



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO
FARMACOLOGÍA**

**“Mecanismo neuroquímico de la dopamina y de los
Receptores D4 del Núcleo Paraventricular Hipotalámico
en el Control Alimentario”**

Tesis que presenta

Juan Gabriel Tejas Juárez

Para Obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En la Especialidad de

Farmacología

Directores de Tesis:
Dr. Benjamín Floran Garduño
Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez

México, Distrito Federal.

Agosto, 2014

El presente trabajo fue realizado en los Departamentos de Farmacología y de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) bajo la dirección de los Doctores Benjamín Floran Garduño (CINVESTAV) y Rodrigo Erick Escartín Pérez (FES Iztacala), con apoyo de CONACYT a través de la beca con número 215904 y de la UNAM (PAPIIT IN224811, PAPCA 53), con la revisión del siguiente jurado:

Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza

Dr. José Luis Reyes Sánchez

Dra. Liliana Favari Perozzi

Dr. Juan Manuel Mancilla Díaz

CONTENIDO

Resumen	vi
Abstract	viii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Catecolaminas	4
2.1.1 Síntesis de catecolaminas	4
2.1.2 Catabolismo	8
2.1.2.1 Monoamina oxidasa.....	9
2.1.2.2 Catecol-orto-metil-transferasa.....	9
2.1.3 Dopamina	9
2.1.3.1 Almacenamiento de la dopamina	11
2.1.3.2 Transportador de monoaminas vesicular	12
2.1.3.3 Liberación de dopamina	12
2.1.3.4 Regulación de síntesis y liberación de dopamina por autoreceptores	13
2.1.3.5 Inactivación de la neurotransmisión dopaminérgica	13
2.1.4 Receptores dopaminérgicos	14
2.1.5 Vía de señalización del receptor D4	15
2.2 Control hipotalámico de la alimentación	19
2.2.1 GABA (Ácido γ amino butírico)	20
2.2.2 Glutamato	21
2.2.3 CRH y glucocorticoides	22

2.2.4 TRH	23
2.2.5 Neuronas neurosecretoras del PVN	25
2.2.6 Dopamina y receptores dopaminérgicos en el hipotálamo	26
2.2.7 Receptores dopaminérgicos e ingesta de alimento	28
3. Planteamiento del problema y objetivos	31
3.1 Objetivo general	33
3.2 Objetivos particulares.....	33
4. Hipótesis	34
5. Método	35
5.1 Animales	35
5.2 Dieta y programa de alimentación	35
5.3 Habitación al programa de alimentación restringida	36
5.4 Cirugía estereotáxica	36
5.5 Fármacos.....	37
5.6 Registros conductuales	38
5.7 Diseño experimental	39
5.8 Histología	40
5.9 Experimentos de liberación de [³ H]-Glutamato	41
5.9.1 Soluciones	41
5.9.2 Obtención de explantes del PVN	41
5.9.3 Incubación con la marca radioactiva	42
5.9.4 Desarrollo experimental	42
5.9.5 Cuantificación de la liberación [³ H]-Glutamato	43

5.10 Experimentos de electrofisiológicos	44
5.10.1 Soluciones	44
5.10.2 Desarrollo experimental	45
5.10.2.1 Obtención de rebanadas	45
5.10.2.2 Pipetas	46
5.10.2.3 Registros	46
5.11 Experimentos para la determinación de corticosterona	47
5.11.1 Procedimiento general	47
5.11.2 Fundamento de la técnica	48
5.11.3 Procedimiento de RIA	49
5.11.4 Cálculos	50
5.11.5 Consideraciones al realizar el experimento	51
5.11.6 Diseño experimental	52
5.12 Análisis estadístico	53
6. Resultados	55
6.1 Efectos del NMDA y Muscimol sobre la ingesta de alimento	55
6.2 El efecto mediado por los receptores D4 es prevenido por el pretratamiento con NMDA	56
6.3 Análisis de la secuencia de saciedad conductual	58
6.4 Análisis cuantitativo de la SSC de los tratamiento intrahipotalámicos	61
6.4.1 Alimentación	61
6.4.2 Ingesta de agua	62
6.4.3 Acicalamiento	62
6.4.4 Descanso	62

