesidad, tan solo en Estados Unidos en el año 2011 se prescribió este medicamento a 2.43 millones de pacientes (Figura 9) (Hendricks et al. 2009; Hampp et al. 2013). La dosis prescrita en pacientes con obesidad oscila entre los 15 mg/d a 37.5 mg/d (Hendricks et al. 2009). Como efectos adversos se ha reportado principalmente insomnio, boca seca, dolores de cabeza, incremento de frecuencia cardiaca y ansiedad (Yanovski and Yanovski 2014).

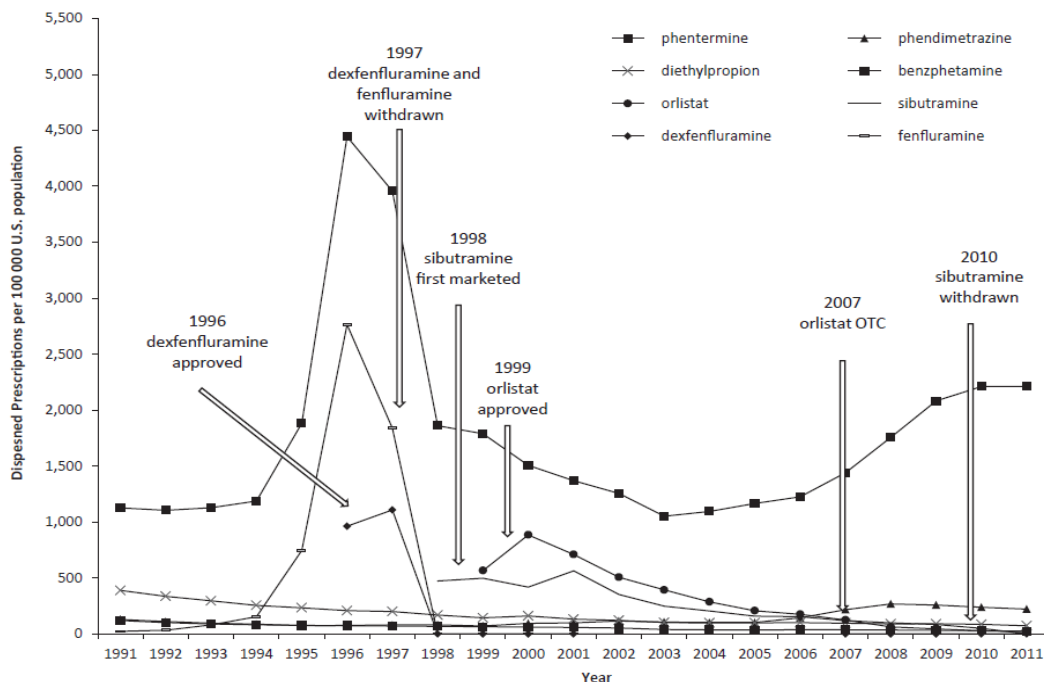


Figura 9. Prescripciones de fármacos supresores del apetito en Estados Unidos (1991-2011).
Tomado de Hampp et al, 2013.

1.7.1.2. Dietilpropión

El dietilpropión, o también llamado amfepramona, es un fármaco supresor del apetito, con efectos psicoestimulantes (Galvan-Arzate and Santamaria 2002), prescrito comúnmente en sujetos con obesidad a una dosis de 75 mg/d (Hendricks et al. 2009). Su mecanismo de acción es parecido a las anfetaminas, estimula la liberación e inhibe la recaptura de DA y NE (Balcioglu and Wurtman 1998). Se ha estudiado muy poco y aún se desconoce su farmacocinética en roedores. Tanto la PHEN como el DEP inducen un incremento de la locomoción y estereotipia (Garcia-Mijares et al. 2009; Kalyanasundar et al. 2015), pero el efecto anorexigénico producido por estos análogos a las anfetaminas está mediado por su habilidad de liberación de la DA y/o NE de las terminales nerviosas así como al inhibir la recaptura de ellos (Balcioglu and Wurtman 1998; Kalyanasundar et al. 2015), mientras que sus propiedades psicomotoras están mediadas por la DA (Filip and Cunningham 2002; Neumaier et al. 2002; Garcia-Mijares et al. 2009).

Datos publicados por (Kalyanasundar et al. 2015)) demostraron que la administración sistémica de PHEN o DEP durante 7 días a una dosis de 20 mg/kg en ratas indujo una pérdida de peso (-0.6 ± 2.4 g y -11.6 ± 2.3 g, respectivamente) y disminución de la ingesta de alimento (-18.7 ± 3.3 y $-26.6 \pm 5.5\%$, respectivamente), también incrementó la locomoción y la estereotipia (movimiento de cabeza en forma de vaivén), siendo más potente el DEP en comparación con la PHEN (Figura 10).

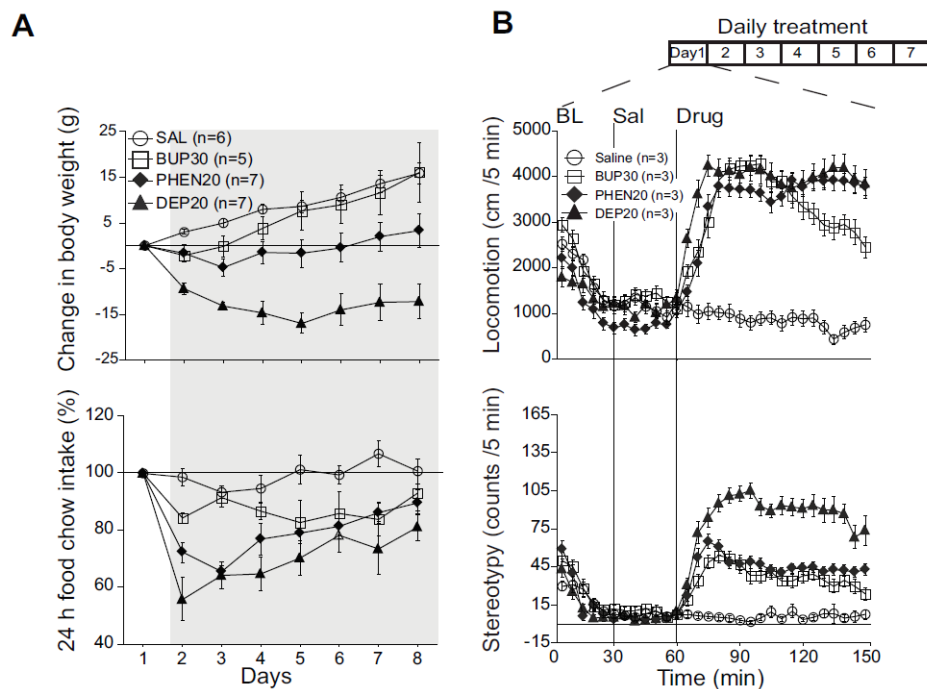


Figura 10. Efecto de fármacos supresores del apetito en ratas durante un tratamiento sistémico de 7 días. En la parte superior del panel A, se muestra la gráfica de pérdida de peso bajo el efecto del dietilpropión (DEP), fentermina (PHEN), bupropión (BUP) y el grupo control (SAL), así como el consumo de alimento de los mismos animales (panel inferior). En el panel B, se observa la locomoción (panel superior) y estereotipia (panel inferior) inducido por estos fármacos en un campo abierto durante 150 min de registro. Tomado de Kalyanasundar et al. 2015.

1.8. Síndrome de alimentación nocturna

Los fármacos análogos de las amfetaminas tienen como ventaja una reducción significativa en el peso corporal, así como una inhibición del apetito (Baumann et al. 2011; Kalyanasundar et al. 2015). De hecho, estudios en humanos reportan que durante 6 meses continuos de tratamiento produce en promedio una pérdida de peso mayor al 10%. Algunos de los efectos

secundarios es boca seca pero principalmente insomnio, además de que generan tolerancia a corto plazo (Soto-Molina et al. 2015). Con respecto al insomnio, en pacientes con obesidad, se ha relacionado con el desarrollo del síndrome de alimentación nocturna (NES, por sus siglas en inglés) (Colles et al. 2007) (Figura 11). Este síndrome va acompañado de anorexia por las mañanas, hiperfagia durante la noche (consumo de alimento del 50% o más después de las 7:00 pm) e insomnio (Adami et al. 2002) (Birketvedt et al. 1999); pero recientemente se ha observado un incremento en el consumo de snacks durante las noches, en el cual los pacientes se despiertan y comen (Colles et al. 2007).

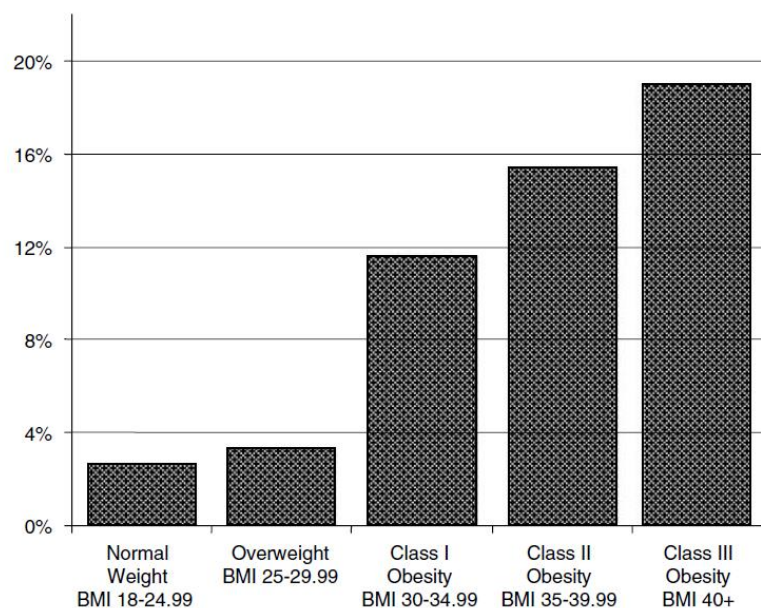


Figura 11. Distribución de pacientes con NES de acuerdo a su índice de masa corporal (BMI). La prevalencia del NES incrementa conforme el BMI de manera significativa ($p < 0.001$). Tomado de (Colles et al. 2007).

Debido a sus efectos psicomotores, algunos medicamentos que se prescriben para tratar la obesidad (como los análogos a las anfetaminas) tienen como efectos secundarios el desarrollo de insomnio, por lo tanto resulta de la mayor relevancia caracterizar su efecto farmacológico con respecto a sus efectos psicoestimulantes evocados durante distintas fases del día, con la finalidad de poder prescribirlo en el horario más adecuado que potencialice los efectos terapéuticos, pero que a la vez disminuya sus efectos secundarios.

1.9. 5-hidroxitriptófano

El 5-hidroxitriptófano (5-HTP) es un aminoácido natural producido por el organismo a partir del aminoácido esencial L-triptófano. Como suplemento alimenticio es obtenido a partir de la planta *G. simplicifolia* utilizado en el tratamiento de la depresión, insomnio y la sobrepeso/obesidad (Chaouloff Francis 1992; Turner et al. 2006), siendo la dosis prescrita para pacientes con obesidad menor a 400 mg/d (Hendricks et al. 2009). El 5-HTP es el precursor inmediato de la 5-HT) y cuando es administrado en humanos o animales es metabolizado rápidamente por una enzima llamada L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) o como 5-hidroxitriptófano descarboxilasa, que cataliza la conversión de 5-HTP a 5-HT (Boadle-Biber 1993). La AADC actúa tanto a nivel periférico como en el sistema nervioso central, al ingerir el 5-HTP, la enzima lo convierte a 5-HT a nivel periférico. Debido a que la 5-HT no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE), altos niveles de 5-HT se almacenan en el organismo, generando que una menor cantidad de 5-HTP pase al cerebro (ya que el 5-HTP si atraviesa la BHE) y altos niveles de 5-HT en el sistema periférico desencadena el síndrome de serotonina (Woolf et al. 1977; Nisijima et al. 2001). A dosis de 100 mg/kg en roedores, este síndrome genera hipolocomoción, temblores, fiebre alta, así como daño en los riñones (Hirai and Nakajima 1979; Nisijima et al. 2001). En humanos el síndrome se caracteriza por hipertensión, fiebre alta, desorientación y mioclonías (Turner et al. 2006)

Estudios farmacocinéticos en humanos demuestran que el 5-HTP tiene una biodisponibilidad de un 70% y el tiempo de vida media en plasma es 4.3 horas (Turner et al. 2006), alcanzando un pico de concentración máximo entre 1-2 horas (Herman G.M. Westenberg et al. 1982). Este efecto se debe en gran medida a la acción de la AADC, que se localiza en las glándulas adrenales, hígado, riñones, páncreas y pulmones.

Para evitar que el 5-HTP sea metabolizado en el sistema periférico, existen fármacos que inhiben la acción de la enzima AADC, como por ejemplo la carbidopa (CB) (Turner et al. 2006). La carbidopa no puede cruzar la BHE, lo que permite que el 5-HTP administrado periféricamente no sea metabolizado por la AADC periférica, y este pueda pasar intacto la BHE y haya una mayor disponibilidad del 5-HTP en el cerebro y se convierta en 5-HT,

incrementando el 5-HT en el mismo (Gijssman et al. 2002; Turner et al. 2006). En humanos, la coadministración de la levodopa (50 mg) más 5-HTP (100 mg/kg) incrementa los niveles plasmáticos de 5-HTP 15.4 veces y dos veces más el tiempo de vida media (Gijssman et al. 2002). En roedores, Amer y colaboradores (2004) observaron una disminución en la ingesta de alimento de manera dosis-dependiente durante las primeras 4 horas posteriores a la administración del 5-HTP, además de un incremento del 5-HTP en el cerebro después de una administración sistémica (Figura 12).

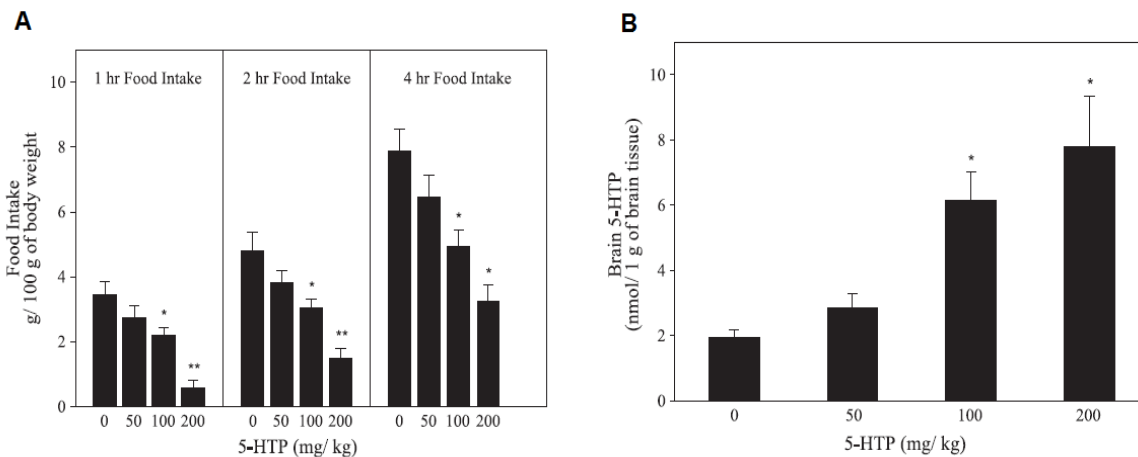


Figura 12. Efecto de la administración del 5-HTP en el consumo de alimento en ratas privadas de alimento durante 24 horas. A) Se grafica el consumo acumulado durante 1, 2 y 4 horas posteriores de la administración i.p. del 5-HTP a diferentes dosis. B) Niveles de 5-HTP en cerebro después de 1 hora de inyección del 5-HTP vía i.p. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ comparado con el grupo control. Tomado y editado de Amer et al. 2004.

1.10. La serotonina y su implicación en la conducta alimentaria

La 5-HT endógena desempeña un papel importante en la sensación de la saciedad y en los procesos pos-prandiales de saciedad, además de los procesos sensoriales, motores y de comportamiento. Los niveles altos de 5-HT estimulan el hipotálamo, principalmente en el núcleo arcuato y por la activación de las neuronas que expresan a los neuropéptidos anorexigénicos POMC y la supresión de las neuronas que expresan a los neuropéptidos orexigénicos como el AgRP (Turner et al. 2006). De este modo, se activan las señales de saciedad y se inhiben las del apetito del hipotálamo, con lo cual disminuyen la ingesta de alimento (Turner et al. 2006).

Estudios farmacológicos indican que la 5-HT inhibe la ingesta de alimento. Los fármacos que activan directa o indirectamente a los receptores de la 5-HT pos-sinápticos disminuyen el consumo de alimento. Estos efectos probablemente se deba a la sensación de saciedad que induce la 5-HT (Simansky 1995).

Numerosos estudios han demostrado el efecto farmacológico de varios fármacos que modulan la disponibilidad de la 5-HT en el cerebro. De hecho, se han identificado varios subtipos de receptores de la 5-HT, de los cuales nos enfocaremos solamente en los tipos 5-HT_{2C} y 5-HT_{1B} que se han reconocido como mediadores de la saciedad inducida por la 5-HT. Por ejemplo, la expresión de los receptores pos-sinápticos 5-HT_{1B} están involucrados en la regularización del tamaño de la comida, mientras que los receptores 5-HT_{2C} están implicados en la frecuencia de la conducta de ingesta (Barry and Fornal Casimir 1993).

La expresión de los receptores 5-HT_{2C} -tanto en roedores como en humanos- ocurre principalmente en el plexo coroideo, mientras que, en menor proporción en el hipocampo, corteza, amígdala, sustancia nigra, estriado ventral y dorsal (Lucas and Spampinato 2000). Los receptores 5-HT_{1B}, actúan como autoreceptores y se localizan en las neuronas serotoninérgicas, GABAérgicas, dopaminérgicas (Leysen 2004). De hecho, el NAcSh posee altos niveles de innervación serotoninérgica proveniente del núcleo del rafe y una gran expresión de receptores especialmente del tipo 5-HT_{2C} (Levitt and Moore 1978; Vertes and Martin 1988).

1.11. Interacción DA/5-HT en la conducta locomotora e ingesta de alimento

Evidencias anatómicas, conductuales y bioquímicas indican una interacción entre la 5-HT y la DA dentro del sistema mesolímbico (Di Matteo et al. 1998; Deurwaerdère et al. 2004). Esta modulación de la DA y la 5-HT es demasiado compleja debido a la existencia de al menos 14 tipos de receptores serotoninérgicos presentes en el SNC (Hoyer et al. 2002). Tanto el NAc como el VTA reciben innervaciones serotoninérgicas del núcleo de rafe (Levitt and Moore 1978; Vertes and Martin 1988).

(Yoshimoto and McBride 1992) demostró que la estimulación e inhibición de las neuronas del núcleo del Rafe, generaban un incremento -o disminución- en la liberación de la DA en

el NAc. Además, esta liberación de DA en el NAc inducida por la 5-HT se debe a la expresión de los receptores 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₃ en esta región (Chen et al. 1991; Yan and Yan 2001). Yan and Yan (2001), en roedores y mediante la técnica de microdiálisis, demostró que la administración directamente en el NAcSh, de un agonista a receptores 5HT_{1B} (CP 93129) induce un incremento de DA extracelular de manera dosis-dependiente (Figura 13).

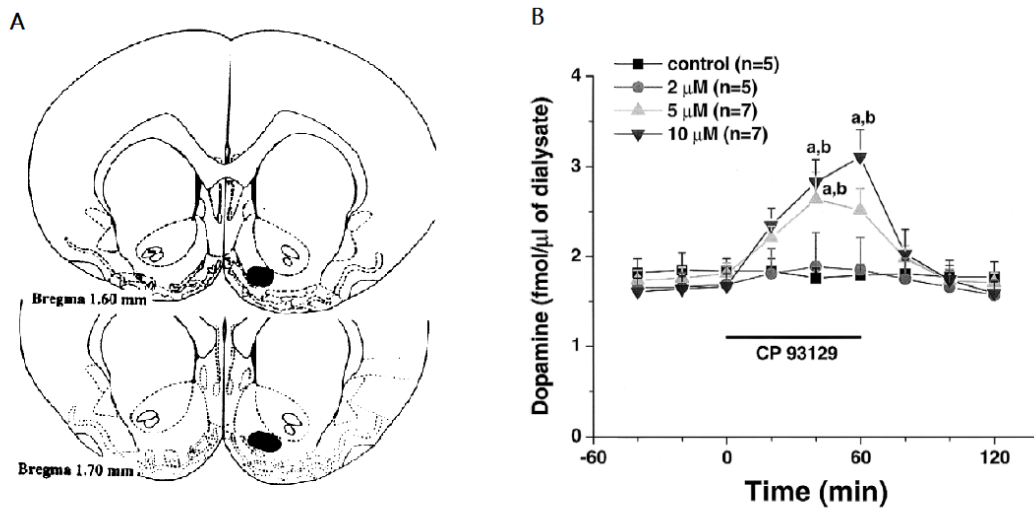


Figura 13. Un agonista selectivo a receptores 5-HT_{1B} incrementa la liberación de DA en el NAcSh. A) Representación de un corte coronal de la rata sobre la colocación de las cánulas para microdiálisis en el NAcSh. B) Efecto de una infusión local del CP 93129 (agonista selectivo para el receptor 5-HT_{1B}) sobre la liberación de DA en el NAcSh. El CP93129 (2,5 y 10 μM) fue administrado en el NAcSh durante el periodo indicado en una línea horizontal en la figura. ^a*p*<0.05 comparado con el grupo control; ^b*p*<0.05 comparado con el grupo de 2 μM. Tomado y editado de (Yan and Yan 2001).

(Bankson and Cunningham 2002), reportaron que la administración sistémica de un antagonista a los receptores 5HT_{2B/2C} (SB 206553) incrementa la locomoción inducida por la amfetamina (Figura 14). Cuando combinaron la amfetamina (fármaco que induce la liberación de DA) y fenfluramina (fármaco que induce la liberación de 5-HT) más el SB 20655399 se potencializó la locomoción y la conducta de pararse en sus dos patas traseras “rearing en inglés”. Estos resultados sugieren que la activación de los receptores 5HT_{2B/2C} ejerce una inhibición en la locomoción inducida por la amfetamina y sobre su combinación con fenfluramina. Estos datos también remarcan la fuerte interacción que existe entre el sistema dopaminérgico y el serotoninérgico en el NAcSh.

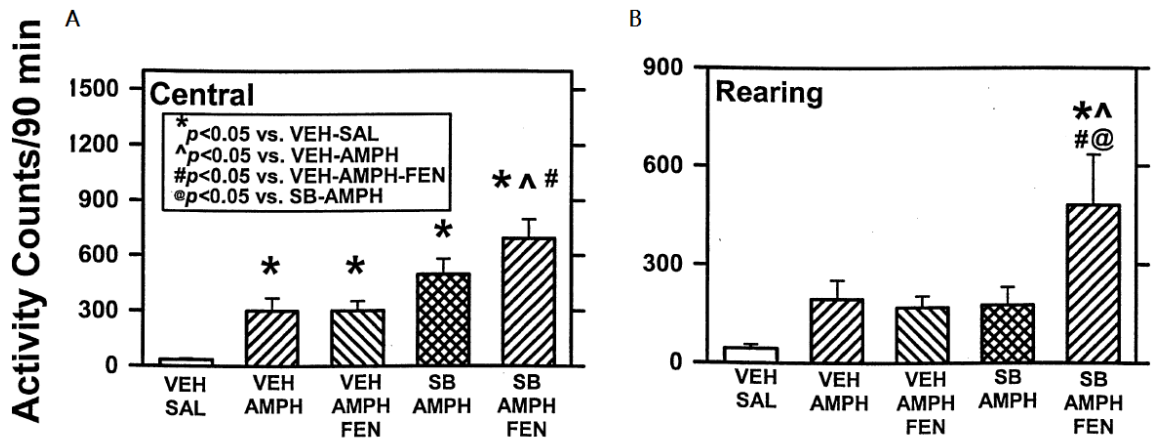


Figura 14. El antagonista de receptores 5HT_{2B/2C} (SB 206553) potencia la locomoción inducida por la anfetamina y la fenfluramina. A) Gráfica de barras (media \pm SEM) de la actividad locomotora 5 minutos después de las inyecciones de los fármacos (SAL, AMPH o AMPH-FEN) y durante 90 min posteriores. Se utilizó una n=8 por cada grupo, utilizando SB 206553 (SB; 2 mg/kg i.p.) o vehículo (VEH; 1 mL/kg i.p.) y 30 minutos después la inyección de anfetamina (AMPH; 0.5 mg/kg s.c.) en combinación con fenfluramina (FEN; 4 mg/kg s.c.) o con salina (SAL; 1 mL/kg s.c.). * Indica diferencia significativa con respecto al grupo VEH-SAL. ^ Indica diferencia significativa con respecto al grupo VEH-AMPH ($P<0.05$). # Indica diferencia significativa con respecto a VEH-AMPH-FEN ($p<0.05$). @ Indica la diferencia significativa con respecto al grupo SB-AMPH ($P<0.05$). B) Gráfica de barras (media \pm SEM) de la estereotipia (“rearing”) durante el mismo periodo de tiempo mostrado en A. Tomado y editado de (Bankson and Cunningham 2002).