6.4.5 Actividad no alimentaria	62
6.5 Tasa local de alimentación	64
6.6 La activación de los receptores D4 en el PVN disminuye la liberación de [³ H]- Glutamato	64
6.7 Efecto de la activación de los receptores D4 por PD-168077 sobre corrientes postsinápticas excitatorias miniatura: inhibición de la transmisión glutamatérgica	66
6.8 El programa de restricción de alimento, así como la activación del receptor D4 tiene efecto sobre los niveles de corticosterona en suero de rata: interacción de los receptores NMDA y D4	67
7. Discusión	72
7.1 Efectos estimulatorios de la ingestión de alimento de la dopamina mediados por receptores D4 hipotalámicos	72
7.2 Efecto de la administración de NMDA y muscimol sobre la ingesta de alimento	73
7.3 La activación selectiva del receptor D4 disminuye la liberación de glutamato y la transmisión glutamatérgica en neuronas neurosecretoras del PVN	76
7.4 La activación de los receptores D4 en el PVN estimula la ingesta de alimento y disminuye los niveles de corticosterona en suero y este efecto es prevenido por el pre-tratamiento con NMDA	77
7.5 Posible implicación de CRH y TRH sobre los efectos de la activación del receptor D4 sobre la ingesta de alimento	80
8. Conclusiones	85

9. Perspectivas y limitaciones	86
10. Referencias.....	87

RESUMEN

Diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la dopamina en la regulación del comportamiento alimentario. Experimentos realizados por nuestro grupo de trabajo han mostrado que la activación de receptores a dopamina D4 en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) puede inducir estimulación de la ingesta de alimento, un fenómeno poco estudiado, por lo que el mecanismo neuroquímico que media dicho efecto se desconoce. En el PVN existen neuronas parvocelulares que expresan CRH (corticotesterona, una hormona anorexigénica) y que reciben inervación glutamatérgica de diferentes regiones cerebrales donde se expresa el ARNm que codifica para el receptor D4, lo que sugiere que el receptor D4 podría influir sobre la actividad de estas neuronas vía la modulación de la liberación de glutamato. Así, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el mecanismo por medio del cual la activación del receptor D4 en el PVN incrementa la ingesta de alimento evaluando tanto el comportamiento alimentario como la liberación de glutamato y las concentraciones plasmáticas de corticotesterona. En experimentos conductuales se llevaron a cabo manipulaciones farmacológicas en el PVN y se evaluaron los cambios sobre la cantidad de alimento consumido y sobre la secuencia de saciedad conductual (SSC) en ratas sometidas a un protocolo de restricción alimentaria. Nuestros resultados muestran que la administración de NMDA revierte el efecto estimulador de la ingesta de alimento de la activación de los receptores D4 en el PVN. Posteriormente, se evaluaron *in vitro* los efectos de la activación del receptor D4 sobre la liberación de [³H]-Glutamato, encontrándose que este receptor modula negativamente la liberación de [³H]-Glutamato. Adicionalmente, se realizaron experimentos electrofisiológicos en los que se observó una disminución en la transmisión glutamatérgica al activar a los receptores D4, efecto consistente con lo observado en la liberación de [³H]-Glutamato. Tras evaluar los cambios en los niveles de corticotesterona inducidos por la activación de los receptores D4, encontramos que el agonista de los receptores D4 disminuye la concentración de corticotesterona y que dicho efecto también es prevenido por la administración de NMDA. A partir de los resultados obtenidos, concluimos de que la estimulación de la ingesta de alimento inducida por la activación de los receptores D4 del PVN puede

explicarse en parte por la inhibición de la transmisión glutamatérgica, con lo cual disminuye la actividad de las neuronas que sintetizan CRH, desinhibiendo la ingestión de alimento.

ABSTRACT

Several studies have shown the importance of dopamine in the regulation of feeding behavior. Experiments conducted by our research group have shown that activation of dopamine D4 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) can induce stimulation of food intake, a phenomenon little studied, so the neurochemical mechanism of this effect is unknown. PVN has parvocellular neurons expressing CRH (corticotropin-releasing hormone, an anorexigenic hormone) and it receives glutamatergic innervation of different brain regions that express the mRNA encoding the D4 receptor, which suggests that the D4 receptor may influence the activity of these neurons via modulation of glutamate release. Thus, the objective of this work was to study the mechanism by which the activation of the D4 receptor in the PVN increases food intake, evaluating feeding behavior, glutamate release and plasma corticosterone concentrations. The behavioral experiments were conducted with pharmacological manipulations in the PVN and we measured the changes on the amount of food consumed and the behavioral satiety sequence (SSC) in rats subjected to food restriction protocol. Our results show that administration of NMDA reverses the stimulatory effect of food intake on the activation of the D4 receptor in the PVN. Subsequently, we tested in vitro the effect of D4 receptor activation on the release of [³H]-Glutamate, this receptor was found that negatively modulates the release of [³H]-glutamate. Moreover, electrophysiological experiments in which a decrease was observed in glutamatergic transmission by activating D4 receptor, consistent with the observed effect on the release of [³H]-glutamate. After assessing changes in the levels of corticosterone induced activation of receptor D4, we found that the D4 receptor agonist lowers the concentration of corticosterone and this effect also is prevented by the administration of NMDA. From the results obtained we concluded that the stimulation of food intake induced receptor activation D4 PVN may be explained in part by the inhibition of glutamatergic transmission, with this decreases the activity of neurons that synthesize CRH, by disinhibiting food intake.

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de los mecanismos que regulan la conducta alimentaria y la homeostasis energética es muy importante debido a que actualmente México es uno de los países con mayor incidencia de sobrepeso y obesidad (35% en menores de entre 5 y 11 años, además de 70% en mayores de 20 años) (INSP, 2012) y una parte de los casos de obesidad se explican por el desequilibrio entre la ingestión de alimentos y el gasto energético. Este desequilibrio está asociado frecuentemente a la ingestión de dietas con alta densidad energética en combinación con una escasa actividad física. Dentro de los primeros estudios realizados para dilucidar los mecanismos que regulan la homeostasis energética se encuentran los estudios con lesiones en el hipotálamo (Anand and Brobeck, 1951, King, 2006). A partir de estos estudios, al Núcleo Ventromedial del Hipotálamo (VMN) se le dio el nombre de "centro de la saciedad" y al Núcleo Lateral del Hipotálamo (LH) como el "centro del hambre"; en la actualidad, la idea de núcleos especializados es imprecisa y, el conocimiento que se tiene sobre la homeostasis energética involucra a la mayoría de los núcleos del hipotálamo a nivel central, así como varias regiones a nivel periférico, formando así un conjunto de núcleos que regulan de manera precisa esta homeostasis. Desde el descubrimiento del neuropéptido Y (NPY) (Allen et al., 1982) varios investigadores se dieron a la tarea de conocer más sobre los mecanismos que rigen la homeostasis energética. Por su parte, el descubrimiento de la leptina (Zhang et al., 1994), marcó un hito en cuanto al avance en el conocimiento en esta área, sin embargo, a la fecha se tiene conocimiento de un gran número de neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas que se encuentran relacionados con la homeostasis de energía (Berthoud and Morrison, 2008, Valassi et al., 2008). Uno de estos neurotransmisores es la dopamina, varios son los estudios que sustentan la relación estrecha que guarda la dopamina con la alimentación (Clifton et al., 1989, Gillard et al., 1993, Terry et al., 1995), por lo que los estudios sobre el papel de los receptores dopaminérgicos en la conducta alimentaria podrían ampliar el rango de blancos terapéuticos en padecimientos como la obesidad