Se han utilizado combinaciones de fármacos que generan una liberación dual de 5-HT y DA, lo que ayudaría en varios sentidos: por un lado el componente dopaminérgico induce una reducción en la alimentación, aunque provoca un incremento en la actividad locomotora (Kalyanasundar et al. 2015); y por otro lado el componente serotoninérgico induciría saciedad y generaría una reducción de la ingesta de alimento (probablemente mediado por los receptores 5-HT_{2C}) y ayudaría a disminuir los efectos motores inducidos por los fármacos psicoestimulantes (e.g., la anfetamina y sus derivados). En este sentido, (Baumann et al. 2011), demostró que la utilización de 5-HTP combinado con anfetamina, provocaba un incremento de ambos neurotransmisores en el NAc. Para evitar que el 5-HTP se degradara periféricamente, utilizaron un inhibidor de la descarboxilasa periférica antes de la administración de 5-HTP (Benserazida, equivalente a la carbidopa), facilitando sólo la síntesis de 5-HT a nivel de SNC.

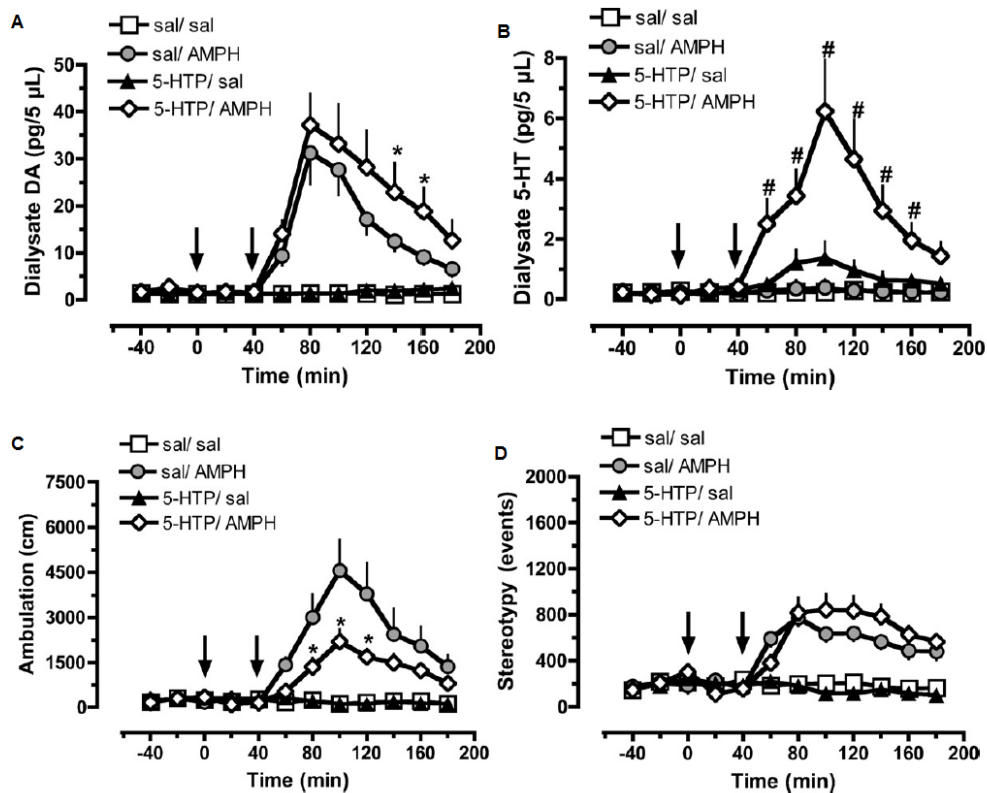


Figura 15. Efecto de la administración periférica de la anfetamina (AMPH) sola o en combinación con 5-HTP. A) Concentración de DA extracelular en el NAc. B) La concentración de 5-HT extracelular en NAc. C), D) Efecto de la combinación en la locomoción y estereotipia. Las ratas recibieron una inyección de 5-HTP (30 mg/kg i.p.) o salina al tiempo cero, seguido por una inyección de la anfetamina (1 mg/kg i.p.) o salina 40 minutos después (ambos indicados con una flecha en la gráfica). Todas las ratas que tuvieron tratamiento con 5-HTP recibieron una inyección adicional de benserazida (30 mg/kg i.p.) 30 minutos antes. Los datos son representados como la media \pm SEM (n= 7 ratas). * $p < 0.05$ con respecto a salina/AMPH, # $p < 0.05$ con respecto a 5-HTP/sal. Tomado de (Baumann et al. 2011)

Tal como se observa en la Figura 15, la combinación de 5-HTP más anfetamina incrementó sinérgicamente los niveles de 5-HT extracelular en el NAcSh. Interesantemente, la combinación también redujo la hiperlocomoción inducida por la anfetamina (Figura 15C). Todos estos datos indican que el sistema dopaminérgico y serotoninérgico pueden tener efectos sinérgicos para el tratamiento de la obesidad. En este sentido, datos reportados por Hendricks *et al*, 2009, indican que el 98% de los médicos especialistas en obesidad (médicos bariátricos), prescriben principalmente fármacos como la PHEN (97% de frecuencia de uso), seguido del DEP, lo que resalta la importancia de estudiar esta combinación farmacológica, para estandarizar sus efectos terapéuticos. Además, reportaron que frecuentemente (83%) los

bariatras prescriben la combinación de fármacos aún no autorizados por la FDA; por ejemplo, la combinación de PHEN aunando 5-HTP y la carbidopa es prescrito en un 20%, a pesar de que esta combinación no está aprobada para el tratamiento de la obesidad y que en muchos casos es administrada de forma serial y no necesariamente en combinación (Tabla 1).

Tabla 1 Medicamentos prescritos comúnmente para el tratamiento de la obesidad, así como la frecuencia de prescripción. Tomado y editado de Hendricks, 2009.

Medication	% Frequency of use
Phentermine (Adipex)	97
Diethylpropion	64
Phendimetrazine	60
Methamphetamine (Desoxyn)	3
Sibutramine (Meridia)	49
Orlistat (Xenical)	43
Topiramate (Topomax)	50
Zonisamide (Zonegran)	9
5-HTP/Carbidopa	20
Caffeine with ephedrine	1.4
Orlistat with sibutramine	14
Phentermine with 5-HTP/Carbidopa	20

5-HTP, 5-hydroxytryptophan.

2. JUSTIFICACIÓN

La obesidad y sobrepeso se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa que genera un riesgo a la salud. A pesar de que la dieta y el ejercicio ayudan a reducir el peso corporal, en ocasiones es necesario agregar a la terapia el uso de fármacos supresores del apetito. En la actualidad existen fármacos que ayudan a la pérdida de peso, e.g los análogos de las anfetaminas y que tienen como principal efecto secundario el insomnio. El horario de administración no está suficientemente estudiado y hasta la fecha está basado en evidencia empírica por lo que es necesario poder determinar en qué horario es el más adecuado para potencializar sus efectos anorexigénicos. Por otro lado, en varias ocasiones se prescriben cocteles de fármacos para potencializar su efecto; sin embargo, muchas de estas combinaciones aún no han sido estudiadas a nivel preclínico y no se sabe los efectos secundarios que podrían provocar. Con base a estos antecedentes, en esta tesis se caracterizó de manera conductual y a nivel neuronal, como estos fármacos que se utilizan comúnmente (e.g. PHEN y DEP) pueden inducir pérdida de peso y/o apetito, además de establecer el periodo correcto de administración (en el caso del DEP). Además, reportamos a nivel preclínico una nueva terapia para combatir el sobre peso y la obesidad: la combinación de la PHEN y el 5-HTP.

3. HIPÓTESIS

El DEP inducirá una mayor pérdida de peso y tendrá menores efectos secundarios administrándolo en la fase activa, que al administrarlo en la fase inactiva.

5-HTP potenciará el efecto anorexigénico de la PHEN, además de que reducirá los efectos psicoactivos adversos inducidos por la PHEN.

4. OBJETIVOS

Objetivos generales

- 1) Evaluar el efecto del DEP en la pérdida de peso durante la administración durante la fase activa e inactiva del ciclo circadiano en ratas.
- 2) Evaluar la eficacia de la combinación de la PHEN y 5-HTP/CB en la pérdida de peso en ratas.
- 3) Determinar si los receptores dopaminérgicos del NAcSh participan en el mecanismo de acción de la PHEN en ratas.
- 4) Determinar el efecto de esta combinación farmacológica en la actividad eléctrica del NAcSh en ratas.

Objetivos particulares

- 1) Evaluar el efecto del DEP en la pérdida de peso e ingesta de alimento durante la fase activa y la fase inactiva.
- 2) Determinar la farmacocinética del DEP.
- 3) Determinar la dosis efectiva 50 de la PHEN y 5-HTP/CB en la pérdida de peso.
- 4) Determinar la eficacia de la combinación de la PHEN y 5-HTP/CB en la pérdida de peso, ingesta de alimento y su efecto durante la locomoción y la estereotipia.
- 5) Determinar la participación de los receptores dopaminérgicos (D1r y D2r) bajo el efecto de la PHEN sola.
- 6) Registrar la actividad neuronal del NAcSh en ratas en libre movimiento bajo el efecto de la PHEN o el 5-HTP/CB, así como la combinación de estos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales

Se utilizaron 157 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (aproximadamente de 81 días después de su nacimiento). Los animales fueron colocados en cajas individuales y con alimento y agua *ad libitum*, excepto cuando se realizaban los experimentos de locomoción o electrofisiología. La temperatura del cuarto se mantuvo a 21°C en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h (6:00 am – 6:00 pm). Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en el CINVESTAV, Unidad Zacatenco.

5.2. Fármacos utilizados

La PHEN, el DEP, el 5-HTP y la CB fueron amablemente donados por la farmacéutica Productos Medix. PHEN y DEP fueron disueltos en solución salina fisiológica (0.5% NaCl), mientras que la CB fue suspendida en carboximetilcelulosa (0.5%) y solución fisiológica en una proporción 1:4. El 5-HTP fue disuelta en solución salina fisiológica a una temperatura de ~40 °C. Todos estos fármacos fueron preparados diariamente e inyectados vía intraperitoneal. CB siempre fue inyectada 30 minutos antes de la inyección de 5-HTP. Para los grupos con combinaciones de fármacos se inyectó 5-HTP e inmediatamente PHEN. El grupo salina solamente recibió solución fisiológica, mientras que el vehículo fue carboximetilcelulosa (0.5%) y solución fisiológica en una proporción 1:4. Para los experimentos de farmacocinética de DEP, se utilizó cloroformo (CHCl₃), 0.5 y 0.1 N de ácido sulfúrico (H₂SO₄), 25% v/v de hidróxido de amonio (NH₄OH), dietil éter grado analítico (C₂H₅)₂ y etanol grado espectro. Para los registros electrofisiológicos en ratas en libre movimiento, los fármacos fueron inyectados de manera pasiva mediante un catéter intraperitoneal (ver inciso 5.3.2). R (+)-SCH-23390 hidrocloreto (SCH) y S (-) raclopride (+)-sal (RAC) fueron comprados a Sigma-Aldrich, ambos fármacos fueron disueltos en solución fisiológica e inyectados mediante una cánula crónicamente implantada en NAcSh (ver inciso 5.3.4).

5.3. Procedimientos quirúrgicos

5.3.1. *Implantación de un catéter en arteria carótida para la extracción de sangre.* Este procedimiento fue realizado para determinar los metabolitos del DEP en plasma. El catéter

utilizado fue de la marca ReCathCo No: 0116EO, desinfectado en alcohol al 70% durante 24 horas previas a la cirugía, llenado con una solución de heparina-salina (200 U de heparina/mL de salina) y colocado un tapón de acero inoxidable para evitar la salida de la solución. Las ratas fueron anestesiadas con Ketamina (75 mg/kg) y Xilacina (8 mg/kg), rasuradas y desinfectadas en la parte de las clavículas y a la altura de las vértebras cervicales (nuca). Para la implantación del catéter, se utilizó procedimientos descritos por (Feng et al. 2015). Para la inserción del catéter, la rata fue colocada en posición ventral y sujeta lado a lado sus dos patas delanteras, se realizó una incisión de ~1.5 cm en la parte derecha ventral-cervical. Para la inserción del catéter, se procedió a exponer la arteria carótida de la parte derecha mediante la disección longitudinal del músculo esternohioideo, asegurándose de separar y sin dañar el nervio vago de la arteria. Una vez que la arteria fue completamente aislada, se colocó y ligó con hilo de seda (USP 6-0, Atromat, México) en la parte cefálica de la arteria, para evitar el paso de la sangre. En la parte caudal de la arteria fue colocado otro pedazo de hilo de seda, pero sin apretar, se procedió a hacer una punción a la arteria con una aguja de insulina (doblada con un ángulo $\sim 45^\circ$) donde se introdujo cuidadosamente el catéter hasta la altura del hilo de seda (~ 7 mm dentro de la arteria) y rápidamente fue apretado. Ambos hilos de seda ayudaron a que el catéter quedara adentro y sujeto a la arteria. Para la externalización del catéter, el catéter fue pasado subcutáneamente hasta la incisión de la parte de la nuca y sujeto con hilo seda a la piel. Finalmente, la cavidad cervical fue suturada con cat-gut crómico (USP 3-0, Atromat, México), mientras que la incisión ventral de la piel fue suturada con hilo nylon (USP 3-0, Atromat, México). Los animales se mantuvieron bajo antibiótico (Enrofloxacin s.c. 10 mg/kg) y un analgésico (Ketoprofen i.p. 5 mg/kg) durante 3 días posteriores de la cirugía y las ratas fueron utilizadas una semana después de la cirugía. La viabilidad del catéter se mantuvo con una infusión diaria de solución de heparina-salina.

5.3.2. Implantación de un catéter intraperitoneal para liberar los fármacos supresores del apetito. Este procedimiento fue realizado para los registros electrofisiológicos en ratas en libre movimiento para poder infundir de manera pasiva el fármaco sin afectar o estresar al animal. Antes de cada registro electrofisiológico, se conectaba un catéter (~ 40 cm) al catéter fijado en el animal. Las ratas fueron anestesiadas como fue descrito en el apartado anterior. La metodología fue similar a la reportada por (Marchettini et al. 2002). Para la implantación del catéter intraperitoneal, se utilizó tubería de silicona de la marca Silastic® (CAT. No. 508-

004, 15 cm de longitud), desinfectado con alcohol al 70% durante 24 horas previas a la cirugía. Se procedió a rasurar y desinfectar la parte abdominal derecha y a la altura de las vértebras cervicales (nuca) de la rata. El catéter fue colocado en la pelvis a través de una incisura abdominal (~2 cm) y se sujetó con hilo de seda al músculo abdominal. Finalmente, el catéter fue pasado subcutáneamente hasta la incisión de la parte de la nuca y se sujetó con hilo seda a la piel. Finalmente, la cavidad abdominal (músculos) fue suturada con cat-gut crómico, mientras que la incisión de la piel fue suturada con hilo nylon. El procedimiento posquirúrgico fue el mismo descrito en el apartado anterior. Los animales fueron utilizados una semana después de la cirugía. Los registros electrofisiológicos fueron realizados continuamente durante 7 días bajo un mismo horario.

5.3.3. *Implantación de un arreglo de electrodos en el NAcSh.*

En la misma cirugía, a las ratas se les implantó el micro arreglo de electrodos, y el catéter intraperitoneal (descrito en 5.3.2), el cual fue siguiendo la metodología descrita por (Tellez et al. 2012). Brevemente, las ratas fueron rasuradas, desinfectadas en la parte dorsal de la cabeza, colocadas en un aparato estereotáxico. Se realizó una craneotomía en un hemisferio (contrabalanceado entre condiciones) y se implantó un micro arreglo de electrodos de tungsteno (35 μm de diámetro) con las siguientes coordenadas: AP: 1.4, ML ± 1 y DV - 7.5mm, con respecto a Bregma. Posteriormente, se insertaron 2 tornillos de acero inoxidable en cada hemisferio y se fijó con cemento acrílico al cráneo. El tratamiento posquirúrgico fue el mismo explicado anteriormente y después de una semana de recuperación se llevó a cabo el registro.

5.3.4. *Implantación de las cánulas intraNAcSh para la infusión de antagonistas dopaminérgicos.*

La infusión de los antagonistas a receptores dopaminérgicos fue realizada para determinar el efecto de estos en la alimentación y la locomoción. Para este experimento, las ratas fueron rasuradas, desinfectadas en la parte dorsal de la cabeza y colocadas en un estereotáxico, se realizó una perforación bilateral con las coordenadas: AP +1.4 mm, ML ± 1 y DV -6.5 mm con respecto a Bregma, se implantaron las cánulas guías, se insertaron 2 tornillos de acero inoxidable en cada hemisferio y fueron fijados al cráneo con cemento acrílico. Finalmente, a cada cánula se le fue colocada un estilete para evitar que fuera tapado y era retirado cada vez que se infundía los fármacos y vuelto a insertar al término de la

infusión. El tratamiento posquirúrgico fue el mismo explicado anteriormente y después de una semana de recuperación se llevó a cabo el experimento.

Las microinyecciones de los antagonistas se realizaron mediante agujas de dentista de acero inoxidable (30 G) con una longitud de 7.0 mm, conectadas a una tubería hacia una microjeringa Hamilton (10 μ L, Hamilton 80366), la cual era manipulada por un equipo de inyección (serie KDS200, KD Scientific). El volumen total de inyección por hemisferio fue de 0.5 μ L a una tasa de infusión de 0.33 μ L/min, permaneciendo el inyector 1 min adicional después de la inyección, para favorecer la completa difusión (Gutiérrez et al. 2003). Las inyecciones fueron realizadas diariamente y a la misma hora durante 7 días.

5.4. Evaluación del efecto del DEP en la pérdida de peso en ratas durante dos fases de administración

5.4.1. Extracción de muestras de plasma y determinación de metabolitos de DEP en plasma.

Para la realización de este experimento, cada rata (n=4) fue sometida previamente a la implantación de un catéter en la arteria carótida (ver apartado 5.3.1), se mantuvo individualizada en su caja hogar y hasta el día del experimento fue conectada a una tubería y a una jeringa. Se administró una dosis única de DEP (20 mg/kg) de manera intraperitoneal. El volumen de extracción de sangre fue de ~200-300 μ L e inmediatamente se le inyectaba la misma cantidad de volumen de solución salina, tomando una muestra en los siguientes tiempos: 0 min (antes de inyectar DEP), 30, 45, 60, 120, 240 y 360 min. El volumen total de extracción fue del 20% con respecto al volumen total (Diehl et al. 2001). La sangre extraída fue colocada en viales con 10 μ L de heparina (20 U/mL de salina). La sangre fue centrifugada para la extracción de plasma y el volumen de plasma obtenido (~80 μ L) fue acidificado con 7 μ L de H₂SO₄ (0.5 N) y almacenado a -4°C hasta el día del análisis.

Se detectaron dos metabolitos mayoritarios de DEP: la etil aminopropiofenona y el dietil norpseudoefedrina. La determinación se realizó con modificaciones y siguiendo la metodología descrita por (Dangor et al. 1986). Durante el día del análisis, al plasma acidificado se le agregó 350 μ L de agua destilada, alcalinizada con 8 μ L de NH₄OH hasta un pH=11. Los compuestos presentes fueron extraídos agregando 500 μ L de dietil éter, agitado durante 2 min y centrifugado a 1500 rpm/3 min. En el vial, se observó claramente dos capas y se pasó a otro vial solamente la capa superior, misma que se le agregó 400 μ L de H₂SO₄

(0.1 N), nuevamente fue agitado, centrifugado y se extrajo solamente la capa superior. Para obtener los metabolitos de la solución acidificada, se le agregó 100 μ L de dietil éter, se mantuvo en agitación, después centrifugado y colocado bajo una campana de extracción para la evaporación de dietil éter durante 10-15 min ($\sim 30^{\circ}\text{C}$). La solución sobrante fue alcalinizada agregando 20 μ L de NH_4OH más 500 μ L de CHCl_3 . A esta solución nuevamente fue agitada y centrifugada. Al final de la centrifugación, se observó dos capas, se extrajo cuidadosamente el sobrenadante (200 μ L) y se le agregó 450 mL de etanol (grado espectro). Finalmente, esta solución fue analizada en un espectrofotómetro (Lambda 12 UV-VIS) a una longitud de onda de 253 y 255 nm (Walters and Walters 1977).

DEP y los metabolitos mayoritarios fueron analizados usando el software PPharm (Innaphase). El clearance (Cl/F), volumen de distribución (V/F), tiempo de vida media y el área bajo la curva fue calculada usando un protocolo no lineal y de un compartimento.

5.4.2. Eficacia del dietilpropión en la pérdida de peso y en el consumo de alimento a diferentes tiempos de administración.

Para identificar cual es el efecto del DEP sobre la pérdida de peso en diferentes tiempos de administración, se utilizaron animales *naïve* que recibieron el tratamiento durante la fase de oscuridad (momento en el cual los animales nocturnos como las ratas están activos, Fase Activa) y otro grupo durante la fase de luz (cuando los animales se preparan para dormir y están inactivos, Fase Inactiva). La dosis utilizada fue de 20 mg/kg, ya que datos reportados por (Kalyanasundar et al. 2015), indicaron que esta dosis inducía mayor pérdida de peso. Se utilizaron un total de 32 ratas, las cuales fueron asignadas a 4 grupos: Fase Inactiva-Salina (n=9), Fase Inactiva-DEP20 (n=9), Fase Activa-Salina (n=8), Fase Activa-DEP20 (n=6). Cada rata se mantuvo en cajas individualizadas, manteniendo diariamente 100 g de alimento chow (Purina México; energía: 3.39 kcal/g de la cual 15% es grasa, 23% proteína y 62% carbohidratos) y agua *ad libitum*. El tratamiento fue controlado durante 8 días de línea base (periodo en el cual las ratas no tuvieron inyecciones, solo control de alimento y peso); seguido por 14 días continuos de inyección intraperitoneal de la siguiente manera: la Fase Inactiva-Salina y la Fase Inactiva-DEP20 fueron inyectados a las ~ 6 am, mientras la Fase Activa-Salina y la Fase Activa-DEP20 fueron inyectados a las ~ 6 pm. Durante 7 días

posteriores al tratamiento, las ratas se mantuvieron bajo control en el consumo de alimento y peso corporal. La medición del peso corporal se realizó cada 24 horas, mientras que el consumo de alimento se realizó cada 12 y 24 horas en cada fase (Fase Activa: 6 pm y 6 am; Fase Inactiva: 6 am y 6 pm).