Diversos estudios han mostrado evidencia convincente de que la dopamina es necesaria para que se inicie la alimentación, por ejemplo en el modelo de ratones deficientes de dopamina (Zhou and Palmiter, 1995), en el estudio donde se muestra que la inhibición en la síntesis de la dopamina disminuye la ingesta de alimento, o bien que el tratamiento con el precursor de la dopamina (L-DOPA) incrementan la misma (Friedman et al., 1973). Estudios más recientes con agonistas no selectivos dopaminérgicos como el quinpirole (agonista D2, D3, D4) muestran que el tratamiento por administración subcutánea en ratas con este fármaco disminuye la ingesta de alimento total, particularmente, disminuyendo la ingesta de alimento estándar y promoviendo un incremento en la ingesta de alimento palatable (Cooper and Al-Naser, 2006); este mismo estudio, muestra que el tratamiento con un agonista selectivo de los receptores a dopamina D1 (SKF38393), incrementa la ingesta de alimento palatable a dosis altas (3 mg/gr de peso corporal); de la misma forma, se ha mostrado que este mismo fármaco presenta efectos anorexigénicos (Cooper et al., 1990). Todos estos hallazgos, sugieren fuertemente que el papel de la dopamina en el control de la ingesta de alimento es muy complejo, por lo que se propone que cuando la transmisión dopaminérgica es bloqueada puede inhibir o activar la ingesta de alimento, del mismo modo si la transmisión dopaminérgica es sobre activada puede inhibir o activar la ingesta de alimento, dichos efectos tan contrastantes de la dopamina se pueden deber a la activación de diferentes subtipos de receptores a dopamina.

La mayoría de las investigaciones enfocadas al estudio de la regulación de la ingesta de alimento por mecanismos dopaminérgicos se han basado en los receptores D1 y D2, pertenecientes a la familia D1-like y D2-like, respectivamente. Observaciones recientes sobre la actividad del receptor D3 y D4 muestran que además tienen un efecto sobre la erección (Sanna et al., 2011). Aunque ya se conocía que los receptores a dopamina D4 se expresan en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) (Defagot et al., 1997), fue más recientemente que se demostró que los receptores D2, D3 y D4 se expresan en las neuronas parvocelulares oxitocinérgicas en el PVN (Baskerville et al., 2009). Por otro lado, se ha mostrado que la activación del receptor D4 en el PVN con un agonista selectivo a esos receptores (PD-168077)

induce el incremento de la actividad neuronal (*c-fos*) que indica un aumento en la actividad neuronal en el PVN (Bitner et al., 2006). Dado que el PVN se considera una región clave en el control alimentario y la homeostasis energética que integra la información necesaria para ese fin (Schwartz et al., 2000, Morton, 2006), es probable que la dopamina pueda regular en parte la ingesta de alimento vía receptores D4 en el PVN. Recientemente encontramos que los receptores D4 incrementan la ingesta de alimento cuando se activan de manera selectiva en el PVN, dicho efecto es revertido por el pre-tratamiento con el antagonista D4 L-745870 (Tejas-Juárez, 2008). Por lo cual, el presente estudio tuvo como objetivo conocer el mecanismo neuroquímico por medio del cual los receptores a dopamina D4 incrementan la ingesta de alimento al ser activados en el PVN, mediante el análisis de la secuencia de saciedad conductual (SSC) en ratas habituadas a un programa de alimentación restringida, mismo que permitió estudiar los efectos de manipulaciones farmacológicas (que pueden tener tanto efectos estimuladores como inhibidores de la ingesta de alimento) debido a que con dicho paradigma la ingesta basal de alimento es alta. El análisis de la secuencia de saciedad conductual es una herramienta útil en el estudio de los componentes conductuales del proceso saciatorio asociado a la ingestión de alimento. Paralelamente, se realizaron estudios electrofisiológicos (evaluación de las corrientes postsinápticas miniatura, mEPSC, por sus siglas en inglés) y de liberación de neurotransmisor con marca radioactiva ([³H]-Glutamato) para describir los mecanismos mediante los cuales activación de los receptores D4 del PVN modulan la liberación de glutamato, así como la técnica de radio inmunoensayo para corticosterona en suero, para evaluar el efecto de la activación de los receptores D4 del PVN sobre las concentraciones de corticosterona en suero. En conjunto todas estas manipulaciones experimentales, que involucraron la activación de receptores dopaminérgicos, NMDA, GABA_A, etc., posibilitaron que en el presente trabajo se explorara sistemáticamente el mecanismo neuroquímico por medio del cual la dopamina hipotalámica regula a la conducta alimentaria vía receptores D4.

2. ANTECEDENTES

2.1 Catecolaminas

De las aproximadamente 100 mil millones de neuronas en el cerebro humano, se estima que sólo aproximadamente 500 mil neuronas utilizan catecolaminas como neurotransmisor. De tal manera que, un gran número de investigaciones se ha desarrollado en torno a los procesos que se relacionan con las catecolaminas en comparación con otros sistemas de neurotransmisores. ¿Porque estos neurotransmisores han obtenido tal atención? ¿Porque la función normal del cerebro es tan dependiente de la actividad de tan pequeño número de neuronas, y que relevancia tienen las catecolaminas a la neurofarmacología clínica moderna? Los neurotransmisores como las monoaminas ejecutan un efecto modulador en virtualmente cada circuito del cerebro, facilitando la comunicación entre las neuronas y regulando la plasticidad de esos circuitos. Los sistemas neurales involucrados en las funciones cerebrales más altas como los movimientos voluntarios, emoción y la cognición son favorecidas en paralelo, distribuidas en circuitos que procesan la información mediante una rápida transmisión excitatoria o inhibitoria en sinapsis bien definidas.

El término catecolamina se refiere al núcleo catecol, un 3,4-dihidroxibenceno. Las catecolaminas son la dopamina (DA), la norepinefrina (NE) y la epinefrina (E). Debido a la importancia de la dopamina en el presente trabajo, se describirá en detalle a esta catecolamina.

La dopamina es sintetizada a partir del aminoácido esencial tirosina por la acción de 2 enzimas: la tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (Figura 1). La TH es una *oxidasa* que convierte a la tirosina en L-Dihidroxi-Fenilalanina (L-DOPA por sus siglas en inglés), la TH es la enzima limitante para la síntesis de dopamina y está presente en las células que producen dopamina.

2.1.1 Síntesis de Catecolaminas

Como ya se mencionó, la catecolaminas son moléculas con un núcleo catecol y un grupo etilamina anclado al carbono 1 (C1). Los neurotransmisores denominados catecolaminas como la NE, DA y E son sintetizados a través de una vía biosintética

que comienza con la captura del aminoácido precursor tirosina. La tirosina de la dieta es activamente transportada al cerebro y concentrada en neuronas, donde es hidroxilada en la posición 3 por la TH para formar dihidroxifenilalanina (DOPA). Esta enzima existe como un homotetrámero; requiere Fe^{2+} como cofactor, tanto como oxígeno molecular y tetrahidrobiopterina (donador de hidrógeno). Un inhibidor de la TH mejor conocido como α -metilparatirosina (AMPT) es usado en animales de laboratorio como una herramienta experimental para estudiar la función de las catecolaminas. Consecuentemente, la regulación de la TH y de los genes que codifican para esta enzima, han sido el foco de intensivas investigaciones. En general, cuando la neurona catecolaminérgica es activada, la actividad de la TH incrementa de tal manera que la célula puede mantener el ritmo de la demanda en el neurotransmisor. La regulación de la TH ocurre a niveles transcripcionales, traduccionales y postraduccionales. A corto plazo, la regulación de la actividad de la TH ocurre mediante la fosforilación postraduccional y la desfosforilación de al menos cuatro residuos distintos de serina en el extremo N terminal (Figura 2). Estos sitios pueden ser fosforilados por lo menos por nueve proteín-cinasas distintas, incluyendo la PKA, la proteín-cinasa II dependiente de calcio calmodulina y la PKC. Se cree que la fosforilación por la mayoría de estas cinastas induce un cambio conformacional en la proteína que resulta en una alta afinidad por su cofactor tetrahidrobiopterina y una baja afinidad por las catecolaminas que inducen inhibición por producto final sobre la TH. El resultado final es un incremento en la actividad catalítica de la TH, que consecuentemente conduce a un incremento en la concentración celular de DA, NE y E. Así, señales extracelulares o agentes farmacológicos que activan las proteín-cinasas o fosfatasas pueden controlar la cantidad de catecolaminas sintetizadas en una neurona.