5.5. Evaluación de la eficacia en la combinación de PHEN y el 5-HTP en la pérdida de peso en ratas

5.5.1. Curva dosis-respuesta de PHEN y el 5-HTP en la pérdida de peso.

Para determinar si PHEN y el 5-HTP afecta el peso corporal de manera dosis-dependiente, se realizó una curva dosis-respuesta para cada fármaco. En el caso de PHEN, se generaron los siguientes grupos (n=5 ratas por grupo): salina, PHEN1, PHEN3, PHEN10 y PHEN30, en el cual el número indica la dosis de 1, 3, 10 y 30 mg/kg, respectivamente. Todas las ratas fueron colocadas en cajas individuales, con 100 g de alimento chow diario (PicoLab® Rodent Diet 20; 4.11 kcal/g; 24% proteína, 13% grasa y 62% carbohidratos) y control de agua. El peso corporal, la ingesta de alimento y agua fueron registrados cada 24 horas y 15 min antes de la inyección intraperitoneal del tratamiento (14:30 y 16:00). Después de la inyección de PHEN o salina, las ratas eran colocadas individualmente en una caja de campo abierto para grabar la actividad locomotora (descrito en el apartado 5.5.2).

Para los experimentos del 5-HTP se utilizó una dosis de 75 mg/kg de carbidopa, la cual fue evaluada en experimentos piloto. El 5-HTP fue evaluada a diferentes dosis manteniendo fija la dosis de la carbidopa (nombrada como 5-HTP de ahora en adelante): vehículo (n=3), 5-HTP1 (n=4), 5-HTP12.5 (n=5), 5-HTP25 (n=4), 5-HTP50 (n=5), 5-HTP100 (n=4) (cada número indica la dosis de 1, 12.5, 25, 50 y 100 mg/kg, respectivamente). Las ratas eran colocadas en cajas individuales, manteniendo diariamente 100 g de alimento y control de agua. El peso corporal, la ingesta de alimento y agua eran registrados cada 24 horas y 15 min antes de la inyección intraperitoneal del tratamiento (14:30 y 16:00). Después de cada inyección, las ratas eran colocadas en arenas de campo abierto (descrito en 5.5.2) para grabar su actividad locomotora.

5.5.2. Medición de la locomoción y estereotipia en arenas de campo abierto.

Para evaluar el efecto de los fármacos en la actividad locomotora, se utilizó una arena de campo abierto (40 x 40 x 40 cm), en la cual tenía una cámara de video en la parte superior de la caja. Las ratas eran colocadas individualmente en cada arena inmediatamente después de la inyección con el tratamiento correspondiente y se registró la actividad durante 90 minutos. Posteriormente, las ratas regresaban a su caja hogar. El análisis de la locomoción se realizó con el programa Ethovision XT10 (Noldus Information Technology) y se reportó la distancia total recorrida del punto central de la rata (lomo) durante los 90 minutos de grabación. En el caso de la medición de estereotipia, se analizó únicamente 5 minutos del video a los 60 minutos posteriores a la inyección (tiempo en el que se observó mayor grado de estereotipia en los animales inyectados con PHEN). Se identificaron 4 estados: 1) con estereotipia, 2) desplazamiento, 3) quieto despierto y 4) dormido, los cuales se detectaron de manera manual y fueron contabilizados con el mismo programa. Se le llamó estereotipia en el momento en que la rata mantenía sus cuatro patas en el suelo, sin desplazamiento y con movimientos de la cabeza en forma de vaivén. Cuando la rata estaba en movimiento, independientemente de si mantenían movimientos de cabeza o no, se contabilizaba como desplazamiento. El estado quieto despierto se cuantificaba cuando la rata se mantenía con los ojos abiertos, pero sin tener desplazamientos en la arena y sin movimientos de la cabeza, mientras que el estado dormido era cuando las ratas permanecían inmóviles, sin movimientos de la cabeza y con los ojos cerrados. Los datos se reportaron como el porcentaje de la suma acumulativa de los diferentes estados, los cuales fueron contabilizados con el programa Ethovision XT10.

5.5.3. Evaluación de la combinación de PHEN y el 5-HTP en la pérdida de peso, la ingesta de alimento, locomoción y estereotipia.

Con el objetivo de encontrar una potenciación en la pérdida de peso, consumo de alimento, locomoción y estereotipia, se combinó la dosis efectiva 50 (ED₅₀) para el 5-HTP (31 mg/kg, de ahora en adelante como 5-HTP31). En el caso de PHEN, se utilizó la ED₂₅, ED₅₀ y ED₇₅ (10, 15 y 20 mg/kg, respectivamente, la cual será referida de ahora en adelante como PHEN10, PHEN15 y PHEN20). Fueron utilizados para este experimento un total de 57 ratas,

con los siguientes grupos: vehículo (n=5), 5-HTP31 (n=8), PHEN10 (n=5), PHEN15 (n=5), PHEN20 (n=8), PHEN10+5-HTP31 (n=5), PHEN15+5-HTP31 (n=11), PHEN20+5-HTP31 (n=10). El procedimiento fue similar al descrito anteriormente de 7 días continuos de tratamiento, donde se mantuvo bajo control el peso corporal, la ingesta de alimento y el registro de la actividad locomotora en la arena.

En otro set de experimentos, se utilizó la ED₇₅ de 5-HTP (63 mg/kg, referida como 5-HTP63) manteniendo la ED₅₀ de PHEN (15 mg/kg). Los grupos para este experimento fueron: vehículo (n=3), PHEN15 (n=3), 5-HTP63 (n=5), PHEN15+5-HTP63 (n=5) usando el protocolo descrito anteriormente.

5.5.4. Efecto de los antagonistas dopaminérgicos a los receptores D1 (SCH) y D2 (RAC) expresados en NAcSh sobre la pérdida de peso, ingesta de alimento, locomoción y estereotipia.

Este procedimiento se llevó a cabo para determinar si los receptores dopaminérgicos estaban implicados en los efectos farmacológicos inducidos por PHEN. Para la realización de este experimento, las ratas fueron sometidas a la implantación de las cánulas bilaterales en el NAcSh (descrita en el apartado 5.3.4). El número total de animales que se utilizaron fueron de 18 ratas, distribuídas en grupos (n=3): Sal+Sal (IntraNAcSh+i.p.), Sal+PHEN20, RAC+Sal, SCH+Sal, RAC+PHEN20, SCH+PHEN20. El protocolo a seguir fue el siguiente: cada rata fue colocada en una arena de campo abierto y se grabó su locomoción durante dos horas, de los cuales los primeros 45 min fue período de línea base; posteriormente la rata era extraída manualmente de la arena para la infusión del antagonista a una concentración de 2.5 µL/0.5 µL por cada hemisferio en NAcSh (Boss et al. 1988; Baldo et al. 2002), después la rata se regresaba nuevamente a la arena y 15 minutos después se extraía nuevamente para inyectar vía intraperitoneal la solución de salina o PHEN20 y finalmente se dejaba en la arena durante 1 hora más. Estos experimentos se llevaron a cabo entre las 15-18 horas (lo más cercano a la fase de actividad de las ratas) durante 7 días continuos y se registró el peso corporal e ingesta de alimento antes de la colocación de las ratas en la arena de campo abierto.

5.5.5. Registros electrofisiológicos en el NAcSh en ratas en libre movimiento durante las infusiones intraperitoneales de PHEN, 5-HTP y su combinación.

Los registros electrofisiológicos se realizaron en una caja conductual de MED Associate inc (Test Chamber for rat, # Producto: ENV-008) durante 7 días continuos de infusión de los fármacos, se utilizó una cámara de video (IDS-AB) en la parte superior para grabar su actividad. El peso corporal, el consumo de alimento y agua, fueron registrados antes de empezar el experimento. En total se utilizaron 16 ratas: PHEN15 (n=3), PHEN15+5-HTP31 (n=4), 5-HTP31 (n=3), 5-HTP63 (n=3), PHEN15+5-HTP63 (n=3). Para los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo durante 3 horas: 1 hora de línea base, 1 hora de salina y 1 hora de la infusión del fármaco (PHEN). En el caso de los registros con 5-HTP, los tiempos de inyección fueron: 1 hora de línea base, a los 60 min la infusión del vehículo, a los 90 min la infusión de CB, a los 120 min la infusión de 5-HTP sola o en combinación con PHEN. La infusión de los fármacos se realizó mediante una extensión de tubería conectada al catéter i.p. (descrito en el apartado 5.3.2). Los potenciales de acción fueron registrados mediante un procesador de adquisición PLEXON (Dallas, Texas) e identificados en línea, tomando la ventana de umbral de voltaje y el algoritmo de los componentes principales (Gutierrez et al. 2010). Posteriormente, las espigas registradas fueron sorteadas fuera de línea mediante el uso del software (PLEXON) y sólo se dejaron las espigas que mantuvieron una estabilidad en la forma de potencial de acción durante las 3 horas de registro (confirmándolo al graficar la media de la forma de potencial de acción durante los periodos de línea base, salina y después del fármaco).

5.6. Histología

Al final de los experimentos, a las ratas que se les implantó el micro electrodo o cánulas en NAcSh fueron anestesiadas con Pentobarbital sódico (100 mg/kg), perfundidas con PBS y paraformaldehído al 4 %. El cerebro fue extraído y colocado en solución de sacarosa al 10% por 24 horas, seguido por un cambio cada 24 horas con una secuencia de sacarosa al 20 y 30%. Posteriormente, los cerebros fueron seccionados a 50 μ m y teñidos mediante la tinción de Nissl para corroborar el sitio de implantación.

5.7. Análisis de datos

A excepción de los resultados electrofisiológicos, los datos se presentaron como la media \pm SEM. Las diferencias estadísticas entre grupos se cuantificaron mediante una ANOVA de repetidas medidas (ANOVA-RM) seguido de un análisis *pos hoc* de Fisher con un alfa de 0.05.

Para el análisis de datos de la actividad neuronal, todos se llevaron a cabo mediante el software de MATLAB y scripts escritos en el laboratorio. Las modulaciones neuronales de activación e inhibición (Figura 23) fueron identificadas mediante el análisis estadístico Kruskal-Wallis ($\alpha < 0.05$). La frecuencia de disparo fue segmentada en periodo de línea base, salina y durante el tratamiento. Para clasificar la actividad neuronal como activación e inhibición, se comparó el periodo de línea base por cada neurona con respecto al periodo después de la inyección.

6. RESULTADOS (primer objetivo)

Evaluación del efecto del dietilpropión en la pérdida de peso en ratas durante dos fases de administración

6.1. Determinación de los metabolitos del DEP en plasma.

Debido a que no existe reporte alguno sobre la farmacocinética del DEP en ratas (descrito en el apartado 5.4.1), en esta tesis decidí realizar por primera vez estas mediciones. En la Figura 16, se observa los niveles del DEP y sus metabolitos en plasma tras una administración única del DEP (20 mg/kg). Como se puede observar en la Figura 16, los niveles de estos metabolitos se incrementaron a partir de los 5 min después de la administración del DEP ($1.09 \pm 0.057 \mu\text{g/mL}$), alcanzando un pico máximo de concentración ($C_{\text{max}} = 32.6 \pm 2.2 \mu\text{g/mL}$) a los 60 min. A partir de este tiempo empezaron a decaer los niveles de la concentración de los metabolitos de DEP con un tiempo de vida media de 92.5 min, pero manteniéndose niveles bajos de los metabolitos aún después de las 6 horas ($4.62 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.0001$). El DEP y los metabolitos mostraron un tiempo de depuración (clearance/F) de 3.57 ml/h, con un volumen de distribución/F de 477 mL y un área bajo la curva (AUC_{INF}) de 5658 $\mu\text{g min/mL}$.

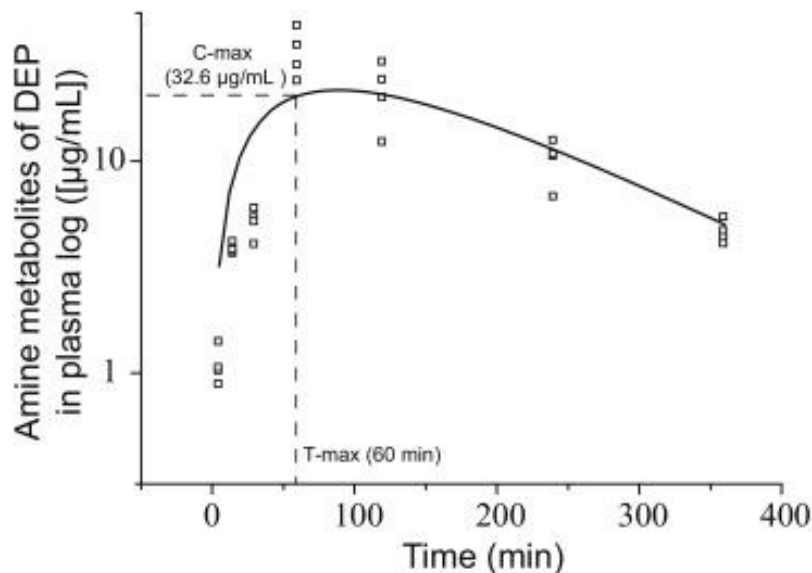


Figura 16. Concentración del DEP y sus metabolitos en plasma de rata (n= 4) después de una administración i.p. única del DEP, usando una dosis de 20 mg/kg. Las muestras de sangre fueron colectadas a través de un catéter implantado en la arteria carótida y utilizando un espectrofotómetro para la cuantificación de los metabolitos del DEP. Cada cuadro indica una muestra obtenida por cada animal, así como la concentración máxima (C-max) y el tiempo de la concentración máxima (T-max) (Kalyanasundar et al. 2016).

6.2. Efecto del DEP sobre el peso corporal y el consumo de alimento a diferentes tiempos de administración

6.2.1. Cambios en el peso corporal y el consumo de alimento

Para determinar si la administración de DEP a diferentes horarios del día afecta su eficacia, se comparó la pérdida de peso en ratas cuando se inyectó intraperitonealmente durante su fase activa, la cual es cuando las ratas están despiertas y por ende muy activas (6:00 pm-6:00 am) o la fase inactiva, cuando generalmente están durmiendo (6:00 am-6:00 pm). En la Figura 17, se observa el cambio en peso corporal durante la línea base (LB; línea base), durante el periodo del tratamiento y días después sin el tratamiento (RT, retiro del tratamiento). Se puede apreciar que, durante el periodo de tratamiento, los grupos control que recibieron salina (tanto los grupos de Fase Activa-Salina y Fase Inactiva-Salina) fueron ganando peso de manera gradual sin ninguna diferencia entre ambos grupos. Esta ganancia de peso no se puede atribuir a las inyecciones de salina ya que, además, aun después de que ya no recibieron salina en el periodo RT continuaron ganando peso.

Los grupos tratados con el DEP, tanto en la fase activa, como en la fase inactiva disminuyeron su peso corporal durante el periodo de tratamiento con respecto a los grupos control (ANOVA-RM, días1-14: $F_{(3,28)} = 106.7, p < 0.0001$), con una diferencia significativa a través

de los días ($F_{(3,13)} = 126.8$, $p < 0.0001$) y una interacción significativa ($F_{(39,364)} = 32.3$, $p < 0.0001$). Un análisis *pos hoc* indicó que el grupo Fase Activa-DEP tuvo una rápida caída en el peso corporal en comparación con el grupo de la Fase Inactiva-DEP (1-14 días: $p < 0.04$), siendo muy marcado los primeros 9 días de tratamiento (Figura 17A). De hecho, a partir de los días 7-14, se observó un cambio en la pendiente (pendiente positiva) en el peso corporal, lo que indica un desarrollo de tolerancia al fármaco. Al retirar el DEP (RT), se observó que tanto el grupo Fase Activa-DEP como Fase Inactiva-DEP recuperaron el peso corporal con la misma magnitud ($p < 0.51$ n.s.). Sin embargo, ambos grupos continuaron estando muy por debajo del peso corporal de los dos grupos controles (indicado en asteriscos) ($p < 0.0001$). Estos resultados indican que la administración del DEP durante la fase activa de las ratas (6:00 pm) induce una mayor pérdida de peso (y más rápido) en comparación a la administración de la misma dosis de DEP, pero durante la fase inactiva.

Además de evaluar el peso corporal, también se midió el consumo de alimento chow cada 24 horas. Como se observa en la Figura 17B, ambos grupos control (la Fase Inactiva-Salina y la Fase Activa-Salina) consumieron la misma cantidad de comida durante el periodo del tratamiento (Fase Activa-Salina: 25.4 ± 0.8 g, Fase Inactiva-Salina: 25.5 ± 0.9 g, $p = 0.35$).

En contraste, los grupos que fueron tratados con el DEP, se observó una disminución en el consumo de alimento (Fase Activa-DEP 19.5 ± 0.9 g y Fase Inactiva-DEP 19.8 ± 0.7 g), no hubo diferencia significativa entre estos dos grupos ($p = 0.79$); sin embargo, sí marcó diferencia significativa cuando se comparó con su respectivo grupo control ($p < 0.0001$). De hecho, se observa que, durante los primeros días de tratamiento, el grupo Fase Activa-DEP disminuyó alrededor de un 40% de su consumo de Chow, mientras que para el grupo Fase Inactiva-DEP fue de tan solo ~20%. En los días posteriores, ambos grupos demostraron un comportamiento cada vez más similar en el consumo de alimento y empezaron a consumir más después del séptimo día de tratamiento, es decir ambos grupos desarrollaron tolerancia al DEP al mismo tiempo. Interesantemente, los días posteriores al tratamiento en la fase RT, ambos grupos incrementaron el consumo de alimento, siendo aún mayor el consumo de alimento en el grupo Fase Activa-DEP con respecto a Fase Inactiva-DEP y a los dos grupos controles (indicado en flechas en el panel B).

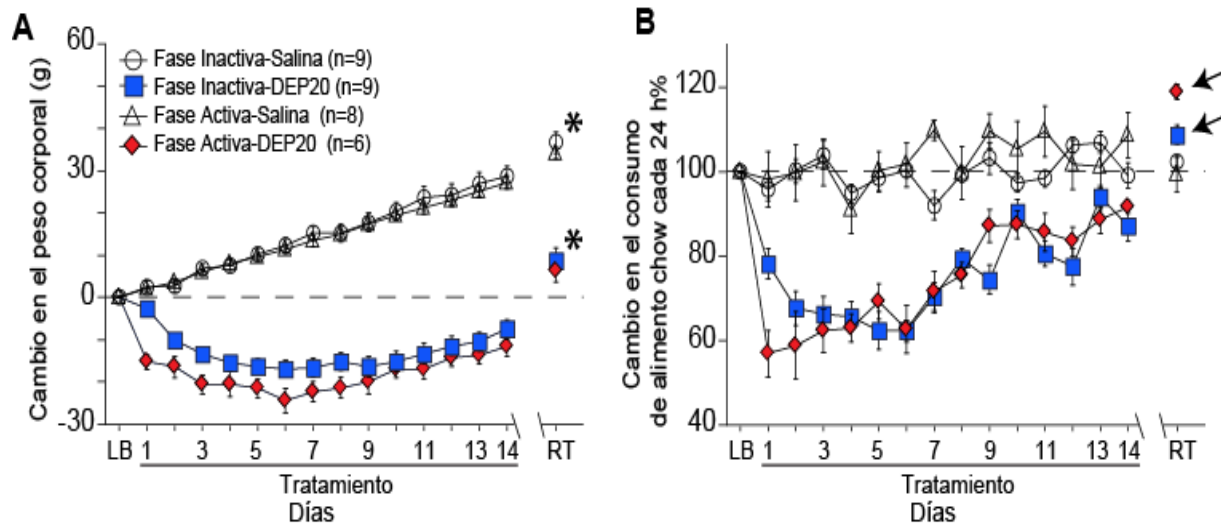


Figura 17. Efecto del DEP20 (20 mg/kg) en el peso corporal y el consumo de alimento durante dos fases de administración (Fase Activa y Fase Inactiva). A) Cambio en el peso corporal en g normalizado al último día del periodo de línea base (LB), durante 14 días continuos de inyección i.p. del DEP o salina (indicado en línea continua en el *eje x*) y días después de retirar el tratamiento (RT, día 21). Durante la fase activa, las ratas tuvieron la inyección a las 6:00 pm, mientras que en la fase inactiva fue a las 6:00 am. * indican que después de retirar el tratamiento, los grupos tratados con el DEP fueron diferentes con respecto a los grupos tratados con la salina, independientemente de la fase. B) Grafica del porcentaje en el cambio del consumo de alimento chow cada 24 h con el mismo set de animales analizados en A. Las flechas indican que después de retirar el tratamiento (RT), los grupos tratados con el DEP, incrementaron su consumo de alimento aún más con respecto a los grupos control (Kalyanasundar et al. 2016).

6.2.2. Cambios en los patrones de distribución (día-noche) en el consumo de alimento durante la administración crónica del DEP

Para evaluar el efecto del DEP durante las inyecciones en la fase activa e inactiva sobre los patrones de distribución en el consumo de alimento de las ratas (es decir, no cuanto consumieron los animales, sino a qué hora del día lo hicieron), se analizó el consumo de alimento cada 12 horas (Fase Activa: medición del consumo de alimento entre las 6:00 pm – 6:00 am; Fase Inactiva: medición del consumo de alimento entre 6:00 am- 6:00 pm) durante 7 días continuos de línea base (LB), seguido de 14 días continuos de administración del DEP o la salina (separados en días del 1-7 y 8-14) y siete días posteriores a la retirada del fármaco (RT) (Figura 18A). Como se puede observar en la Figura 18B, el patrón de consumo de alimento Chow durante el periodo de línea base, fue muy similar en los cuatro grupos: es decir normalmente los animales consumen el 74.9 ± 2.2 % de Chow durante la fase activa (indicado en recuadro gris oscuro) y el 25.1 ± 2.2 % restante durante la fase inactiva (recuadro gris claro, Figura 18B). Ninguno de los grupos control alteró su patrón de alimentación

durante el tratamiento con solución salina (Días 1-7 y días 8-14). Sin embargo, los patrones de consumo de alimentación se vieron fuertemente afectados durante el tratamiento con el DEP. En el grupo Fase Activa-DEP, durante la primera semana de administración con el DEP (días 1-7; barras rojas) disminuyó su consumo de alimento durante la fase activa (recuadro gris oscuro) y lo incrementó durante la fase inactiva (rectángulo gris claro). Estos datos fueron significativamente diferentes al compararlo con los dos grupos control ($p < 0.0001$). Es decir, el grupo Fase Activa-DEP de todo el alimento que consumió, casi comió la mitad en el día y la otra en la noche (ver panel C). Durante la segunda semana de tratamiento con el DEP (días 8-14), el grupo Fase Activa-DEP incrementó ligeramente el consumo de alimento (con respecto a la primera semana de tratamiento) durante la fase activa ($57 \pm 2.5\%$) y disminuyó en la fase inactiva ($43 \pm 2.5\%$) (panel B y C, días 8-14), debido al desarrollo de tolerancia.

Con respecto al grupo de la Fase Inactiva-DEP (barras azules), se observa que los patrones de distribución en la alimentación son diferentes durante la primera semana con respecto a la segunda semana de administración (panel B y D). En la primera semana de administración, se observa que las ratas paulatinamente van disminuyendo la comida consumida durante la fase activa e incrementándola durante la fase inactiva (panel D). Durante la segunda semana (días 8-14), el grupo Fase Inactiva-DEP, cambió significativamente los patrones de alimentación con respecto a la primera semana, ya que la cantidad de comida consumida fue similar durante la fase activa e inactiva (ver panel B, barras azules y en el panel D comparar cuadros llenos contra abiertos). Estos resultados indican que los grupos tratados con el DEP desarrollaron tolerancia, lo que se ve reflejado en el incremento en el consumo de alimento durante la fase en el que DEP fue respectivamente administrado.

Durante la semana posterior al tratamiento (RT), el grupo que se le administró DEP en la fase activa (Fase Activa-DEP) consumió alrededor de $67.1 \pm 0.8\%$ durante la fase activa y $32.8 \pm 0.8\%$ durante la fase inactiva (panel B, días 15-21). Al comparar la cantidad de comida consumida por este grupo, se observa que fue mayor en comparación al grupo control (Fase Activa- Salina) ($p < 0.01$) (Panel C). Lo que sugiere que, al retirar la administración del fármaco, generó un incremento en el consumo de alimento chow (efecto rebote, recuperar el peso perdido y por consecuencia, incrementar el consumo de alimento).

Con respecto al grupo de la Fase Inactiva- DEP se observa que después de retirar el tratamiento con DEP (RT), el consumo de alimento fue muy diferente al grupo de la Fase Activa-DEP. Tal como se observa en el panel D, especialmente durante el día 15 (indicado en un recuadro gris), las ratas del grupo de la Fase Inactiva-DEP incrementaron dramáticamente el consumo de alimento durante la fase inactiva (6:00 am-6:00 pm) en comparación a la fase activa (6:00 pm-6:00 am). Estos resultados sugieren que al administrar de manera crónica el DEP durante la fase inactiva, las ratas revirtieron su ciclo de sueño-vigilia y, por lo tanto, consumieron más alimento en esta fase. Este consumo de alimento fue gradualmente restableciéndose en los últimos días del periodo durante cada fase (días 19-21).

Con estos datos se observa que la administración de DEP en la fase inactiva no solo disminuye el consumo de alimento, también altera los patrones de distribución en el consumo, de tal manera que los animales tienden a comer más durante la fase inactiva (6:00 am- 6:00 pm), una conducta similar al síndrome de alimentación nocturna reportada en humanos (Colles et al. 2007).

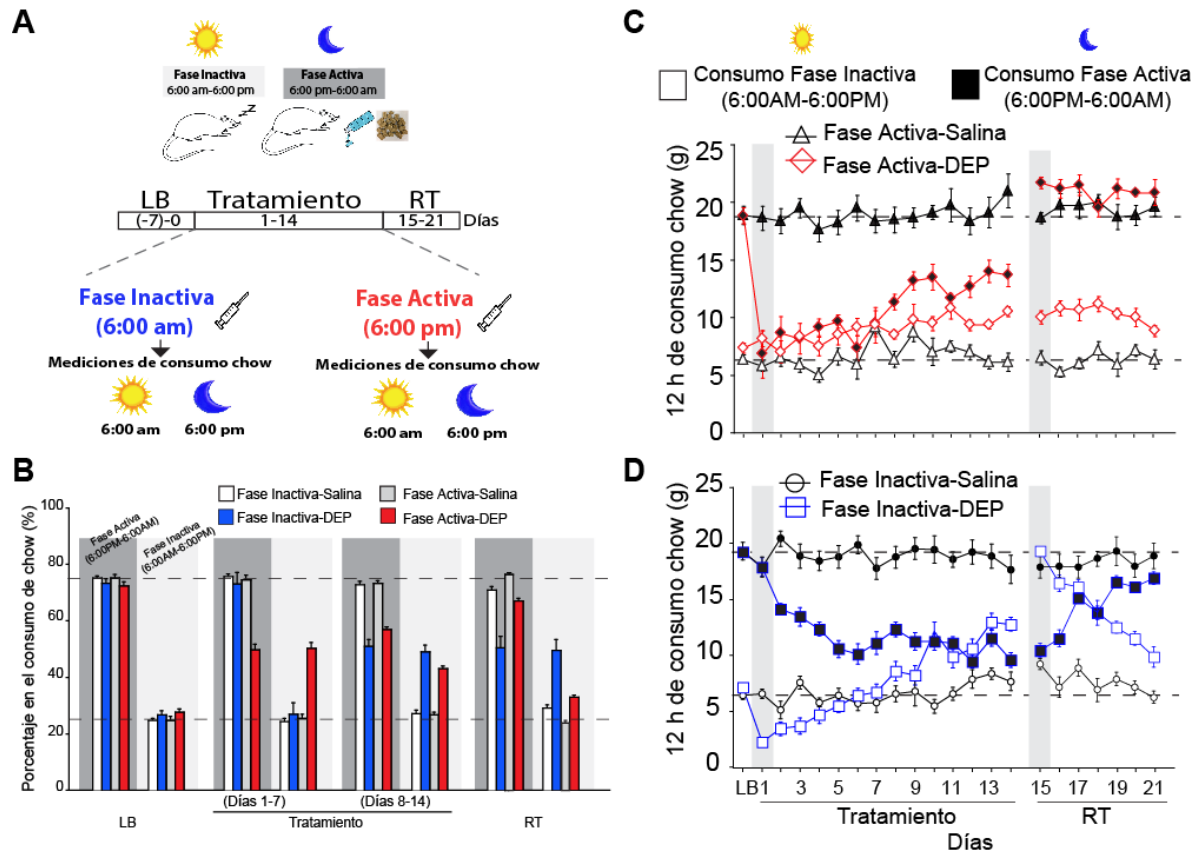


Figura 18. Patrones de distribución en el consumo de alimento durante la fase activa (6:00 pm – 6:00 am) y durante la fase inactiva (6:00 am – 6:00 pm) en los periodos de línea base (LB), tratamiento y después de retirar el tratamiento con el DEP (RT). A) Esquema que ilustra el protocolo experimental durante el periodo de línea base (LB), durante el tratamiento y después del tratamiento (RT). B) Gráfica de barras indicando el patrón de distribución del alimento consumido durante cada fase con los cuatro grupos: Fase Activa-Salina, Fase Activa-DEP, Fase Inactiva-Salina y Fase Inactiva-DEP. El fondo gris oscuro indica el consumo durante la fase activa y el fondo gris claro, durante la fase inactiva. Las barras indican la media \pm SEM. C) Consumo de alimento en gramos con el mismo set de animales analizados en B medido cada 12 horas: durante la fase activa y la fase inactiva cuando las inyecciones del DEP o salina se realizaron en la fase activa. La cantidad de comida consumida durante la fase activa e inactiva por cada tratamiento está representándose con los símbolos llenos o vacíos, respectivamente. Los rectángulos con fondo gris indican el inicio del tratamiento (día 1) y el inicio del periodo sin el fármaco (día 15). D) Consumo de alimento en gramos medido cada 12 horas, durante la fase activa e inactiva, cuando el tratamiento fue realizado en la fase inactiva (Kalyanasundar et al. 2016).

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN (primer objetivo)

La utilización de los fármacos supresores del apetito, aunado a dieta y ejercicio, es la mejor manera para que pacientes con obesidad bajen de peso, sin una intervención quirúrgica. Dentro de los principales fármacos prescritos actualmente son el DEP y la PHEN (Hendricks et al. 2009; Hampp et al. 2013). Por ser análogos a las anfetaminas, estos fármacos desencadenan un incremento en el estado de vigilia y la locomoción, así como pérdida de peso (Kalyanasundar et al. 2015). El primer objetivo de esta tesis, fue evaluar el efecto del DEP sobre la pérdida de peso y consumo de alimento en ratas durante dos fases de administración: durante el periodo nocturno, en donde ellos se encuentran más activos y despiertos, siendo esta la fase activa (6:00 pm- 6:00 am) y durante el periodo diurno, en la cual permanecen mayor tiempo durmiendo y menos activos, siendo su fase inactiva (6:00 am- 6:00 pm). Nuestros resultados demostraron que la administración del DEP en la fase activa induce una mayor pérdida de peso en comparación a la administración durante la fase inactiva (Figura 17). Aunado a esto, encontramos que la administración del DEP durante la fase inactiva alteró los patrones de distribución en el consumo de alimento chow, de tal manera que las ratas de lo poco que comieron, consumieron más porcentaje de su comida durante la fase inactiva (Figura 18). Este tipo de alteración en los patrones de distribución en la alimentación se ha relacionado fuertemente con el síndrome de alimentación nocturna en humanos (Colles et al. 2007)

Comparación de la dosis utilizada en humanos con respecto a roedores

La dosis de 20 mg/kg de DEP utilizado en este trabajo se basó en resultados que publicamos en el laboratorio y que indicaron una sustancial pérdida de peso (Kalyanasundar et al. 2015). En humanos, la dosis utilizada es de 75 mg (en tabletas de liberación controlada)(Dangor et al. 1986; Bray and Ryan 2006). Debido a que las ratas tienen un metabolismo más acelerado con respecto a los humanos, nos basamos en la guía aprobada por la FDA (FDA guidelines CDER 2005), que indican un factor de conversión de 6.2. Para un ser humano con un peso de 60 kg, se necesitaría una dosis de 193 mg para alcanzar la dosis utilizada. Sin embargo, según la farmacocinética obtenida en esta tesis, obtuvimos que el tiempo de vida media del DEP en ratas fue de 1.5 horas (con un tiempo de duración del efecto 6-7 horas) y comparando

con el tiempo de vida media reportado en humanos, este es de 4-6 horas (con un tiempo de duración en el efecto de 12 horas, ya que es una pastilla de liberación controlada). Con estos datos, vimos la necesidad de utilizar esta dosis debido a que el tiempo de duración del efecto del fármaco era menor a las 12 horas, lo cual era importante para ver el efecto del fármaco solamente durante la fase activa o la fase inactiva.

La administración del DEP debe realizarse durante la fase activa

A pesar de que es común que los doctores prescriban al DEP antes del desayuno (durante el día), no existía evidencia sistemática que apoyara en que horario debía administrarse este medicamento para obtener una mejor eficacia. Parte de este estudio fue evaluar el efecto del DEP en ratas durante dos periodos de administración: la fase activa y la fase inactiva. Esto es muy importante ya que este fármaco induce insomnio, además que las personas tienden a comer de más cuando tienen problemas para dormir, una de las causas para desarrollar obesidad (Colles et al. 2007). En humanos, esta enfermedad se llama síndrome de alimentación nocturna. De acuerdo a nuestros resultados, observamos una conducta similar en las ratas, con algún parecido a la de los humanos. Nuestros datos arrojaron que, durante la administración del DEP en la fase inactiva, (aunque tardó un poco más) se generó una pérdida de peso similar a la administración del DEP durante la fase activa (Figura 17). Sin embargo, se observaron cambios en el patrón de distribución en la alimentación durante las dos fases. Nuestros resultados indicaron que cuando el DEP es administrado durante la fase inactiva (periodo que regularmente están durmiendo), este fármaco provocó un cambio en el patrón de alimentación, ya que, durante la segunda semana de tratamiento, además de generar una tolerancia, las ratas incrementaron la cantidad de comida consumida durante la fase inactiva (Figura 18). Este resultado puede deberse a que el DEP induce insomnio, lo que permite que las ratas consumieron más alimento durante el periodo que deberían de estar durmiendo (fase inactiva). Interesantemente, durante el primer día sin administrar el DEP durante la fase inactiva (Figura 18D, día 15), las ratas cambiaron completamente el patrón de distribución de la alimentación, ya que se observó que durante la fase inactiva (6:00 am-6:00 pm), las ratas consumieron una mayor cantidad de comida en comparación a la fase activa (6:00 pm-6:00 am), revirtiendo completamente su patrón de distribución de la alimentación (Ver día 15 Figura 18D). Estos resultados sugieren que DEP fue capaz de

revertir el ciclo sueño-vigilia de los animales (ver RT, Figura 18D). Basado en estos resultados, se concluye que el DEP debe ser administrado al inicio de la fase activa. En el caso de los humanos estrictamente por la mañana.

Con respecto a la administración del DEP durante la fase activa (6:00 pm-6:00 am), se observó que también se incrementó la cantidad de comida consumida durante la fase inactiva (Figura 18B, C). Este resultado puede deberse a un proceso compensatorio en la alimentación después del efecto anorexigénico del fármaco desaparece (Figura 16). De hecho, se observó que después de dejar de administrar el DEP durante la fase activa (periodo RT) las ratas seguían consumiendo más cantidad de comida, tanto en la fase activa como en la inactiva, en comparación a los grupos control. Este resultado es similar a lo reportado en humanos que toman este tipo de fármacos supresores del apetito, indicando un efecto rebote en el consumo de alimento, como una consecuencia esperada para tratar de recuperar lo más rápidamente el peso corporal perdido durante el tratamiento (Ghosh and Parvathy 1976; Fernstrom and Choi 2008).

Mecanismo de acción del DEP y sus efectos anorexigénicos.

El mecanismo de acción del DEP está mediado por un incremento de las catecolaminas (Arias et al. 2009). Además, recientemente se reportó que una inhibición de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en NAcSh disminuye la pérdida de peso, locomoción y estereotipia inducida por el DEP, indicando el papel de los D1r y D2r en los efectos generados por este fármaco (Kalyanasundar et al. 2015). Varios estudios indican el papel de la DA en los procesos motivacionales, en la alimentación y locomoción. Existe evidencia que indica que la DA parece regular la ingesta de alimento mediante la modulación de los procesos de recompensa (vía mesolímbica) (Martel and Fantino 1996). El acto de comer no solo provee los nutrientes necesarios para sobrevivir, sino que también genera un estado de placer y gratificación. La conducta de alimentación incrementa los niveles de DA en el NAC (Bassareo and Di Chiara 1999), lo que se ha relacionado a un estado de euforia parecido a las drogas de abuso (Pontieri et al. 1996). Además, los fármacos que incrementan los niveles de DA son generalmente anorexigénicos. Tal es el caso de la anfetamina, el cual reduce el consumo de alimento, incrementa la vigilia y la locomoción (Kelley et al. 2005). Otros reportes, han demostrado que niveles óptimos de la DA es esencial para que ocurra la

conducta alimenticia (Szczyпка et al. 1999). Datos reportados por (Wang et al. 2001), indicaron una disminución de la expresión de receptores D2 en estriado en humanos con obesidad. Estos datos indican que la DA está fuertemente relacionada con la conducta alimenticia y que el DEP, fármaco que induce un incremento de DA en el cerebro, disminuye la ingesta de alimento y por consecuencia, una pérdida de peso.

Por último, los niveles de DA también fluctúan en sincronía con la locomoción y el sueño (Doi et al. 2006), específicamente durante los ritmos ultradianos (ciclos de 4 horas). Los ritmos ultradianos influyen en diversas conductas animales tales como la locomoción, sueño, alimentación y temperatura corporal (Dowse et al. 2010; Seki and Tanimura 2014). Por ejemplo, se ha demostrado que una fluctuación de los niveles de DA en estriado están en sincronía con los ciclos ultradianos, pero pueden ser desincronizados cuando los niveles de DA son alterados, produciendo perturbaciones en los sueños de sueño-vigilia (Blum et al. 2014). Además, algunos fármacos como la metanfetamina (que induce un incremento de DA en el cerebro), prolonga los ciclos ultradianos (Blum et al. 2014). En base a esto, nosotros sugerimos que la administración del DEP durante la fase inactiva muy probablemente es capaz de revertir el ciclo de sueño-vigilia, generando como consecuencia una alteración en los patrones de distribución de la alimentación durante las dos fases.

En conclusión, es necesario que los médicos especialistas (principalmente bariatras) que tratan con fármacos supresores del apetito, en este caso DEP - y otros fármacos análogos como la PHEN-, deban enfatizar la importancia de mantener el horario de administración de este tipo de fármacos. Nuestros resultados indicaron que el DEP cambia los patrones de distribución de la alimentación cuando es administrado durante la fase inactiva (día en los roedores), ya que los animales tienden a comer más durante la fase donde deberían estar durmiendo. Estos resultados son similares a los reportados con personas que desarrollan el síndrome de alimentación nocturna. Es importante remarcar que no estamos diciendo que al tomar la pastilla cerca del horario nocturno, las personas con obesidad van a forzosamente a desarrollar este síndrome, pero si no existe un horario estrictamente controlado de administración durante la mañana, las personas que tomen el medicamento en la noche o cerca de su periodo de sueño, pueden presentar insomnio. Este resultado puede predisponer a desarrollar un desorden en su conducta de alimentación, especialmente si esto se vuelve

frecuente. También es probable que esta clase de supresores del apetito puedan agravar la sintomatología de pacientes que ya presentan el síndrome de ingesta nocturna, aunque estudios futuros son necesarios para clarificar este punto.

8. RESULTADOS (segundo objetivo)

Efecto de la combinación de PHEN más 5-HTP

El segundo objetivo de la tesis fue evaluar la combinación con 5-HTP y la participación del NAcSh en el efecto farmacológico de PHEN. Para ello, se llevó a cabo una curva dosis efectiva 50 para cada fármaco y después evaluamos su interacción sobre la pérdida de peso, consumo de alimento chow, así como en los efectos psicomotores.

8.1. Curva dosis-respuesta de PHEN y el 5-HTP en la pérdida de peso.

Para determinar la dosis efectiva 50 (ED₅₀) del 5-HTP y PHEN, se procedió a realizar una curva dosis-respuesta en la pérdida de peso. En la Figura 19, se muestra la ED₅₀ para el 5-HTP la cual fue de 31 mg/kg (indicado con una flecha en el panel A), mientras que para PHEN fue de 15 mg/kg (panel B).

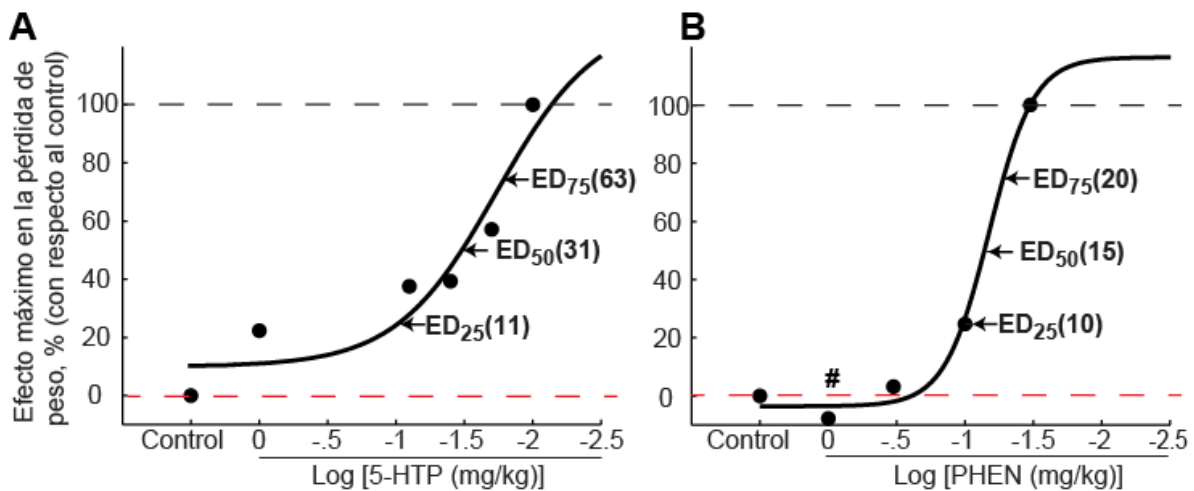


Figura 19. Curva dosis efectiva en la pérdida de peso para el 5-HTP y PHEN en ratas. A) Curva dosis efectiva para el 5-HTP manteniendo una dosis fija de CB (75 mg/kg) a diferentes dosis del 5-HTP (1, 12.5, 25, 50 y 100 mg/kg) (n=3-5 por grupo, *ver métodos*). Cada punto indica el promedio del cambio de peso corporal de los 7 días continuos del grupo control y de tratamiento. El peso corporal fue normalizado al valor máximo de pérdida de peso con respecto al grupo control; la línea punteada negra es el 100% de pérdida de peso alcanzada durante el tratamiento, mientras que la línea roja es la pérdida de peso inducida por el grupo control. Cada flecha indica la dosis efectiva 25, 50 y 75 en mg/kg (ED₂₅, ED₅₀ y ED₇₅, respectivamente). B) Curva

dosis efectiva para la PHEN sola a diferentes dosis (1, 3, 10 y 30 mg/kg) (n=5 por grupo). El # indica que la dosis de 1 mg/kg paradójicamente incrementó ligeramente el peso corporal con respecto al grupo control.

8.2. Evaluación de la combinación de PHEN y el 5-HTP en la pérdida de peso e ingesta de alimento

Estudios previos con roedores reportaron que una administración continua de PHEN a dosis de 20 mg/kg induce pérdida de peso y reduce el consumo de alimento (Kalyanasundar et al. 2015). Datos similares fueron reportados por (Amer, et al. 2004), en donde una administración aguda del 5-HTP, generó una disminución en el consumo de alimento, aun estando privadas de alimento. Sin embargo, no existe evidencia preclínica que apoye si la combinación entre PHEN y el 5-HTP potencialice su efecto anorexigénico. Con el objetivo de encontrar una potenciación en la pérdida de peso y consumo de alimento, se combinó la dosis efectiva 50 (ED₅₀) del 5-HTP (31 mg/kg, mencionada de ahora en adelante como 5-HTP31) con tres distintas dosis de PHEN. En el caso de PHEN, se utilizó la ED₂₅, ED₅₀ y ED₇₅ (10, 15 y 20 mg/kg, respectivamente, la cual será referida de ahora en adelante como PHEN10, PHEN15 y PHEN20). En la Figura 20, se muestra el promedio de la pérdida de peso en forma de barras de los grupos durante los primeros 3 días (panel izquierdo) y durante los 4 días posteriores (panel derecho) de tratamiento. Como se observa en la Figura 20A, el grupo control (Veh) fue el que tuvo una ganancia de peso durante los siete días de tratamiento (días 1-3: 4.8 ± 0.9 g y días 4-7: 15.4 ± 1.3 g). Con respecto al grupo 5-HTP31, se observa que durante el tratamiento tuvo una disminución significativa en el peso corporal, con respecto al grupo control ($p < 0.0001$). Los grupos de PHEN10, PHEN15 y PHEN20 (indicado en barras en color azul a diferentes tonalidades) incrementaron la pérdida de peso corporal de manera dosis dependiente durante los primeros 3 días de tratamiento ($0.1 \pm .7$, $-3.7 \pm .8$ y $-5.7 \pm .5$ g, respectivamente), tal efecto se vio disminuido conforme el tratamiento progresaba (días 4-7: 1.7 ± 1 , $-1.2 \pm .8$ y $-6.6 \pm .5$ g, respectivamente), debido al desarrollo de tolerancia. Interesantemente, al utilizar la combinación de PHEN10+5-HTP31, PHEN15+5-HTP31 y PHEN20+5-HTP31 (barras blancas con líneas diagonales), la pérdida de peso se vio potenciada con respecto a los fármacos por sí solos (5-HTP31, PHEN10, PHEN15 y PHEN20) durante los 7 días de tratamiento. Durante los días 1-3 el análisis estadístico de ANOVA-RM indicó un efecto significativo entre dosis ($F_{(9,63)} = 21.599$, $p < 0.0001$), efecto entre los días ($F_{(9,2)} = 55.189$, $p < 0.0001$) y una interacción de dosis x días ($F_{(27,189)} = 7.346$, $p < 0.0001$). El análisis *post hoc* indicó que los grupos de PHEN10 vs PHEN10+5-HTP31;

PHEN15 vs PHEN15+5-HTP31 y PHEN20 vs PHEN20+5-HTP31 ($p_s < 0.05$) fueron significativamente diferentes durante los primeros 3 días de tratamiento. Datos similares se obtuvieron en los días 4-7, en donde se observa que las combinaciones que indujeron una mayor pérdida de peso fueron en el siguiente orden: PHEN20+5-HTP31 > PHEN15+5-HTP31 > PHEN10+5-HTP31.

Con el mismo grupo de animales, se evaluó el consumo de alimento chow cada 24 horas posteriores a cada inyección (Figura 20). En el panel B se observa la media en el cambio en el consumo de alimento en gramos durante los primeros 3 días de tratamiento (izquierda) y los 4 días posteriores (derecha). El grupo control (Veh) no generó diferencia en el cambio del consumo de alimento durante todo el tratamiento (día 1-3: $0.5 \pm .4$; día 4-7: $1.5 \pm .3$ g). Con respecto al grupo de 5-HTP31, se observa que durante los primeros 3 días tuvo una mayor disminución en el consumo de alimento (-7.4 ± 1.3 g) con respecto a los siguientes 4 días posteriores (-2.4 ± 1.3 g); sin embargo, consumieron menos que el grupo control. Por otra parte, PHEN10, PHEN15 y PHEN20 indujeron una reducción en la ingesta de alimento chow de manera dosis dependiente durante los primeros 3 días de tratamiento (días 1-3: $-1.6 \pm .8$, $-5.1 \pm .6$ y $-7.7 \pm .6$ g, respectivamente). Con respecto a los grupos en combinación, se observa que la combinación que indujo mayor decremento en la ingesta de chow durante los días 1-3 fue en el siguiente orden: PHEN20+5-HTP31 = PHEN15+5-HTP31 > PHEN10+5-HTP31. El análisis estadístico indicó una diferencia significativa entre los tratamientos durante los días 1-3: ($F_{(9,63)} = 26.029$, $p < 0.0001$), un efecto entre los días ($F_{(9,2)} = 10.568$, $p < 0.0001$), sin interacción entre los tratamientos x días ($F_{(18,126)} = 1.425$, $p = .0131$). Un análisis *post hoc* indicó una diferencia significativa entre los grupos: PHEN10 vs PHEN10+5-HTP31; PHEN15 vs PHEN15+5-HTP31 y PHEN20 vs PHEN20+5-HTP31 ($p_s < 0.05$).