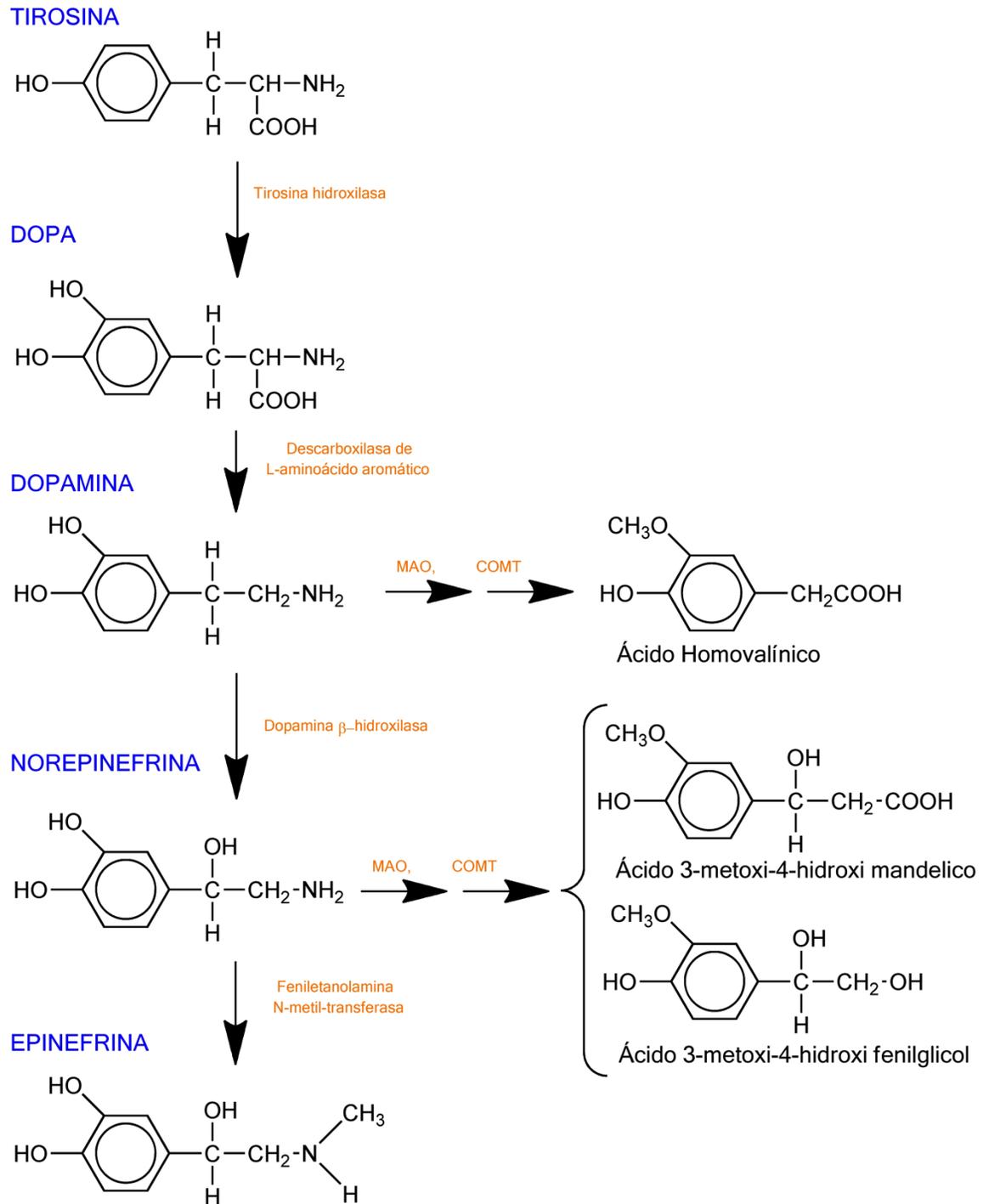


Figura 1. Etapas de la síntesis enzimática de dopamina, norepinefrina y epinefrina. Los nombres de las enzimas participantes aparecen en naranja. MAO, oxidasa de monoaminas; COMT, catecol-o-metil transferasa.