A partir de los días 4-7, se observó que los grupos de PHEN10, PHEN15 y PHEN20 fueron incrementando su consumo de alimento con respecto los primeros días de tratamiento ($.3 \pm .5$, $-.6 \pm .7$ y $-2.7 \pm .9$ g, respectivamente), sin llegar a alcanzar la cantidad de comida consumida por el grupo control. Datos similares se observaron con los grupos en combinación PHEN10+5-HTP31, PHEN15+5-HTP31 y PHEN20+5-HTP31. Estos resultados sugieren que los animales desarrollaron una tolerancia a los fármacos con respecto

a la pérdida de peso y consumo de alimento, lo que provoca que los animales empiecen a comer más en comparación a los primeros días de tratamiento, pero nunca sin llegar a consumir la misma cantidad que el grupo control.

En otro set de experimentos, evaluamos la combinación de la ED₇₅ de 5-HTP (63 mg/kg, mencionada como 5-HTP63) con PHEN15. Estos resultados fueron agregados a la misma Figura 20A y B (indicado con una línea cortada en el eje horizontal). Como se puede observar en el panel A, el grupo 5-HTP63 (barra roja) no indujo mayor pérdida de peso en comparación al grupo 5-HTP31 (barra naranja) durante los días 1-3 y los días 4-7 (n.s.), indicando un efecto de techo. Sin embargo, durante los días 1-3, la combinación PHEN15+5-HTP63 vs PHEN15 sí promovió mayor pérdida de peso (-11.9 ± 1.9 y $-3.7 \pm .8$ g, respectivamente, $p < 0.001$). Datos similares fueron obtenidos durante los días 4-7 ($p < 0.001$). Al comparar la combinación PHEN15+5-HTP31 y la combinación PHEN15+5-HTP63 durante los días 1-3, demostró una diferencia significativa en la pérdida de peso ($p < 0.05$). Sin embargo, esta diferencia desaparece en los siguientes 4 días de tratamiento (n.s.).

Con respecto al consumo de alimento (Figura 20B), no hubo diferencias significativas entre la combinación PHEN15+5-HTP31 y PHEN15+5-HTP63 ($-15.4 \pm .8$ y -13.0 ± 1.1 g, respectivamente) durante los días 1-3 (B, panel izquierdo), lo mismo para los días 4-7 ($-7.3 \pm .7$ y -9.2 ± 1 g, respectivamente, panel derecho). Estos resultados indican que, a pesar de incrementar los niveles de 5-HT en el cerebro utilizando la combinación PHEN15+5-HTP63, no indujo un incremento en la pérdida de peso mayor o una disminución en el consumo de alimento en comparación a la combinación PHEN15+5-HTP31, lo que sugiere un efecto techo en la combinación.

Nuestros resultados indican que la combinación de PHEN con 5-HTP utilizada en roedores, potencializa la pérdida de peso y causa una disminución en la ingesta de alimento en comparación a los fármacos solos. Además, a pesar de incrementar la dosis de 5-HTP (5-HTP63), este no fue capaz de inducir una mayor pérdida de peso corporal y tampoco en la ingesta. Estos datos sugieren que la interacción entre el 5-HTP y PHEN es efectiva para la utilización como fármaco supresor del apetito.

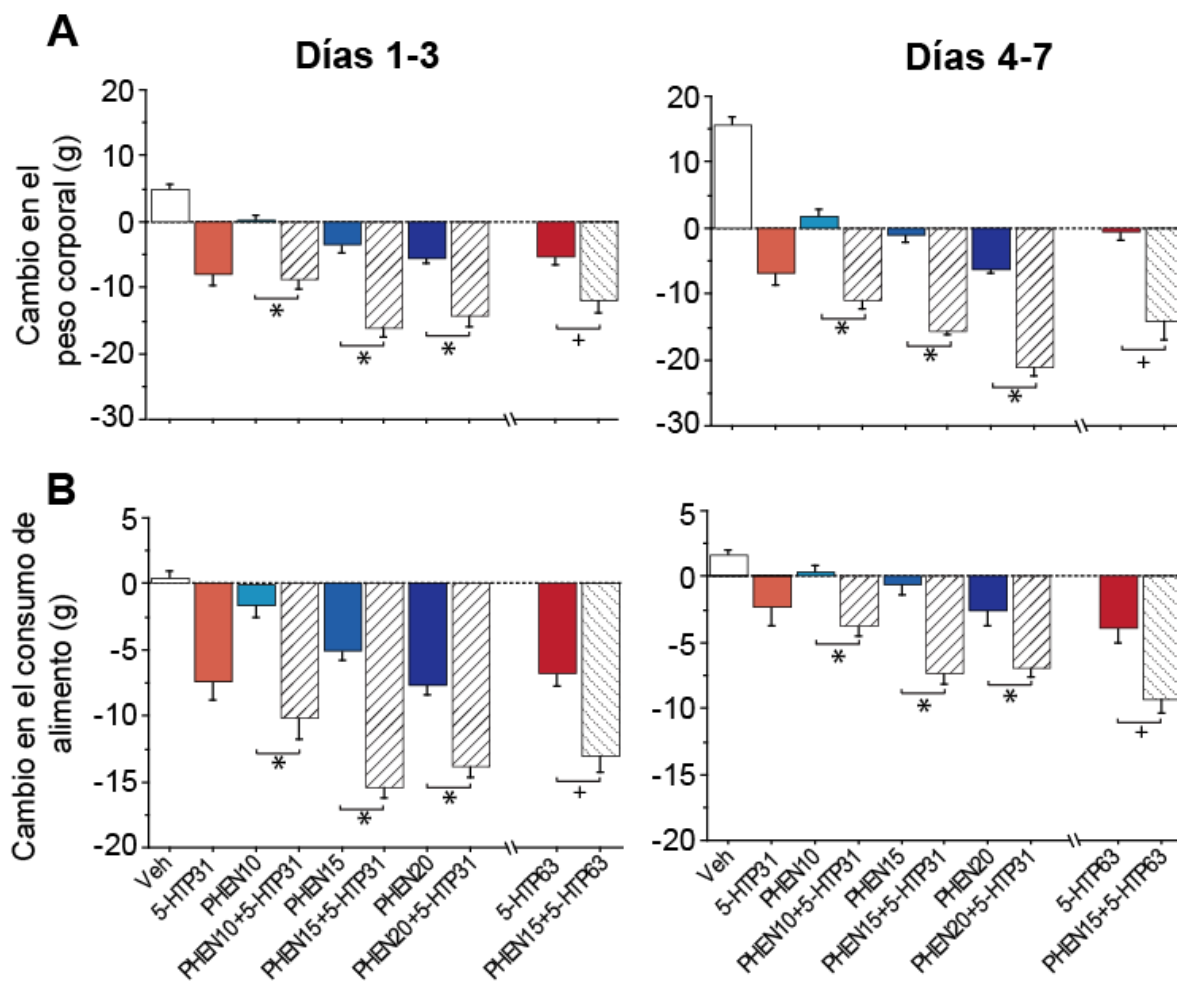


Figura 20. Efecto de PHEN sola o en combinación con el 5-HTP en la pérdida de peso y en el consumo de alimento en rata durante 7 días continuos de inyecciones i.p. A) Cambio en el peso corporal en combinación de PHEN más el 5-HTP durante los primeros días de tratamiento (izquierda) y los 4 días posteriores (panel derecho). En la gráfica se indica la media del peso corporal normalizada al último día del inicio de inyección con respecto a cada tratamiento: control (Veh), el 5-HTP con una dosis de 31 mg/kg (5-HTP31), PHEN sola usando las dosis de 10, 15 y 20 mg/kg (indicados como PHEN10, PHEN15 y PHEN20, respectivamente); el 5-HTP31 en combinación con 3 dosis de PHEN: PHEN10+5-HTP31, PHEN15+5-HTP31 y PHEN20+5-HTP31. El eje cortado indica otro set de experimentos, pero fueron graficados en la misma figura para su explicación, en el cual se utilizó una dosis de 63 mg/kg del 5-HTP (ED₇₅, mencionada como 5-HTP63) y la combinación de PHEN15+5-HTP63. * $p < 0.05$ con respecto a PHEN sola, + $p < 0.05$ con respecto a 5-HTP63. B) Cambio en el consumo de alimento en gramos cada 24 horas normalizada al último día del inicio de la inyección con el mismo set de animales mostrados en A.

8.3. Efecto de la combinación de PHEN con el 5-HTP con respecto a la locomoción y la estereotipia.

Estudios previos con ratas reportaron que la administración de PHEN incrementa la locomoción e induce estereotipia (movimientos de cabeza en forma de vaivén) (Reimer et al. 1995; Kalyanasundar et al. 2015). En este estudio evaluamos si la administración de 5-HTP era capaz de reducir los efectos psicomotores inducidos por PHEN. Con el mismo grupo de

animales descrito en el apartado anterior (8.2), evaluamos la distancia y la estereotipia inducida por los fármacos solos y en combinación durante los siete días continuos de la administración sistémica de los fármacos en un campo abierto. En la Figura 21A, se graficó la distancia recorrida durante los primeros días de tratamiento (1-3, panel izquierdo) y los 4 días posteriores (4-7, panel derecho). Como se observa en A (panel izquierdo), durante los primeros días (1-3) el grupo control (Veh) recorrió una distancia total promedio de 4532.726 ± 741.113 cm durante los 90 minutos posteriores a la inyección de salina. El 5-HTP31 indujo mayor locomoción (11524.5 ± 1008.5 cm/90 min) en comparación al grupo control, pero en mucho menor grado que PHEN10. El grupo de PHEN10 fue el que indujo mayor locomoción, seguido de PHEN15 y PHEN20 (26054.2 ± 1612.3 , 13693.5 ± 1782 y 10818.8 ± 1934.4 cm/90 min, respectivamente). El grupo PHEN10+5-HTP31 disminuyó la locomoción en comparación al grupo PHEN10, mientras que la combinación PHEN15+5-HTP31 y PHEN15 no mostraron cambios en la locomoción y la combinación PHEN20+5-HTP31 indujo mayor locomoción en comparación con PHEN20. El análisis estadístico durante los primeros días de inyección (1-3) mostraron una diferencia significativa entre los tratamientos: ANOVA-RM ($F_{(9,59)} = 6.395$, $p < 0.0001$), un efecto entre los días ($F_{(9,2)} = 12.042$, $p < 0.0001$), con una interacción entre los tratamientos x días ($F_{(18,118)} = 1.802$, $p = .0326$). Un análisis *post hoc* demostró diferencia significativa entre PHEN10 vs PHEN15 y PHEN10 vs PHEN20 ($p_s < 0.05$) (indicado con una + en la Figura 21A), así como PHEN10 vs PHEN10+5-HTP31 ($p < 0.05$).

Interesantemente, durante los siguientes días de tratamiento (días 4-7) se observó un cambio en la distancia inducida por PHEN sola y la combinación. Como se observa en el panel derecho de la Figura 21A, la locomoción inducida por el grupo control no se vio afectada durante los 4 días posteriores de inyección del vehículo (con respecto a los días 1-3), mientras que para el grupo de 5-HTP31, la locomoción fue ligeramente disminuida (8299.1 ± 669.9 cm/90 min). PHEN10 tuvo una mayor locomoción en comparación a PHEN15 y PHEN20 (26184 ± 1412 , 7259.9 ± 701.6 y 4841.2 ± 630.7 cm/90 min, respectivamente). Sin embargo, PHEN15 y PHEN20 disminuyeron la locomoción aún más en comparación a los primeros 3 días de tratamiento (panel izquierdo, barras azules). Mientras que la combinación PHEN10+5-HTP31 ligeramente disminuyó la locomoción inducida por PHEN10, las

combinaciones de PHEN15+5-HTP31 y PHEN20+5-HTP31 incrementaron la locomoción inducida por PHEN15 y PHEN20, respectivamente. El análisis estadístico para los días 4-7 marcaron una diferencia significativa entre los tratamientos: ANOVA-RM ($F_{(9,63)} = 8.894$, $p < 0.0001$), sin efecto entre los días ($F_{(9,3)} = 1.737$, $p = 0.1609$) y sin interacción entre los tratamientos x días ($F_{(27,189)} = 1.114$, $p = 0.3267$). El análisis *post hoc* demostró una diferencia significativa entre los grupos PHEN10 vs PHEN15, PHEN10 vs PHEN20 (indicado con una +); PHEN15+5-HTP31 vs PHEN15 y PHEN20+5-HTP31 vs PHEN20 ($p_s < 0.05$) (indicado con un *). Estos resultados sugieren que, tras una administración continua de PHEN, se genera un cambio en la conducta locomotora (hipolocomoción) de los animales, ya que después del tercer día de inyección, las dosis de PHEN15 y PHEN20 disminuyen su grado de locomoción y este efecto se ve revertido con el 5-HTP, lo que indica que el componente serotoninérgico está modificando los efectos psicomotores inducidos por PHEN.

La dosis del 5-HTP63 indujo ligeramente mayor locomoción con respecto al grupo control, pero estos resultados no fueron significativamente diferentes durante los días 1-3 y 4-7 (n.s.) (Figura 21A). Resultados similares se obtuvieron al comparar el grupo PHEN15+5-HTP63 con el grupo PHEN15+5-HTP31 durante los días 1-3 (13259.7 ± 1626.7 y 13887.1 ± 11164.9 cm/90 min, respectivamente) (n.s.); lo mismo para los días 4-7 (7263.8 ± 1253.4 y 13061.9 ± 1329.4 cm/90 min, respectivamente) (n.s.). Lo interesante de este resultado fue que al final del tratamiento, los animales del grupo PHEN15+5-HTP63 permanecieron más tiempo despierto, pero en estado quieto, en comparación al grupo PHEN15+5-HTP31, que este sí presentó mayor locomoción.

Con respecto a la estereotipia inducida por PHEN, nuestros resultados descubrieron algo muy interesante. En la Figura 21B, se grafica la estereotipia (movimientos de cabeza en forma de vaivén) durante los primeros días de tratamiento (días 1-3, panel izquierdo) y los 4 días posteriores (días 4-7, panel derecho). Los grupos de salina, 5-HTP31 y 5-HTP63 no mostraron estereotipia, por lo que en la Figura 21B, no se graficó ninguna barra en estos grupos. Durante los días 1-3, los grupos de PHEN sola, mostraron un grado de estereotipia de manera dosis dependiente: PHEN20 > PHEN15 > PHEN10. Al comparar los grupos de PHEN sola o con su combinación (PHEN10 vs PHEN10+5-HTP31, PHEN15 vs PHEN15+5-HTP31, PHEN20 vs PHEN20+5-HTP31) obtuvimos que la combinación disminuyó la

estereotipia. El análisis estadístico para los días 1-3, indicaron una diferencia significativa entre los tratamientos: ANOVA-RM ($F_{(9,59)} = 21.088, p < 0.0001$), con efecto entre los días ($F_{(9,2)} = 13.374, p < 0.0001$) y sin interacción entre los tratamientos x días ($F_{(18,118)} = 1.905, p = 0.0215$). El análisis *post hoc* demostró que PHEN10 vs PHEN15, PHEN10 vs PHEN20 fueron significativamente diferentes ($p_s < 0.05$) (indicados con un + en Figura 21B, panel izquierdo) pero no así para los grupos de PHEN con su respectiva combinación (n.s.). Interesantemente, los grupos que mostraron mayor estereotipia fueron en el siguiente orden: PHEN20 > PHEN15 > PHEN10; estos grupos fueron los que reportaron menor actividad locomotora en ese mismo orden (PHEN20 < PHEN15 < PHEN10) (panel A).

Para los días 4-7 de tratamiento (B, panel derecho) se observó que los grupos de PHEN sola incrementaron la estereotipia: PHEN20=PHEN15>PHEN10 en comparación a los días 1-3. En la combinación PHEN10+5-HTP31 no disminuyó la estereotipia inducida por PHEN10, mientras que las combinaciones PHEN15+5-HTP31 y PHEN20+5-HTP31 disminuyeron el alto grado de estereotipia inducida por estas dosis (PHEN15 y PHEN20, respectivamente). El análisis estadístico para los días 4-7 marcaron una diferencia significativa entre los tratamientos: ANOVA-RM ($F_{(9,63)} = 46.412, p < 0.0001$), sin efecto entre los días ($F_{(9,3)} = 1.672, p = 0.1745$) y sin interacción entre los tratamientos x días ($F_{(27,189)} = 0.966, p = 0.5180$). Un análisis *post hoc* demostró una diferencia significativa entre PHEN10 vs PHEN15, PHEN10 vs PHEN20 (indicado con un +); PHEN15+5-HTP31 vs PHEN15 y PHEN20+5-HTP31 vs PHEN20 ($p_s < 0.05$) (indicado con un *). Estos datos nos revelan que, a través de los días de tratamiento, se exagera el grado de estereotipia inducida por PHEN sola de maneja dosis-dependiente, lo que provoca una menor actividad locomotora. Además, las combinaciones PHEN15+5-HTP31 y PHEN20+5-HTP31, son capaces de revertir la estereotipia inducida por PHEN15 y PHEN20, respectivamente, lo que conlleva a un incremento de la locomoción.

Con respecto al grupo PHEN15+5-HTP63, se observó que durante los primeros tres días de inyección el grado de estereotipia fue similar al grupo PHEN15+5-HTP31 y PHEN15, la cual no fue significativo estadísticamente (n.s.). Sin embargo, en los días 4-7 de tratamiento, el grupo PHEN15+5-HTP63 disminuyó el grado de estereotipia en comparación al grupo PHEN15+5-HTP31 y PHEN15 ($p_s < 0.01$). Como se pudo observar este grupo tuvo menor

locomoción durante los últimos días de tratamiento (4-7); además también mostraron menor estereotipia en comparación al grupo de PHEN15+5HTP31, lo que significa que la disminución de locomoción no fue por la estereotipia inducida por PHEN (e.g. PHEN20), más bien, que los animales permanecieron mayor parte del tiempo despiertos con muy poca conducta ambulatoria y estereotipia.

Estos resultados indican que, un incremento de DA inducida por PHEN genera hiperlocomoción a dosis bajas (con un pico máximo a 10 mg/Kg), mientras que a dosis altas provoca estereotipia e hipolocomoción. Bajo un incremento de 5-HT inducido por el 5-HTP, aunado a la liberación de DA en el cerebro por efecto de PHEN, fue suficiente para reducir los efectos psicomotores inducidos por PHEN sola.

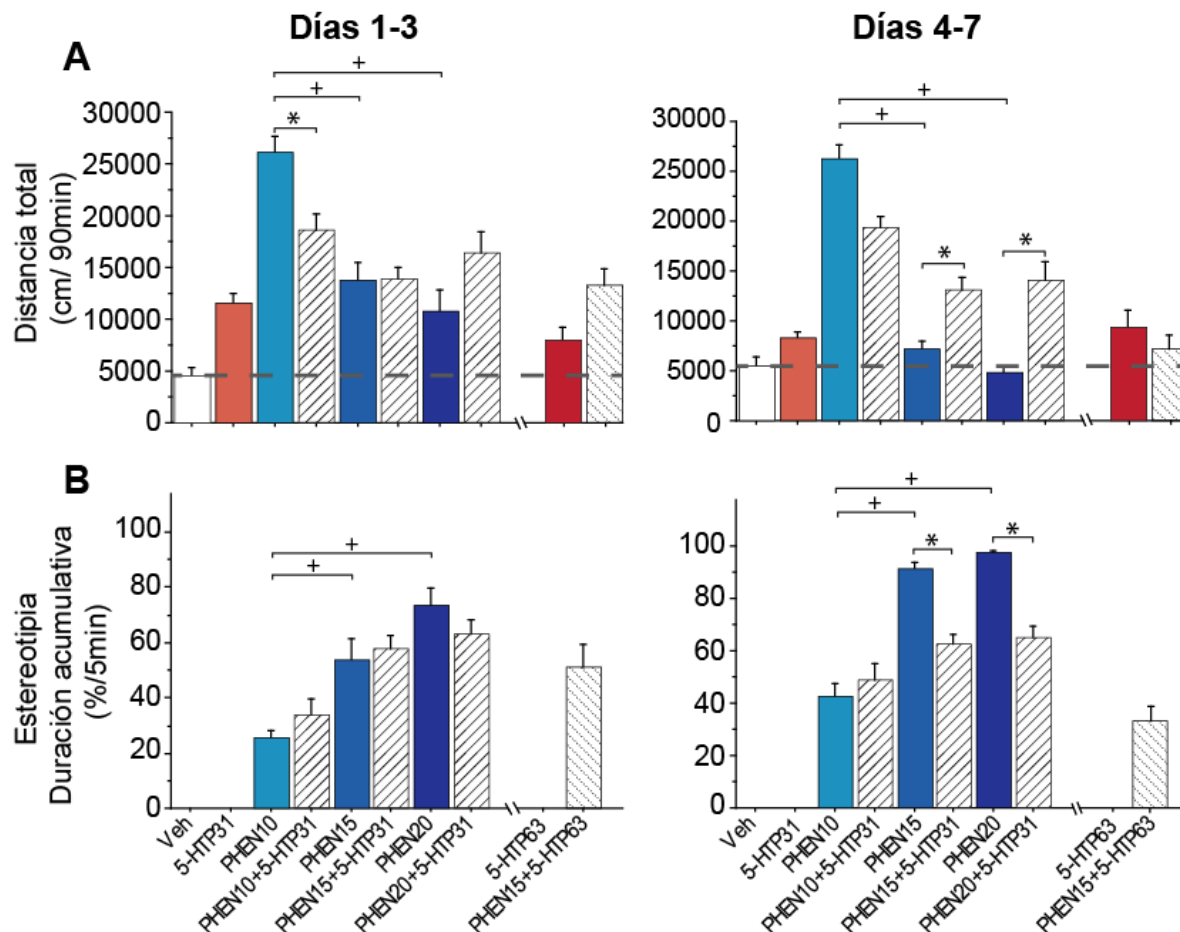


Figura 21. Efecto de PHEN sola y en combinación con el 5-HTP sobre la locomoción y estereotipia durante 7 días continuos de tratamiento. A) Gráfica de barras indicando la media de la distancia recorrida (cm) durante 90 minutos posteriores a la administración i.p. por cada tratamiento (indicado en el eje de las x). *Panel Izquierdo*, distancia recorrida durante los primeros días de tratamiento (días 1-3), la línea horizontal

discontinua en gris indica la distancia obtenida por el grupo control (Veh). Observe que el grupo PHEN10 tuvo mayor distancia en comparación a PHEN15 y PHEN20 (barras en tonos azules). El * indica diferencia significativa entre PHEN y su combinación ($p_s < 0.05$). La + indica diferencia significativa con respecto a PHEN10 ($p_s < 0.05$). El eje cortado en x indica otro set de experimentos, pero fueron graficados en la misma figura para su explicación, se utilizó una dosis para el 5-HTP de 63 mg/kg (5-HTP63) y la combinación de PHEN15+5-HTP63. *Panel derecho*, distancia recorrida durante los días 4-7, las acotaciones son las mismas que el panel izquierdo. B) Duración acumulativa de la estereotipia durante 5 minutos del conteo manual (60 min posteriores a la administración i.p. por cada tratamiento) utilizando el mismo set de animales analizados en A. Los grupos control (Veh), 5-HTP31 y 5-HTP63 no desarrollaron estereotipia (sin barras). *Panel izquierdo*, estereotipia durante los días 1-3 y *panel derecho*, durante los días 4-7. # indica diferencia significativa con respecto a la combinación PHEN15+5-HTP63 ($p_s < 0.01$).

8.4. Efecto de la inactivación de los receptores D1 (SCH) y D2 (RAC) en el NAcSh sobre los efectos farmacológicos inducidos por PHEN

Para identificar si los receptores dopaminérgicos en el NAcSh median los efectos farmacológicos inducidos por PHEN, se decidió administrar directamente en el NAcSh antagonistas de los receptores D1 y D2 bajo el efecto sistémico de PHEN (ver inciso 5.5.4). Tal como se observa en la Figura 22A, todos los animales recibieron dos inyecciones: una infusión de los antagonistas (D1r o D2r) o salina directamente en el NAcSh, así como una inyección i.p. de salina o PHEN20. En la Figura 22B (panel izquierdo), se grafica el cambio en el peso corporal durante los siete días de tratamiento. Como se puede observar, los grupos Sal+Sal (infusión en IntraNAcSh + i.p.), RAC+Sal y SCH+Sal mantuvieron una ganancia del peso corporal, sin marcar una diferencia significativa entre ellos (n.s.); lo que significa que el bloqueo de este tipo de receptores en el NAcSh *per se*, no afecta el peso corporal. Por otro lado, durante los 7 días de tratamiento, el grupo de Sal+PHEN20, generó una pérdida de peso, similar a lo reportado en los experimentos previos ($-5.119 \pm .65$ g). Los grupos de RAC+PHEN20 y SCH+PHEN20 disminuyeron la pérdida de peso inducida por PHEN sola (Sal+PHEN20). El análisis estadístico para los días del 1-7 marcaron una diferencia significativa entre los tratamientos: ANOVA-RM ($F_{(5,12)} = 13.672, p < 0.0001$), con un efecto entre los días ($F_{(5,6)} = 55.2, p < 0.0001$), pero sin interacción entre los tratamientos x días ($F_{(30,72)} = 1.087, p = 0.377$). Un análisis *post hoc* demostró una diferencia significativa entre Sal+PHEN20 vs RAC+PHEN20, Sal+PHEN20 vs SCH+PHEN20 ($p_s < 0.05$). Con respecto a la ingesta de alimento (panel derecho), se observó una disminución en el consumo de alimento para los grupos de RAC+PHEN20, SCH+PHEN20 y Sal+PHEN20 durante los primeros días de tratamiento, mientras que los días posteriores el consumo de alimento se fue

incrementando, indicando el desarrollo de tolerancia a los tratamientos. El análisis estadístico para los días 1-7 mostró una diferencia significativa entre los tratamientos: ANOVA-RM ($F_{(5,12)} = 4.792, p < 0.05$), con efecto entre los días ($F_{(5,6)} = 29.891, p < 0.0001$), con interacción entre los tratamientos x días ($F_{(30,72)} = 5.96, p < 0.0001$). A pesar de que no hubo diferencias significativas entre los grupos Sal+PHEN20, SCH+PHEN20 y RAC+PHEN20, se observó una tendencia de estos en atenuar el consumo de alimento en los días 2 y 3 inducida por PHEN (n.s.). Estos resultados revelan que el efecto de PHEN sobre la pérdida de peso es atenuado por la inhibición de los receptores dopaminérgicos D1r y D2r. En la Figura 22C, se observa la locomoción inducida por la Sal+PHEN y los antagonistas dopaminérgicos en el NAcSh. En el panel izquierdo, se observa la distancia durante los primeros días de tratamiento (días 1-3). Tanto los grupos Sal+Sal, RAC+Sal, SCH+Sal generaron bajos niveles de locomoción, lo que indica que la inactivación de estos receptores en NAcSh no altera la locomoción de los animales. El grupo de Sal+PHEN20 fue el grupo que más locomoción generó (11051.387 ± 836.83 cm): Los grupos de RAC+PHEN20 y SCH+PHEN20 disminuyeron la locomoción inducida por Sal+PHEN20. El análisis estadístico para los días 1-3 marcaron una diferencia significativa entre los tratamientos: ANOVA-RM ($F_{(5,12)} = 4.895, p < 0.05$), sin efecto entre los días ($F_{(5,2)} = 1.458, p = .2527$), y sin interacción entre los tratamientos x días ($F_{(10,24)} = 2.236, p = 0.0517$). El análisis *post hoc* indicó diferencias significativas entre el grupo Sal+PHEN20 vs RAC+PHEN20 y Sal+PHEN20 vs SCH+PHEN20 ($p_s < 0.05$) (indicado con un asterisco en el panel izquierdo). Durante los días 4-7, los grupos Sal+Sal, RAC+Sal, SCH+Sal mantuvieron valores bajos de locomoción comparado con Sal+PHEN20; además, se observó que Sal+PHEN20 disminuyó la locomoción (5213.113 ± 598.48 cm) en comparación a los días 1-3. Tanto los grupos RAC+PHEN20 y SCH+PHEN20 mantuvieron niveles bajos de locomoción. El análisis estadístico para los días 4-7 indicaron una diferencia significativa entre los tratamientos: ANOVA-RM ($F_{(5,12)} = 5.257, p < 0.05$), con efecto entre los días ($F_{(5,3)} = 5.614, p < 0.01$), sin interacción entre los tratamientos x días ($F_{(15,36)} = 1.635, p = 0.1125$). Los grupos Sal+PHEN20 vs RAC+PHEN20 y Sal+PHEN20 vs SCH+PHEN20 fueron significativamente diferentes ($p_s < 0.05$).

Con respecto a la estereotipia, en la Figura 22D, los grupos de Sal+Sal, RAC+Sal y SCH+Sal, no generaron ninguna estereotipia (sin barras en la gráfica). El grupo de Sal+PHEN20 es el

que más grado de estereotipia generó a través de los días (mismos datos fueron encontrados en experimentos anteriores, ver Figura 21). En el panel izquierdo se graficó la estereotipia durante los primeros días de tratamiento (días 1-3). El grupo Sal+PHEN20 indujo mayor estereotipia en comparación a los grupos RAC+PHEN20 y SCH+PHEN20; lo que indica que estos grupos tuvieron la capacidad de revertir la estereotipia inducida por Sal+PHEN20. El análisis *post hoc* indicó diferencia significativa entre los grupos de Sal+PHEN20 vs RAC+PHEN20 y Sal+PHEN20 vs SCH+PHEN20 ($p_s < 0.05$). En esta misma figura, pero en el panel derecho, se graficó la estereotipia inducida durante los días 4-7. Se encontró que la estereotipia inducida por Sal+PHEN20 fue cercana al 85% y esta se vio revertida completamente con los grupos RAC+PHEN20 y SCH+PHEN20. Un análisis *post hoc* indicó diferencia significativa entre Sal+PHEN20 vs RAC+PHEN20 y Sal+PHEN20 vs SCH+PHEN20 ($p_s < 0.05$) (indicado en la figura con un *). El grupo de Sal+PHEN20, tuvo una disminución de la locomoción e incrementó la estereotipia a través de los días. Interesantemente, al bloquear los receptores dopaminérgicos D1 y D2, las ratas disminuyen la locomoción y la estereotipia inducida por PHEN sola. Estos datos sugieren que la locomoción y la estereotipia inducida por PHEN fueron mediados a través de la activación de los receptores D1r y D2r expresados en el NAcSh.

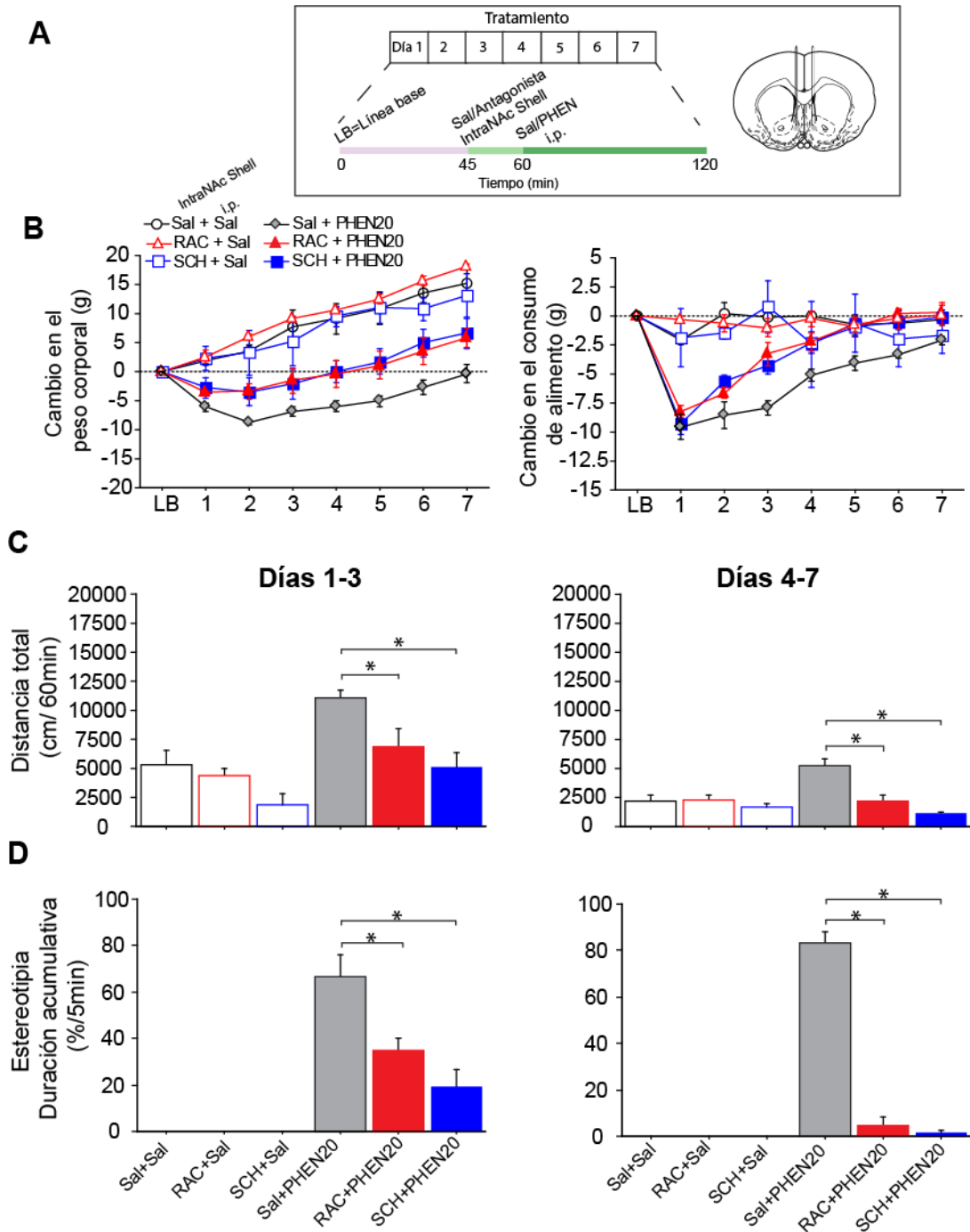


Figura 22. Infusiones de los antagonistas dopaminérgicos SCH23390 (D1r, SCH) y raclopride (D2r, RAC) en el NAcSh bajo el efecto de la administración periférica de PHEN durante un tratamiento de 7 días continuos. A) Diseño experimental, en el cual cada rata era colocada en una caja de campo abierto durante 45 min para registrar su locomoción (LB, línea base), a los 45 min se administraba mediante una cánula en NAcSh (Sal, SCH o RAC) y a los 60 minutos una inyección i.p. de PHEN o salina. La imagen derecha es un corte coronal de cerebro de rata donde indica la zona donde fueron inyectados los antagonistas. B) Cambio en el peso

corporal (*panel izquierdo*) y consumo de alimento (*panel derecho*) durante los 7 días continuos de tratamiento. Cada punto indica la media \pm SEM a partir de la normalización al día previo de inyección (LB). C) Efecto de la locomoción durante los primeros días de inyección (días 1-3, *panel izquierdo*) y los días posteriores (4-7, *panel derecho*). * $p < 0.05$ con respecto a Sal+PHEN20. D) Duración acumulativa de la estereotipia durante 5 minutos del conteo manual (45 min posteriores a la administración i.p. por cada tratamiento) utilizando el mismo set de animales analizados en A. Los grupos Sal+Sal, RAC+Sal y SCH+Sal no mostraron estereotipia (sin barras).

8.5. PHEN modula la actividad neuronal del NAcSh

Además de realizar estudios conductuales, se realizaron registros electrofisiológicos en ratas en libre movimiento para evaluar las respuestas neuronales en el NAcSh bajo el efecto de PHEN sola o en combinación con 5-HTP.

Los procedimientos para registrar la actividad neuronal se llevaron a cabo en la fase de luz para los animales (ver inciso 5.5.5). En el caso de PHEN sola el procedimiento fue un periodo de línea base, en el cual el animal no tuvo ninguna inyección. Pasado 1 h, el animal recibió una inyección de solución salina y 1 h después la infusión de PHEN15. En el caso del 5-HTP, tuvo un tiempo de línea base, pasado 1 h se le infundió vehículo (Veh), 30 minutos después se le infundió CB (75 mg/kg) y 30 minutos más tarde, se le administró el 5-HTP31 o 5-HTP63. En el caso de la combinación de PHEN15+5-HTP, fue el mismo protocolo que el anterior, a excepción que a las 2 horas se administró simultáneamente PHEN15+5-HTP a dosis de 31 ó 63 mg/kg. Todos los registros fueron finalizados después de 3 horas de registro continuo. En la Figura 23, se muestra la modulación de la actividad neuronal unitaria normalizada al periodo de línea base (un total de $n=514$ neuronas) bajo los diferentes tratamientos. Se identificaron dos tipos de modulaciones: neuronas que disminuyeron su actividad neuronal bajo el efecto de los tratamientos (inhibición, indicado en tonos azules) y aquellas neuronas que incrementaron la actividad neuronal bajo el efecto del tratamiento (activación, color rojo). En la Figura 23, se observa la actividad neuronal unitaria de 514 neuronas moduladas (514/696) registradas en el NAcSh durante los 7 días de administración de los fármacos. Como se observa en la figura, el NAcSh fue fuertemente inhibido bajo el efecto de PHEN15 (inhibición: 73%, 131/179 de las neuronas registradas), mientras que un 13% mostró una activación neuronal (24/179) ($X^2_{(1)} = 30.62$, $p < 0.0001$). En el caso de 5-HTP31, indujo el mismo porcentaje de inhibición (inhibición: 19%, 25/130) con respecto a la

activación (activación: 21%, 28/130) ($X^2_{(1)} = 0.083, p = 0.77$). Datos similares se encontraron con la dosis de 5-HTP63, con un porcentaje de inhibición de 30% (26/86) y de activación del 24% (21/86). La dosis de PHEN15+5-HTP31 generó un 63% (72/114) de inhibición neuronal y de activación de 16% (19/114), mientras que la combinación PHEN15+5-HTP63 tuvo un porcentaje de inhibición de 77% (145/187) y de activación del 12% (23/187). Como se puede observar en la Figura 23, PHEN15 indujo una inhibición en la actividad poblacional, similar a la combinación de PHEN15+5-HTP31 ($X^2_{(1)} = 0.43, p = 0.51$). Datos semejantes se obtuvieron al comparar PHEN15 y PHEN15+5-HTP63 ($X^2_{(1)} = 0.06, p = 0.8$). Tanto 5-HTP31 y 5-HTP63 generaron un mayor porcentaje de activación (21 y 24%, respectivamente) en comparación a PHEN15, pero sin marcar una diferencia significativa. Estos resultados indican que, a nivel poblacional, la co-administración de 5-HTP no modificó la inhibición neuronal inducida por PHEN. Además, el 5-HTP “*per se*” también moduló, pero en menor porcentaje a las neuronas del NAcSh.

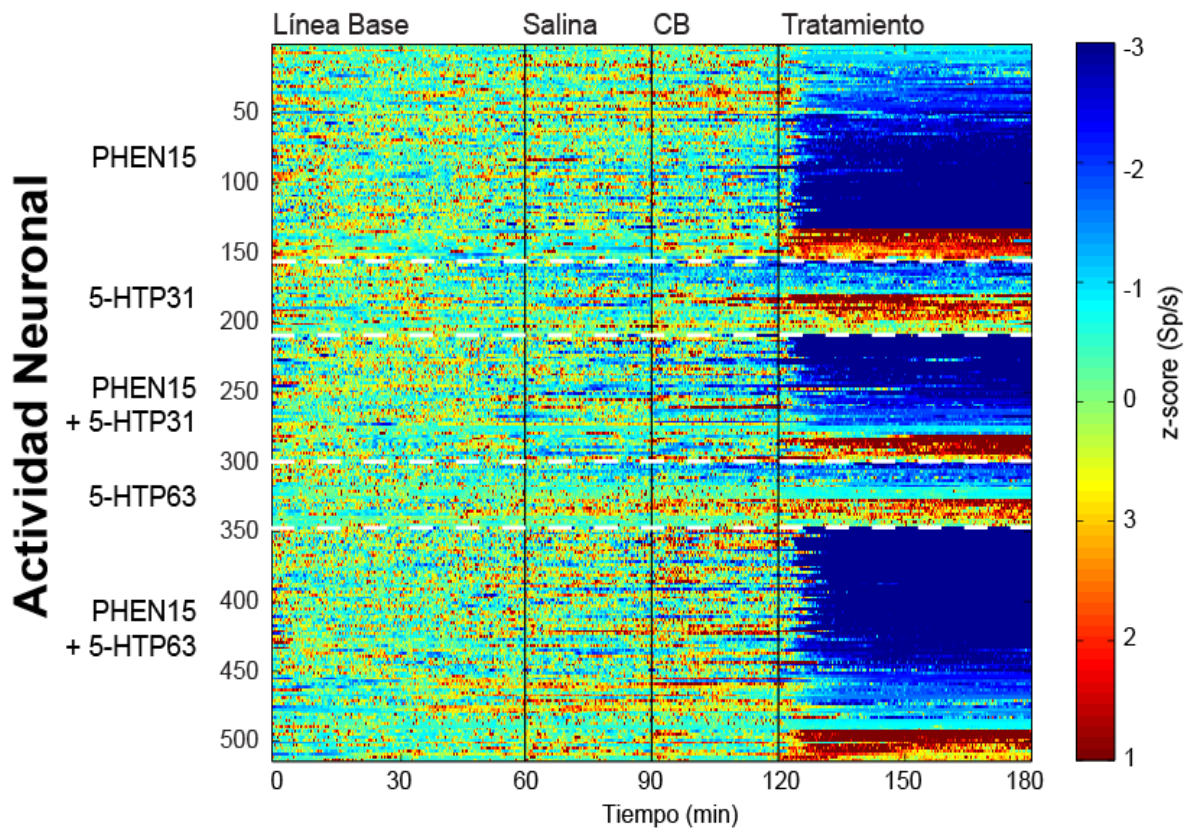


Figura 23. Actividad poblacional unitaria de 514 neuronas moduladas (de 696 neuronas registradas) durante el periodo de línea base, salina, carbidopa (CB) y tratamiento (PHEN y/o 5-HTP). Se grafica la actividad neuronal unitaria extracelular con una respuesta significativa (número de neuronas, *eje y*) y normalizada a su valor de *z-score* durante el periodo de línea base y representada en un código de colores (barra de colores indicada en la parte derecha) a través de un histograma peri-estimulo (3 horas) (*eje x*). Colores fríos indican una inhibición en la actividad neuronal, mientras que colores cálidos una activación. Cada línea vertical de color negro indica el momento de la administración de los fármacos, mientras que las líneas discontinuas blancas separan la población neuronal por cada tratamiento (indicado de lado izquierdo).

Debido que a nivel conductual se observó que tras un tratamiento continuo de PHEN y PHEN+5-HTP generan cambios en el peso corporal, locomoción y estereotipia (Figura 20 y Figura 21), se decidió evaluar si las modulaciones observadas en el NAcSh tienen una correlación con los datos conductuales obtenidos. Para ello, los datos obtenidos en la Figura 23, fueron analizados durante los primeros 3 días de tratamiento (días 1-3) y los siguientes cuatro días de tratamiento (días 4-7). En la siguiente gráfica (Figura 24A), se graficó el cambio en el peso corporal de los tratamientos durante los 7 días continuos de registros electrofisiológicos, así como el porcentaje en el consumo de alimento. Se observó que durante los primeros 3 días de tratamiento (panel A, indicado en sombra gris) la pérdida de

peso para PHEN15 fue de $-2.93 \pm .9$ g; para el 5-HTP31 fue de $-8.88 \pm .75$ g; 5-HTP63 fue de -15.11 ± 1.77 g y ambas combinaciones, PHEN15+5-HTP31 y PHEN15+5-HTP63, provocaron mayor pérdida de peso en comparación a los fármacos solos (-17.58 ± 1.6 y -19.44 ± 1.51 , respectivamente), a excepción de la dosis 5-HTP63 durante los primeros 2 días. El análisis estadístico durante los primeros días de inyección (1-3) mostraron una diferencia significativa entre los tratamientos: ANOVA-RM ($F_{(4,11)} = 10.99$, $p < 0.001$), un efecto entre los días ($F_{(4,2)} = 12.147$, $p < 0.001$), sin interacción entre los tratamientos x días ($F_{(8,22)} = 2.32$, $p = 0.055$). Un análisis *post hoc* demostró diferencias significativas entre PHEN15 vs PHEN15+5-HTP31 y PHEN15 vs PHEN15+5-HTP63 ($p_s < 0.001$). En el caso de los 4 días posteriores al tratamiento (indicado en sombra rosa), se observó que la combinación PHEN15+5-HTP31 y PHEN15+5-HTP63, mantuvieron la pérdida de peso por debajo de lo obtenido con los fármacos solos, mientras que los grupos PHEN15, 5-HTP31 y 5-HTP63 fueron disminuyendo paulatinamente la pérdida de peso (indicando un efecto de tolerancia). El análisis estadístico durante los 4 días posteriores de inyección mostró una diferencia significativa entre los tratamientos: ANOVA-RM ($F_{(4,11)} = 42.8$, $p < 0.0001$), un efecto entre los días ($F_{(4,3)} = 13.35$, $p < 0.0001$), sin interacción entre los tratamientos x días ($F_{(12,33)} = 0.92$, $p = 0.53$). Un análisis *post hoc* demostró diferencias significativas entre PHEN15 vs PHEN15+5-HTP31 y PHEN15 vs PHEN15+5-HTP63 ($p_s < 0.0001$). Estos resultados indican que la combinación PHEN15+5-HTP31 y PHEN15+5HTP63 son capaces de potencializar los efectos de pérdida de peso inducida por PHEN y el 5-HTP (datos similares fueron encontrados en experimentos conductuales previos, ver Figura 20).

Con respecto al consumo de alimento, se observó que durante los primeros 3 días, cada tratamiento indujo una disminución en la ingesta de alimento chow, la cual se va acercando al 100% a través de los días (Panel A, derecha). El análisis estadístico durante los primeros 3 días de inyección (recuadro gris) mostró una diferencia significativa entre los tratamientos: ANOVA-RM ($F_{(4,11)} = 4.8$, $p < 0.05$), un efecto entre los días ($F_{(4,2)} = 13.35$, $p < 0.001$), sin interacción entre los tratamientos x días ($F_{(8,22)} = 0.92$, $p = 0.08$). Un análisis *post hoc* demostró diferencia significativa entre PHEN15 vs PHEN15+5-HTP31 y PHEN15 vs PHEN15+5-HTP63 ($p_s < 0.05$). Para los 4 días posteriores (recuadro rosa), se observó que los tratamientos dejaron de inducir una reducción en el consumo de alimento chow, mostrando un incremento

en el consumo de manera monotónica. El análisis estadístico durante los 4 días posteriores de inyección mostró una diferencia significativa entre los tratamientos: ANOVA-RM ($F_{(4,11)} = 3.49$, $p < 0.05$), un efecto entre los días ($F_{(4,3)} = 3.83$, $p < 0.05$), sin interacción entre los tratamientos x días ($F_{(12,33)} = 0.27$, $p = .99$). Un análisis *post hoc* demostró diferencias significativas entre PHEN15 vs PHEN15+5-HTP63 ($p < 0.05$). Con estos resultados, se observó que la utilización del 5-HTP induce una mayor disminución en el consumo de alimento inducida por PHEN, lo que indica que la combinación de 5-HTP más PHEN potencializa el efecto anorexigénico de estos supresores del apetito en los animales en que registramos la actividad del NAcSh.

En el panel B, se grafica el *z-score* de la frecuencia de disparo poblacional normalizada al periodo de línea base, bajo el efecto de salina, CB y de PHEN sola o en combinación con 5-HTP. Durante los primeros 3 días de tratamiento (panel B, *izquierda*), encontramos que tras la inyección del 5-HTP31 y 5-HTP63, no generaron un desbalance (inhibición/activación) en la actividad poblacional del NAcSh con respecto al periodo de línea base y durante los primeros 40 minutos después de inyectar el fármaco (ver periodo de línea base y tratamiento). En contraste, el grupo de PHEN15 provocó un mayor desbalance inhibitorio con respecto a la combinación PHEN15+5-HTP31 ($X^2_{(1)} = 813$, $p < 0.001$). Además, la magnitud de la inhibición poblacional inducida por PHEN15, fue aún más marcada bajo el efecto de PHEN15+5-HTP63 ($X^2_{(1)} = 2823$, $p < 0.0001$). Estos resultados indican que el 5-HTP es capaz de afectar el desbalance inhibitorio inducido por PHEN sola, lo cual indica un cambio sinérgico de la actividad neuronal inducida tanto por la liberación de DA (debido a PHEN) y de 5-HT (debido al 5-HTP).

Durante los 4 días posteriores, se observó que la dosis de 5-HTP63 generó un desbalance inhibitorio en la actividad poblacional del NAcSh, la cual no fue observada durante los primeros tres días de tratamiento ($X^2_{(1)} = 4622$, $p < 0.001$) (Figura 24B, línea de color verde claro). Este resultado puede indicar que, tras un tratamiento continuo, el componente serotoninérgico *per se*, y sólo a dosis altas, puede afectar la actividad poblacional del NAcSh. Con respecto a PHEN15, se encontró que incrementó el grado en la magnitud de la inhibición en comparación a los primeros 3 días y además, mantuvo el desbalance inhibitorio en la actividad neuronal por debajo de la combinación PHEN15+5-HTP31 ($X^2_{(1)} = 1067$, $p < 0.001$).

Este resultado puede indicar que, tras un tratamiento crónico de la combinación, se genera una tolerancia a PHEN (debido a que disminuye la actividad poblacional del NAcSh entre los días 1-3 y 4-7) y que, la co-administración del 5-HTP (a dosis de 31 mg/kg) puede estar atenuando el efecto de tolerancia inducida por PHEN. Interesantemente, la dosis de PHEN15+5-HTP63 mantuvo el grado de inhibición durante los siete días de tratamiento (días 1-3 y 4-7). Estos datos indican que a una dosis mayor de 5-HTP (63 mg/kg) más PHEN (15 mg/kg), el componente serotoninérgico fue capaz de inducir un efecto sinérgico en el efecto inhibitorio inducida por PHEN.

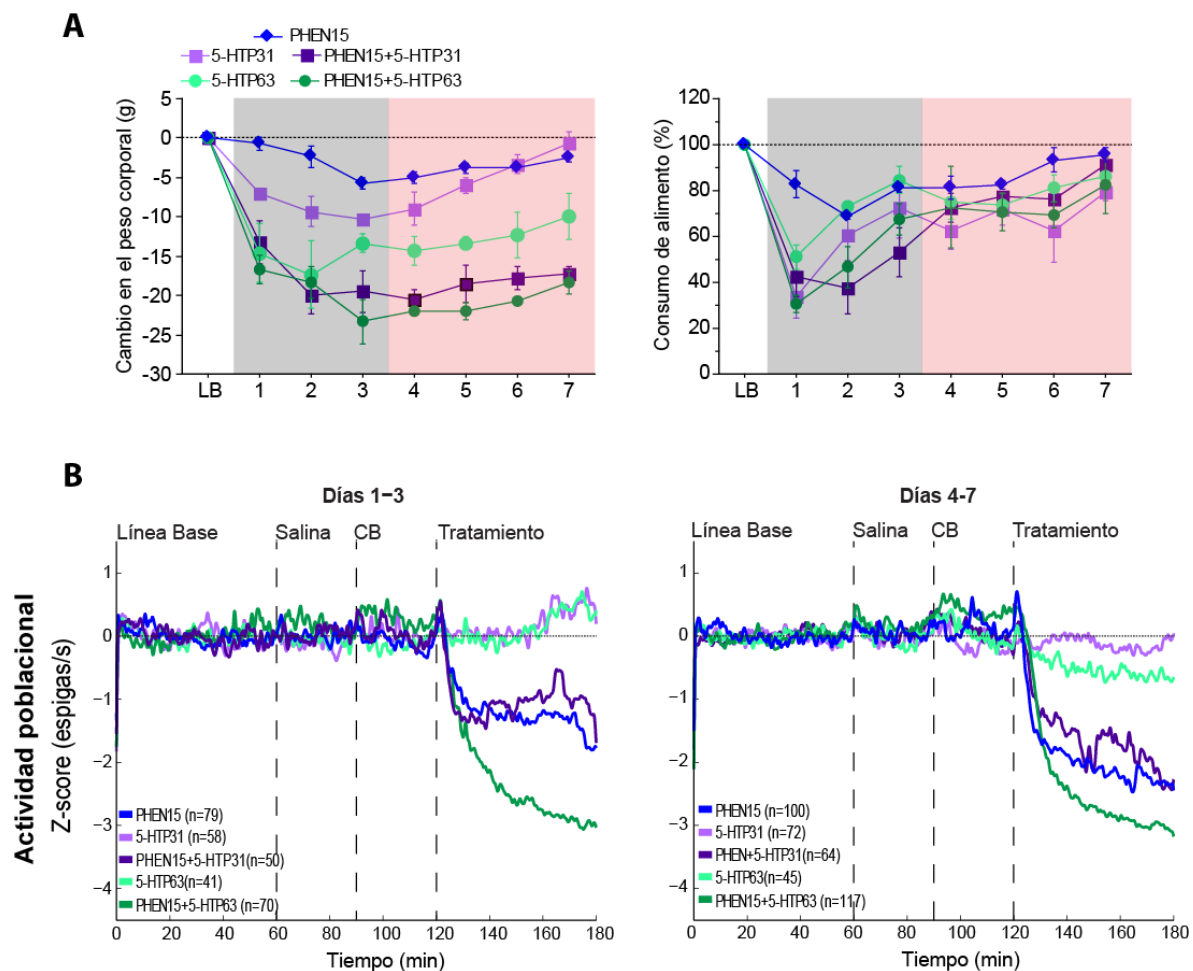


Figura 24. Cambios en la conducta alimenticia y en la actividad poblacional del NAcSh durante el tratamiento de PHEN solo o en combinación con 5-HTP. A) Cambio en el peso corporal (*izquierda*) e ingesta de alimento (*derecha*) durante 7 días continuos de tratamiento. Cada punto indica la media \pm SEM a partir de la normalización al día previo de la primera inyección (LB). B) Actividad neuronal poblacional a través de las 3 horas (línea base, salina, CB y tratamiento) de registro durante los primeros días (días 1-3, *panel izquierdo*) y los 4 días posteriores (días 4-7, *panel derecho*). En el recuadro izquierdo e inferior se identifica cada tratamiento por un color, indicado entre paréntesis el número de neuronas analizadas. Las líneas negras verticales discontinuas indican el momento de infusión para cada tratamiento.

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN (segundo objetivo)

El segundo objetivo de esta tesis fue caracterizar conductualmente y neuronalmente la eficacia de una nueva combinación farmacológica para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad. Estudios previos en humanos, han revelado que PHEN produce pérdida de peso (Wilbert et al. 2011; Hampp et al. 2013). Además, estos hallazgos han sido demostrados también en roedores, en donde el uso de PHEN a dosis de 20 mg/kg inducen pérdida de peso, disminución en el consumo de alimento, aunado a la presencia de estereotipia y locomoción (Kalyanasundar et al. 2015). Por otro lado, se ha demostrado que el 5-HTP también induce pérdida de peso (Amer et al. 2004; Halford et al. 2005), además de no inducir conductas ambulatorias (Bendotti et al. 1980). Sin embargo, no se había probado si la combinación de ambos fármacos podría potenciar sus efectos benéficos en la pérdida de peso y ser utilizado como un nuevo tratamiento para la obesidad. En esta tesis se encontró que la combinación de PHEN (15 mg/kg) más 5-HTP (31 mg/kg) potencializa la pérdida de peso y consumo de alimento en comparación a los fármacos solos, además que atenúa el efecto de tolerancia inducida por los fármacos solos, así como disminuye los efectos secundarios de locomoción y estereotipia inducidos por PHEN. Además, encontramos que tras una inactivación de los D1r y D2r expresados en el NAcSh, la pérdida de peso y locomoción inducida por PHEN fueron atenuados, revelando que los efectos farmacológicos de este supresor del apetito dependen principalmente de la activación dopaminérgica de los receptores D1 y D2 expresados en el NAcSh. Los registros electrofisiológicos en el NAcSh mostraron que el 5-HTP a una dosis de 31 mg/kg, atenuó ligeramente el efecto inhibitorio inducido por PHEN (Figura 24B). A nivel conductual, estos resultados indican que, el componente serotoninérgico tiene la habilidad de potencializar los efectos anorexigénicos y de reducir los efectos psicomotores inducidos por PHEN, pero a nivel de la actividad poblacional del NAcSh se pudo demostrar que la coadministración de PHEN más 5-HTP no afecta drásticamente la capacidad de PHEN para inhibir a las neuronas del NAcSh (Kalyanasundar et al. 2015), lo que podría explicar porque ambos fármacos pueden mostrar una potenciación farmacológica.

También demostramos que el 5-HTP a una dosis alta (63 mg/kg) co-administrado con PHEN, potencializa la inhibición inducida en el NAcSh a pesar de que en esta dosis los animales mostraron menos efectos psicomotores y mostraron un efecto techo en la pérdida de peso. Estos datos demuestran por primera vez que a nivel de la actividad del NAcSh, el 5-HTP63 más PHEN15 induce un efecto sinérgico inhibitorio de la actividad poblacional del NAcSh.

Mecanismos conductuales de PHEN y el 5-HTP sobre la conducta alimenticia y su tolerancia

Se ha reportado que la anfetamina retrasa el inicio del consumo de alimento e incrementa la demora entre cada una de las comidas (Blundell et al. 1976). Estudios por (Kalyanasundar et al. 2015)), demostraron que PHEN (un análogo de la anfetamina) induce pérdida de peso, disminuye el consumo de alimento, además de que genera un desbalance inhibitorio en la actividad neuronal del NAcSh. Los resultados encontrados en este trabajo revelaron datos similares a los encontrados anteriormente. Además, se observó que, a través de los días de administración, hubo un efecto de tolerancia a PHEN, lo que fue generando que las ratas poco a poco fueran perdiendo menos peso, así como consumiendo más comida (Figura 20). Estos resultados son similares a los encontrados por otros autores que indicaron un desarrollo de tolerancia de este fármaco en humanos (Fernstrom and Choi 2008). A pesar de que el desarrollo de tolerancia es en diferente escala de tiempo entre los humanos (meses) y en ratas (días), los patrones de tolerancia son similares. Por ejemplo, en humanos, el uso de DEP (análogo a la anfetamina) después de un tratamiento de 5-6 meses, se observó que la pérdida de peso fue cada vez menor en comparación a los primeros meses (Cercato et al. 2009). Por otro lado, existen una serie de estudios que demuestran la implicación de la 5-HT con la hipofagia, tanto en humanos como en roedores. Reportes indican que un incremento de 5-HT en el cerebro, ya sea mediante el uso de triptófano (precursor de la 5-HT) o 5-HTP, induce una reducción en el consumo de alimento en roedores (Bray and York 1972). En ratas se ha demostrado una correlación positiva entre los niveles altos de triptófano y la anorexia (Cangiano et al. 1994) mientras que, en ratas obesas con resistencia a leptina, se ha observado bajos niveles de 5-HT en comparación con ratas normales (Meguid et al. 2000). Nuestros resultados demostraron que tras una administración de 5-HTP (ya sea a dosis de 31 o 63 mg/kg) provocó un efecto anorexigénico, debido a un incremento de 5-HT (aun mayor con la coadministración de carbidopa) en el cerebro. Además, nuestros resultados demostraron

que, al combinar dos fármacos, por un lado, PHEN (que incrementa DA y NE) y por otro lado, el 5-HTP (que incrementa 5-HT) ejercieron una pérdida de peso y consumo de alimento mayor en comparación a los fármacos solos, lo que indica que esta combinación puede ser una nueva opción para combatir a la obesidad.

La fentermina, dopamina y sus efectos psicomotores

La locomoción involucra cualquier tipo de desplazamiento y movimientos no repetitivos, mientras que la estereotipia genera patrones repetitivos de movimiento sin una función aparente (“Licking, head swinging”) (Antoniou et al. 1998). Nuestros resultados demostraron que PHEN induce locomoción y estereotipia, las cuales son dependientes de la dosis utilizada, e.g. la locomoción fue mayor a dosis bajas (PHEN10>PHEN15>PHEN20), mientras que dosis altas la disminuyen porque inducen estereotipia. Reportes indican que la anfetamina y los fármacos análogos a este, tienen un efecto similar (DEP, bupropión) (Kalyanasundar et al. 2016). Por ejemplo, la anfetamina induce una mayor actividad motora a dosis bajas, mientras que a dosis altas genera hipolocomoción porque los animales se enganchan en conductas de estereotipia (Sharp, T et al. 1987; Antoniou et al. 1998). Estas conductas psicomotoras inducidas por la anfetamina presentes en roedores están estrechamente relacionadas con una liberación de DA en el cerebro (Fibiger et al. 1973; Antoniou et al. 1998; Daberkow et al. 2013). Existe una amplia evidencia que involucra a la DA en funciones motoras, así como en la conducta alimenticia (Szczycka et al. 1999; Kalyanasundar et al. 2015). Por ejemplo, se ha demostrado que la anfetamina estimula la locomoción en roedores tras una liberación de DA a partir de las terminales dopaminérgicas, principalmente en el NAcSh (Fibiger et al. 1973; Szczycka et al. 1999; Daberkow et al. 2013). Un incremento de la locomoción se ha correlacionado con un incremento de liberación de DA en el NAcSh, usando dosis bajas de anfetamina (0.5-2 mg/kg). Sin embargo, a dosis altas de anfetamina (>2 mg/kg) la locomoción se disminuye y la estereotipia se incrementa (Sharp, T et al. 1987). Tras una administración continua de PHEN, se encontró que durante los primeros 3 días de administración, la locomoción era más fuerte que la estereotipia, mientras que, a los 4 días posteriores esta relación se revierte. Estos resultados pueden deberse a que, tras una liberación continua de DA en el cerebro, se genera una sensibilidad en el sistema dopaminérgico, la cual podría desencadenar un cambio plástico que genera un

aumento de estereotipia a través de los días. Numerosos estudios han demostrado que tras repetidas administraciones sistémicas de anfetamina, incrementa la sensibilización de conductas locomotoras (Vezina and Stewart 1989; Vanderschuren and Kalivas 2000); además, se ha reportado un incremento en la liberación de DA inducida por la anfetamina *in vitro* (Uretsky 1985).

Datos reportados por (Kalyanasundar et al. 2015)), demostraron que el DEP atenuaba sus efectos psicomotores debido a la inactivación de los receptores D1r y D2r expresados en el NAcSh. Sin embargo, era interesante saber si PHEN (análogo a la anfetamina) también era afectado por estos mismos receptores. Nuestros resultados demostraron que al bloquear los receptores D1r y D2r en el NAcSh, se atenuaba los efectos psicomotores inducidos por PHEN. De acuerdo a estos resultados, varios estudios farmacológicos han relacionado a los receptores dopaminérgicos con fármacos que inducen locomoción y estados de vigilia, e.g. la locomoción inducida por la anfetamina (Sharp, T et al. 1987) o la vigilia (Qu et al. 2008) inducida por el modafinilo (fármaco no-anfetamínico prescrito para trastornos de sueño) han sido atenuados tras bloquear a los receptores D1 y D2. De hecho, se ha reportado que tras la inactivación de los receptores D1r, se genera un retardo en el inicio de la locomoción y estereotipia, lo que sugiere que estos receptores están implicados en esta conducta (Szczytpka et al. 1999). Datos similares han sido encontrados al inyectar un agonista a D2r en NAcSh, lo que indica que la activación de estos receptores son necesarios para la expresión de la locomoción (Dreher and Jackson 1989).

Interacción de dopamina y serotonina en NAcSh.

El NAc recibe inervaciones serotoninérgicas del núcleo del ráfe, así como de DA del VTA (Levitt and Moore 1978; Vertes and Martin 1988). Nuestros resultados indicaron que la combinación del 5-HTP a dosis de 31 mg/kg más PHEN atenuó el efecto inhibitorio de la población neuronal inducida por PHEN. Los efectos neuroquímicos acerca de cómo esta combinación funciona es complicada. Estudios previos han indicado que al combinar el 5-HTP (más carbidopa) aunado a la anfetamina, se incrementaban los niveles de 5-HT, así como de DA a nivel del NAc (Baumann et al. 2011), lo que indica que la combinación generó

un sinergismo en la liberación de 5-HT, ya que la combinación provocó una liberación de 5-HT 30 veces más en comparación al 5-HTP solo, aunado a un incremento de DA 20 veces más que la evocada por PHEN sola, además de presentar menos locomoción durante la combinación. Estos resultados indican que la 5-HT ejerce un efecto sobre la liberación de DA. Además, existen una serie de receptores serotoninérgicos que pueden estar relacionado a estas condiciones, pero los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2C}, son buenos candidatos (Bubar and Cunningham 2006). Estudios por (Yan and Yan 2001), indican un incremento de DA en el NAcSh tras una administración de un agonista a receptores 5-HT_{1B/1D} en el NAc. Además, se ha reportado que un antagonista al receptor 5-HT_{2C}, ejerce un efecto inhibitorio en la liberación de DA, además de que reducen los efectos de locomoción inducidos por fármacos estimulantes (e.g. metanfetaminas, cocaína) (Di Matteo et al. 1998). Estudios por (Bankson and Cunningham 2002) indican que la expresión de los receptores 5-HT_{2C} (Eberle-Wang et al. 1997), así como 5-HT_{1B} (Bruinvels et al. 1994) se encuentran en las terminales de las neuronas GABAérgicas, pero no en neuronas dopaminérgicas dentro de la sustancia nigra y el VTA. Esto quiere decir que, la activación de los receptores 5-HT_{1B} en las neuronas GABAérgicas que proyectan hacia VTA producen una inhibición en la liberación de GABA, resultando una desinhibición en las neuronas dopaminérgicas, lo que podría provocar un incremento de DA en el NAcSh.

En resumen, en este segundo objetivo de la tesis demostramos que la co-administración de PHEN más el 5-HTP potencian el efecto anorexigénico, además de que reducen los efectos motores inducidos por PHEN sola, pero a nivel de la actividad poblacional del NAcSh, se encontró que la combinación no afecta la capacidad de PHEN para inhibir a las neuronas del NAcSh. Aunado a esto, encontramos que los D1r y D2r expresados en NAcSh median el mecanismo de acción de supresores del apetito, e.g. PHEN. Estos datos soportan la posibilidad de utilizar esta combinación como un nuevo tratamiento para el control de la obesidad y sobrepeso.

10. CONCLUSIÓN GENERAL

Los fármacos supresores del apetito ayudan a perder peso a pacientes con obesidad y sobrepeso, debido a que, al no tratarse adecuadamente puede desencadenar otras enfermedades, como diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares. Por este motivo es importante desarrollar nuevas alternativas para disminuir esta problemática, además de comprender el horario en que se requiere ser prescrito para aprovechar su efecto anorexigénico. En esta tesis, reportamos que la administración de DEP al inicio de la mañana es la mejor opción para evitar problemas de insomnio u otros trastornos de la alimentación, así como aumentar su efecto terapéutico. Por otro lado, reportamos por primera vez que al co-administrar PHEN y 5-HTP/carbidopa (fármacos que actúan con diferentes mecanismos de acción) incrementó la pérdida de peso y redujo la ingesta de alimento, así como aminoró los efectos adversos inducidos por la PHEN en ratas. Estos resultados indican que, a nivel preclínico, esta combinación funciona como una nueva terapia para combatir los problemas con obesidad y sobrepeso.

11. LIMITACIONES

Para finalidades de esta tesis, se utilizó un mínimo de 3 sujetos por grupo, los cuales fueron lo suficiente para obtener los análisis estadísticos. Otro aspecto importante de resaltar es la medición del consumo de alimento chow de cada rata, en la cual se tenía una pérdida mínima de alimento (ya que solo se tomó en cuenta los pellets que estaban en el comedero y los pellets detectables para medir). Todos los experimentos se llevaron a cabo con ratas *naïve*, con dieta chow y sin ninguna dieta hipercalórica. Se sabe que en estudios preclínicos es necesario evaluar la variable (peso corporal e ingesta de alimento) en dos tipos de roedores y en animales sanos (con dieta standard chow), para evaluar el efecto terapéutico y observar los posibles efectos adversos. Como perspectiva de este trabajo, sería interesante probar este nuevo tratamiento PHEN+5-HTP/carbidopa en roedores obesos inducidos por dieta y comprobar su eficacia.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Adami GF, Campostano A, Marinari GM, et al (2002) Night eating in obesity: a descriptive study. *Nutrition* 18:587–589. doi: 10.1016/S0899-9007(02)00761-X
- Adan RAH, Vanderschuren LJMJ, E. la Fleur S (2008) Anti-obesity drugs and neural circuits of feeding. *Trends Pharmacol Sci* 29:208–217. doi: 10.1016/j.tips.2008.01.008
- Amer, Jeff Breu, Janine McDermott (2004) 5-Hydroxy-l-tryptophan suppresses food intake in food-deprived and stressed rats. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305703003228>. Accessed 3 Mar 2017
- Antoniou K, Kafetzopoulos E, Papadopoulou-Daifoti Z, et al (1998) d-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 23:189–196. doi: 10.1016/S0149-7634(98)00020-7
- Arias HR, Santamaría A, Ali SF (2009) Pharmacological and neurotoxicological actions mediated by bupropion and diethylpropion. *Int Rev Neurobiol* 88:223–255. doi: 10.1016/S0074-7742(09)88009-4
- Balcioglu A, Wurtman RJ (1998) Effects of phentermine on striatal dopamine and serotonin release in conscious rats: In vivo microdialysis study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22:325.
- Baldo BA, Sadeghian K, Basso AM, Kelley AE (2002) Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. *Behav Brain Res* 137:165–177. doi: 10.1016/S0166-4328(02)00293-0
- Bankson MG, Cunningham KA (2002) Pharmacological Studies of the Acute Effects of (+)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine on Locomotor Activity: Role of 5-HT1B/1D and 5-HT2 Receptors. *Publ Online* 31 July 2001 Doi101016S0893-133X0100345-1 26:40–52. doi: 10.1016/S0893-133X(01)00345-1
- Barry, Fornal Casimir (1993) 5-HT and motor control: a hypothesis. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166223693900909>. Accessed 2 Mar 2017
- Bassareo V, Di Chiara G (1999) Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. *Neuroscience* 89:637–641.
- Baumann, Zakia Williams, Dorota Zolkowska, Rothman, Richard B. (2011) Serotonin (5-HT) precursor loading with 5-hydroxy-l-tryptophan (5-HTP) reduces locomotor activation produced by (+)-amphetamine in the rat. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376871610003303>. Accessed 3 Mar 2017

- Bendotti C, Borsini F, Zanini MG, et al (1980) Effect of fenfluramine and norfenfluramine stereoisomers on stimulant effects of d-amphetamine and apomorphine in the rat. *Pharmacol Res Commun* 12:567–573. doi: 10.1016/S0031-6989(80)80142-1
- Birketvedt GS, Florholmen J, Sundsfjord J, et al (1999) Behavioral and Neuroendocrine Characteristics of the Night-Eating Syndrome. *JAMA* 282:657–663. doi: 10.1001/jama.282.7.657
- Blum ID, Zhu L, Moquin L, et al (2014) A highly tunable dopaminergic oscillator generates ultradian rhythms of behavioral arousal. *eLife* 3:e05105. doi: 10.7554/eLife.05105
- Blundell JE, Stubbs RJ, Golding C, et al (2005) Resistance and susceptibility to weight gain: Individual variability in response to a high-fat diet. *Physiol Behav* 86:614–622. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.08.052
- Boadle-Biber MC (1993) Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* 60:1–15. doi: 10.1016/0079-6107(93)90009-9
- Bolam JP, Bergman H, Graybiel A, et al (2005) *Microcircuits: The Interface Between Neurons and Global Brain Function*. Grillner S, Graybiel A. Cambridge
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth P a. C, Bevan MD (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196:527–542. doi: 10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x
- Borbély, Alexander A (1977) Sleep in the rat during food deprivation and subsequent restitution of food. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899377909477>. Accessed 27 Apr 2017
- Boss R van den, Cools AR, Ögren S-O (1988) Differential effects of the selective D2-antagonist raclopride in the nucleus accumbens of the rat on spontaneous and d-amphetamine-induced activity. *Psychopharmacology (Berl)* 95:447–451. doi: 10.1007/BF00172953
- Bray GA, Ryan DH (2006) Medical Approaches to Treatment of the Obese Patient. In: DSc CSMM (ed) *Obesity and Diabetes*. Humana Press, pp 457–469
- Bray GA, York DA (1972) Studies on food intake of genetically obese rats. *Am J Physiol -- Leg Content* 223:176–179.
- Breakefield XO, Blood AJ, Li Y, et al (2008) The pathophysiological basis of dystonias. *Nat Rev Neurosci* 9:222–234. doi: 10.1038/nrn2337
- Bruinvels B, Landwehrmeyer, Gustafson, et al (1994) Localization of 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} α , 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} receptor messenger RNA in rodent and primate brain. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0028390894900671>. Accessed 22 May 2017
- Bubar MJ, Cunningham KA (2006) Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} Receptors as Potential Targets for Modulation of Psychostimulant Use and Dependence. *Curr Top Med Chem* 6:1971–1985. doi: 10.2174/156802606778522131

- Cangiano C, U T, M M, et al (1994) Cytokines, tryptophan and anorexia in cancer patients before and after surgical tumor ablation. *Anticancer Res* 14:1451–1455.
- Cercato C, Roizenblatt VA, Leança CC, et al (2009) A randomized double-blind placebo-controlled study of the long-term efficacy and safety of diethylpropion in the treatment of obese subjects. *Int J Obes* 33:857–865. doi: 10.1038/ijo.2009.124
- Chaouloff Francis (1992) Effects of tianeptine on 5-HTP- and dextrofenfluramine-induced hypophagia in the rat.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009130579390037T>. Accessed 2 Mar 2017
- Chen, Van Praag, Herman M., Gardner, Eliot L. (1991) Activation of 5-HT₃ receptor by 1-phenylbiguanide increases dopamine release in the rat nucleus accumbens.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899391900506>. Accessed 15 Mar 2017
- Colles SL, Dixon JB, O'Brien PE (2007) Night eating syndrome and nocturnal snacking: association with obesity, binge eating and psychological distress. *Int J Obes* 31:1722–1730. doi: 10.1038/sj.ijo.0803664
- Cummings DE (2006) Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav* 89:71–84. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.05.022
- Daberkow DP, Brown HD, Bunner KD, et al (2013) Amphetamine Paradoxically Augments Exocytotic Dopamine Release and Phasic Dopamine Signals. *J Neurosci* 33:452–463. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2136-12.2013
- Dangor, Beckett, Veltman (1986) Simultaneous determination of amfepramon and its two major metabolites in biological fluids by gas liquid chromatography. *Arzneimittelforschung* 36:1307–1310.
- Deurwaerdère PD, Navailles S, Berg KA, et al (2004) Constitutive Activity of the Serotonin_{2C} Receptor Inhibits In Vivo Dopamine Release in the Rat Striatum and Nucleus Accumbens. *J Neurosci* 24:3235–3241. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0112-04.2004
- Di Matteo V, Giuseppe DG, Di Mascio M, Esposito E (1998) Selective blockade of serotonin_{2C/2B} receptors enhances dopamine release in the rat nucleus accumbens.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390898000148>. Accessed 3 Mar 2017
- Diehl K-H, Hull R, Morton D, et al (2001) A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 21:15–23. doi: 10.1002/jat.727
- Doi M, Yujnovsky I, Hirayama J, et al (2006) Impaired light masking in dopamine D₂ receptor-null mice. *Nat Neurosci* 9:732–734. doi: 10.1038/nn1711

- Dowse H, Umemori J, Koide T (2010) Ultradian components in the locomotor activity rhythms of the genetically normal mouse, *Mus musculus*. *J Exp Biol* 213:1788–1795. doi: 10.1242/jeb.038877
- Dreher, Jackson (1989) Role of D1 and D2 dopamine receptors in mediating locomotor activity elicited from the nucleus accumbens of rats. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899389908317>. Accessed 19 May 2017
- Eban-Rothschild A, de Lecea L (2017) Neuronal substrates for initiation, maintenance, and structural organization of sleep/wake states. *F1000Research*. doi: 10.12688/f1000research.9677.1
- Eban-Rothschild A, Rothschild G, Giardino WJ, et al (2016) VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep-wake behaviors. *Nat Neurosci* 19:1356–1366. doi: 10.1038/nn.4377
- Eberle-Wang K, Mikeladze Z, Uryu K, Chesselet M-F (1997) Pattern of expression of the serotonin_{2C} receptor messenger RNA in the basal ganglia of adult rats. *J Comp Neurol* 384:233–247. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19970728)384:2<233::AID-CNE5>3.0.CO;2-2
- FDA guidelines CDER (2005) Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Pharmacology and Toxicology.
- Feenstra MGP, Botterblom MHA, Mastenbroek S (2000) Dopamine and noradrenaline efflux in the prefrontal cortex in the light and dark period: effects of novelty and handling and comparison to the nucleus accumbens. *Neuroscience* 100:741–748. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00319-5
- Feng, Fitz, Yvonne, Li, Yan, et al (2015) Catheterization of the Carotid Artery and Jugular Vein to Perform Hemodynamic Measures, Infusions and Blood Sampling in a Conscious Rat Model | Protocol (Translated to Spanish). <https://www.jove.com/video/51881/la-cateterizacion-de-la-arteria-carotida-y-la-vena-yugular-para?language=Spanish>. Accessed 14 Mar 2017
- Fernstrom JD, Choi S (2008) The development of tolerance to drugs that suppress food intake. *Pharmacol Ther* 117:105–122. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.09.001
- Fibiger HC, Fibiger HP, Zis AP (1973) Attenuation of amphetamine-induced motor stimulation and stereotypy by 6-hydroxydopamine in the rat. *Br J Pharmacol* 47:683–692. doi: 10.1111/j.1476-5381.1973.tb08194.x
- Filip M, Cunningham KA (2002) Serotonin 5-HT_{2C} receptors in nucleus accumbens regulate expression of the hyperlocomotive and discriminative stimulus effects of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 71:745–756. doi: 10.1016/S0091-3057(01)00741-9
- Flier JS (2007) What fuels fat. *Sci Am* 297:72–81.

- Galvan-Arzate S, Santamaria A (2002) Neurotoxicity of Diethylpropion. *Ann N Y Acad Sci* 965:214–224. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04163.x
- Garcia-Mijares M, Bernardes AMT, Silva MTA (2009) Diethylpropion produces psychostimulant and reward effects. *Pharmacol Biochem Behav* 91:621–628. doi: 10.1016/j.pbb.2008.10.001
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. In: *Advances in Neuroscience and Schizophrenia*. Springer, Vienna, pp 43–59
- Ghosh M n., Parvathy S (1976) Tolerance Pattern of the Anorexigenic Action of Amphetamines, Fenfluramine, Phenmetrazine and Diethylpropion in Rats. *Br J Pharmacol* 57:479–485. doi: 10.1111/j.1476-5381.1976.tb10374.x
- Gijsman, Harm J. MD, van Gerven (2002) Placebo-Controlled Comparison of Three Dose-Regimens of 5-Hy... : *Journal of Clinical Psychopharmacology*. In: LWW. http://journals.lww.com/psychopharmacology/Fulltext/2002/04000/Placebo_Controlled_Comparison_of_Three.12.aspx. Accessed 2 Mar 2017
- Graybiel (2008) Habits, Rituals, and the Evaluative Brain. *Annu Rev Neurosci* 31:359–387. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112851
- Gutierrez R, Simon SA, Nicolelis MAL (2010) Licking-Induced Synchrony in the Taste–Reward Circuit Improves Cue Discrimination during Learning. *J Neurosci* 30:287–303. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0855-09.2010
- Gutiérrez R, Téllez LA, Bermúdez-Rattoni F (2003) Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur J Neurosci* 17:1556–1562. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02608.x
- Halford JCG, Harrold JA, Lawton CL, Blundell JE (2005) Serotonin (5-HT) Drugs: Effects on Appetite Expression and Use for the Treatment of Obesity. *Curr Drug Targets* 6:201–213. doi: 10.2174/1389450053174550
- Hampp C, Kang EM, Borders-Hemphill V (2013) Use of Prescription Antiobesity Drugs in the United States. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* 33:1299–1307. doi: 10.1002/phar.1342
- Hendricks EJ, Rothman RB, Greenway FL (2009) How Physician Obesity Specialists Use Drugs to Treat Obesity. *Obesity* 17:1730–1735. doi: 10.1038/oby.2009.69
- Herman G.M. Westenberg, Ton W. Gerritsen, Bert A. Meijer (1982) Kinetics of l-5-hydroxytryptophan in healthy subjects. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165178182900749>. Accessed 2 Mar 2017
- Hirai M, Nakajima T (1979) Biochemical Studies on the Mechanism of Difference in the Renal Toxicity of 5-Hydroxy-L-Tryptophan between Sprague Dawley and Wistar Rats. *J Biochem (Tokyo)* 86:907–913.

- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71:533–554. doi: 10.1016/S0091-3057(01)00746-8
- Ince E, Ciliax BJ, Levey AI (1997) Differential expression of D1 and D2 dopamine and m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in identified striatonigral neurons. *Synapse* 27:357–366. doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(199712)27:4<357::AID-SYN9>3.0.CO;2-B
- Jennings JH, Ung RL, Resendez SL, et al (2015) Visualizing Hypothalamic Network Dynamics for Appetitive and Consummatory Behaviors. *Cell* 160:516–527. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.026
- Kalyanasundar B, Perez CI, Luna A, et al (2015) D1 and D2 antagonists reverse the effects of appetite suppressants on weight loss, food intake, locomotion, and rebalance spiking inhibition in the rat NAc shell. *J Neurophysiol* 114:585–607. doi: 10.1152/jn.00012.2015
- Kalyanasundar B, Solorio J, Perez CI, et al (2016) The efficacy of the appetite suppressant, diethylpropion, is dependent on both when it is given (day vs. night) and under conditions of high fat dietary restriction. *Appetite* 100:152–161.
- Kawaguchi Y (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13:4908–4923.
- Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ (2005) Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: Integration of energy, action and reward. *Physiol Behav* 86:773–795. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.08.066
- Kincaid AE, Zheng T, Wilson CJ (1998) Connectivity and Convergence of Single Corticostriatal Axons. *J Neurosci* 18:4722–4731.
- Kreitzer (2009) Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons. *Annu Rev Neurosci* 32:127–147. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135422
- la Fleur SE, Vanderschuren LJMJ, Luijendijk MC, et al (2007) A reciprocal interaction between food-motivated behavior and diet-induced obesity. *Int J Obes* 31:1286–1294. doi: 10.1038/sj.ijo.0803570
- Lazarus M, Huang Z-L, Lu J, et al (2012) How do the basal ganglia regulate sleep–wake behavior? *Trends Neurosci* 35:723–732. doi: 10.1016/j.tins.2012.07.001
- Léna I, Parrot S, Deschaux O, et al (2005) Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep–wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats. *J Neurosci Res* 81:891–899. doi: 10.1002/jnr.20602
- Levitt P, Moore RY (1978) Developmental organization of raphe serotonin neuron groups in the rat. *Anat Embryol (Berl)* 154:241–251. doi: 10.1007/BF00345655
- Leysen JE (2004) 5-HT₂ Receptors. *CNS Neurol Disord - Drug Targets Former Curr Drug Targets - CNS Neurol Disord* 3:11–26. doi: 10.2174/1568007043482598

- Li Z, Maglione M, Tu W, et al (2005) Meta-analysis: pharmacologic treatment of obesity. *Ann Intern Med* 142:532–546.
- Lucas G, Spampinato U (2000) Role of Striatal Serotonin2A and Serotonin2C Receptor Subtypes in the Control of In Vivo Dopamine Outflow in the Rat Striatum. *J Neurochem* 74:693–701. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.740693.x
- Marchettini P, Stuart AO, Mohamed F, et al (2002) Docetaxel: pharmacokinetics and tissue levels after intraperitoneal and intravenous administration in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol* 49:499–503. doi: 10.1007/s00280-002-0439-1
- Martel P, Fantino M (1996) Mesolimbic dopaminergic system activity as a function of food reward: a microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav* 53:221–226.
- Meguid MM, Fetissov SO, Blaha V, Yan Z-J (2000) Dopamine and serotonin VMN release is related to feeding sta... : *NeuroReport*. In: LWW. http://journals.lww.com/neuroreport/Fulltext/2000/07140/Dopamine_and_serotonin_VMN_release_is_related_to.2.aspx. Accessed 1 Jun 2017
- Morton GJ, Meek TH, Schwartz MW (2014) Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 15:367–378. doi: 10.1038/nrn3745
- Näslund E, Hellström PM (2007) Appetite signaling: From gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol Behav* 92:256–262. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.05.017
- Neumaier JF, Vincow ES, Arvanitogiannis A, et al (2002) Elevated Expression of 5-HT_{1B} Receptors in Nucleus Accumbens Efferents Sensitizes Animals to Cocaine. *J Neurosci* 22:10856–10863.
- Nisijima K, Yoshino T, Yui K, Katoh S (2001) Potent serotonin (5-HT)_{2A} receptor antagonists completely prevent the development of hyperthermia in an animal model of the 5-HT syndrome. *Brain Res* 890:23–31. doi: 10.1016/S0006-8993(00)03020-1
- O'Connor EC, Kremer Y, Lefort S, et al (2015) Accumbal D_{1R} Neurons Projecting to Lateral Hypothalamus Authorize Feeding. *Neuron* 88:553–564. doi: 10.1016/j.neuron.2015.09.038
- Oishi Y, Lazarus M (2017) The control of sleep and wakefulness by mesolimbic dopamine systems. *Neurosci Res*. doi: 10.1016/j.neures.2017.04.008
- Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G (1996) Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nat Lond* 382:255–7. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/382255a0>
- Qu W-M, Huang Z-L, Xu X-H, et al (2008) Dopaminergic D₁ and D₂ Receptors Are Essential for the Arousal Effect of Modafinil. *J Neurosci* 28:8462–8469. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1819-08.2008
- Rattenborg NC, Voirin B, Cruz SM, et al (2016) Evidence that birds sleep in mid-flight. *Nat Commun* 7:12468. doi: 10.1038/ncomms12468

- Reimer, Martin-Iverson, Urichuk (1995) Conditioned place preferences, conditioned locomotion, and behavioral sensitization occur in rats treated with diethylpropion. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305794003640>. Accessed 3 Mar 2017
- Rothman RB, Blough BE, Baumann MH (2006) Dual dopamine–5-HT releasers: potential treatment agents for cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* 27:612–618. doi: 10.1016/j.tips.2006.10.006
- Rymar VV, Sasseville R, Luk KC, Sadikot AF (2004) Neurogenesis and stereological morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum. *J Comp Neurol* 469:325–339. doi: 10.1002/cne.11008
- Schiffmann SN, Jacobs O, Vanderhaeghen J-J (1991) Striatal Restricted Adenosine A2 Receptor (RDC8) Is Expressed by Enkephalin but Not by Substance P Neurons: An In Situ Hybridization Histochemistry Study. *J Neurochem* 57:1062–1067. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb08257.x
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, et al (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661–671. doi: 10.1038/35007534
- Seki Y, Tanimura T (2014) Ultradian rhythm unmasked in the Pdf clock mutant of *Drosophila*. *J Biosci* 39:585–594. doi: 10.1007/s12038-014-9450-z
- Sharp, T, Zetterström, T, Ungerstedt, U (1987) A direct comparison of amphetamine-induced behaviours and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899387914168>. Accessed 7 Apr 2017
- Simansky (1995) Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166432896000666>. Accessed 2 Mar 2017
- Smith AD, Olson RJ, Justice JB (1992) Quantitative microdialysis of dopamine in the striatum: effect of circadian variation. *J Neurosci Methods* 44:33–41.
- Soto-Molina H, Pizarro-Castellanos M, Rosado-Pérez J, et al (2015) Six-month efficacy and safety of amfepramone in obese Mexican patients. *Int J Clin Pharmacol Ther* 53:541–549.
- Stuart IO, Berridge CW (2003) Wake-Promoting Actions of Dopamine D1 and D2 Receptor Stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 307:386–394. doi: 10.1124/jpet.103.053918
- Synowski SJ, Smart AB, Warwick ZS (2005) Meal size of high-fat food is reliably greater than high-carbohydrate food across externally-evoked single-meal tests and long-term spontaneous feeding in rat. *Appetite* 45:191–194. doi: 10.1016/j.appet.2005.02.004
- Szczycka MS, Rainey MA, Kim DS, et al (1999) Feeding behavior in dopamine-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 96:12138–12143. doi: 10.1073/pnas.96.21.12138

- Tellez LA, Perez IO, Simon SA, Gutierrez R (2012) Transitions between sleep and feeding states in rat ventral striatum neurons. *J Neurophysiol* 108:1739–1751. doi: 10.1152/jn.00394.2012
- Tepper JM, Bolam JP (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 14:685–692. doi: 10.1016/j.conb.2004.10.003
- Turner EH, Loftis JM, Blackwell AD (2006) Serotonin a la carte: Supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. *Pharmacol Ther* 109:325–338. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.06.004
- Uretsky K (1985) Time course of the development of the enhanced behavioral and biochemical responses to amphetamine after pretreatment with amphetamine. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0028390885900322>. Accessed 20 May 2017
- Vanderschuren LJMJ, Kalivas PW (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 151:99–120. doi: 10.1007/s002130000493
- Vertes RP, Martin GF (1988) Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 275:511–541. doi: 10.1002/cne.902750404
- Vezina, Stewart (1989) The effect of dopamine receptor blockade on the development of sensitization to the locomotor activating effects of amphetamine and morphine. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899389911402>. Accessed 19 May 2017
- Walters MJ, Walters SM (1977) High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Diethylpropion Hydrochloride in Tablets: Isolation and Identification of Two Decomposition Products. *J Pharm Sci* 66:198–201. doi: 10.1002/jps.2600660216
- Wang GJ, Volkow ND, Logan J, et al (2001) Brain dopamine and obesity. *Lancet Lond Engl* 357:354–357.
- Wilbert B, Mohundro BL, Shaw V, Andres A (2011) Appetite Suppressants as Adjuncts for Weight Loss.
- Wilson CJ, Chang HT, Kitai ST (1990) Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J Neurosci* 10:508–519.
- Woods SC, Lutz TA, Geary N, Langhans W (2006) Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1219–1235. doi: 10.1098/rstb.2006.1858
- Wolf CJ, Barrett GD, Mitchell D, Myers RA (1977) Naloxone-reversible peripheral electroanalgesia in intact and spinal rats. *Eur J Pharmacol* 45:311–314. doi: 10.1016/0014-2999(77)90016-4

- Yan Q-S, Yan S-E (2001) Activation of 5-HT_{1B/1D} receptors in the mesolimbic dopamine system increases dopamine release from the nucleus accumbens: a microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 418:55–64. doi: 10.1016/S0014-2999(01)00913-X
- Yang, Ratto, Carlo, Gleason, John R, et al (1992) Influence of anterior subdiaphragmatic vagotomy and TPN on rat feeding behavior. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031938492900719>. Accessed 8 Mar 2017
- Yanovski SZ, Yanovski JA (2014) Long-term Drug Treatment for Obesity: A Systematic and Clinical Review. *JAMA* 311:74–86. doi: 10.1001/jama.2013.281361
- Yoshimoto K, McBride WJ (1992) Regulation of nucleus accumbens dopamine release by the dorsal raphe nucleus in the rat. *Neurochem Res* 17:401–407. doi: 10.1007/BF00969884

13. PUBLICACIÓN REALIZADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS

Appetite 100 (2016) 152–161



Contents lists available at ScienceDirect

Appetite

journal homepage: www.elsevier.com/locate/appet



The efficacy of the appetite suppressant, diethylpropion, is dependent on both when it is given (day vs. night) and under conditions of high fat dietary restriction



B. Kalyanasundar^a, Jessica Solorio^a, Claudia I. Perez^a, Carlos Hoyo-Vadillo^a, Sidney A. Simon^b, Ranier Gutierrez^{a,*}

^a Laboratory of Neurobiology of Appetite; Department of Pharmacology, CINVESTAV-IPN, 07360 Mexico City, Mexico

^b Department of Neurobiology, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2015

Received in revised form

26 January 2016

Accepted 31 January 2016

Available online 8 February 2016

Keywords:

Obesity

Appetite suppressant

High fat diet

Night eating like syndrome

ABSTRACT

Obesity is a public health problem caused by excessive consumption of high caloric diets and/or lack of physical activity. Although treatments for obesity include low caloric diets and exercise programs, these activities frequently are supplemented with appetite suppressants. For the short-term treatment of weight loss, diethylpropion (DEP) is a commonly used appetite suppressant. However, little is known with regard to how to improve its weight loss efficacy. We therefore evaluated, in rats, two administration protocols where the animals received daily injections of DEP. First, when these nocturnal animals were normally active (at night) and when they were normally inactive (daytime), and second, with or without high fat dietary restriction (HFDR). We observed that DEP induced a greater weight-loss administered when the animals were in their active phase than in their inactive phase. Moreover, DEP's administration during the inactive phase (and to a lesser degree in the active phase) promotes the consumption of food during normal sleeping time. In addition, we found that DEP-induced weight loss under *ad libitum* access to a HF diet, but its efficacy significantly improved under conditions of HFDR. In summary, the efficacy of DEP, and presumably other like appetite suppressants, is enhanced by carefully controlling the time it is administered and under dietary restriction of HF diets.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The worldwide epidemic of obesity is an important public health concern because of the associated pathologies and economic cost to society. Although there are many causes, the lack of exercise and the over-consumption of high fat and/or high carbohydrate rich foods are two major factors that contribute to this epidemic (McPherson, 2014; Rossner, Hammarstrand, Hemmingsson, Neovius, & Johansson, 2008). When such lifestyle interventions are insufficient, pharmacotherapy in the form of appetite suppressants is a commonly used option in weight loss programs (Wilbert, Mohundro, Shaw, & Andres, 2011).

Diethylpropion (DEP) is a commonly used appetite suppressant (Kang & Park, 2012) that acts in the central nervous system by

modulating the catecholaminergic system (Rothman et al., 2001; Samanin & Garattini, 1993). In humans over a 6-month treatment period DEP produced an average weight loss of about 10% with dry mouth and insomnia being its most common side effects (Cercato et al., 2009; Soto-Molina et al., 2015). In rats, we have found that DEP transiently induces weight-loss and decreases food intake, induces insomnia and a psychomotor activation (Kalyanasundar et al., 2015).

One important clinical consequence of inducing insomnia, which is a factor causing obesity, is the development of night eating syndrome (NES (Allison et al., 2005; Colles, Dixon, & O'Brien, 2007)). Symptoms of NES include morning anorexia, evening hyperphagia, and insomnia. That is, patients with NES decrease food intake in the day and increase it at night when they cannot sleep (Stunkard et al., 1996). Given that in humans, appetite suppressants cause insomnia (O'Reardon, Peshek, & Allison, 2005), we explored the feeding habits of control and DEP-treated rats during the day when they are normally inactive (or sleeping) and at night (when

* Corresponding author. Laboratory of Neurobiology of Appetite; Department of Pharmacology, CINVESTAV-IPN, 07360 Mexico City, Mexico.
E-mail address: ranier@cinvestav.mx (R. Gutierrez).