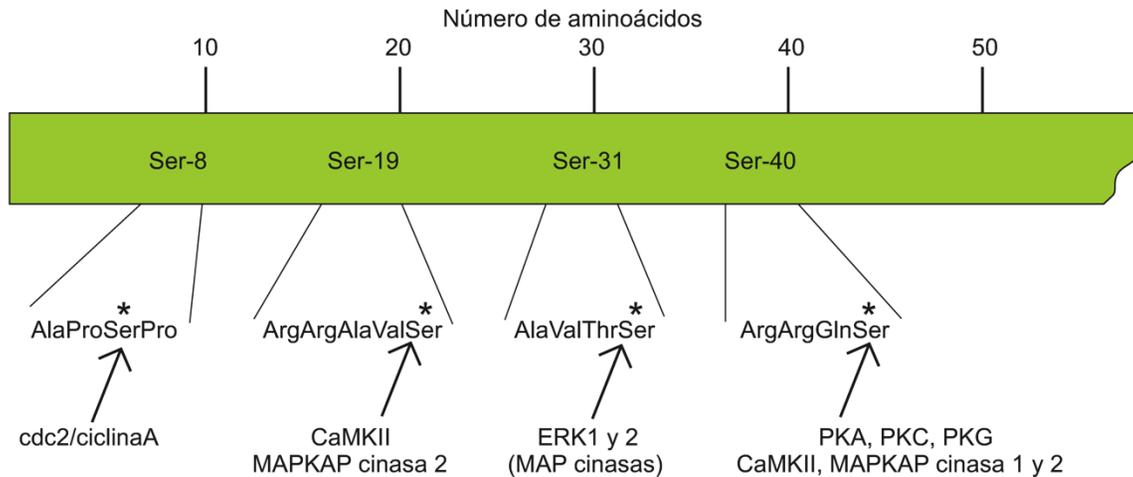


Figura 2. Dominios regulatorios en el N terminal de la tirosina hidroxilasa (TH). La regulación a corto plazo de la actividad de la TH ocurre a través de la fosforilación de al menos cuatro residuos de serina (indicados con un asterisco) en los primeros cuarenta aminoácidos de la enzima. Abajo de cada residuo se enlista una serie de cinasas que catalizan la fosforilación de dichos residuos.

Cambios a largo plazo en la actividad de la TH pueden ocurrir a través de la regulación transcripcional del gen que codifica para la TH por numerosos estímulos extracelulares incluyendo neurotransmisores, hormonas y fármacos.

Entre los estímulos que incrementan la expresión de la TH podemos mencionar el estrés ambiental crónico, así como algunas drogas tales como nicotina, cafeína y morfina; entre los agentes que disminuyen la expresión de la TH se encuentran los antidepresivos. Estos estímulos tan diferentes, producen sus efectos ya sea activando o reprimiendo elementos regulatorios transcripcionales en el gen promotor de la TH. El promotor de la TH contiene varios elementos que pueden ser regulados a nivel del DNA, incluyendo sitios CRE, GRE, AP-1 y NF-kB. Entre estos, el elemento que responde al cAMP (CRE) parece jugar un papel importante, induciendo la expresión de la TH en respuesta a señales farmacológicas y fisiológicas. El incremento en los niveles de la TH subsecuentemente resulta en un incremento en los niveles de catecolaminas. De manera global, la regulación en la expresión del gen de la TH, por estresores ambientales o drogas psicotrópicas representa uno de los mejores medios establecidos por los cuales un estímulo externo produce cambios adaptativos en neuronas blanco a nivel transcripcional. En condiciones normales, por

ejemplo durante la ingesta normal de aminoácidos en la dieta, la TH está completamente saturada por los niveles de la tirosina circulante, sin embargo la habilidad de la tirosina administrada periféricamente para penetrar al cerebro depende de un proceso de transporte activo a través de la barrera hematoencefálica. El transportador involucrado se encuentra saturado bajo condiciones normales, consecuentemente, la administración de tirosina suplementaria no puede producir un incremento significativo en la síntesis de catecolaminas en el SNC. Sin embargo un incremento en la síntesis de catecolaminas puede ser logrado por la administración periférica de levodopa (L-DOPA), lo cual evita este paso enzimático limitante y rápidamente penetra la barrera hematoencefálica, por esta razón la L-DOPA es utilizada como tratamiento en la enfermedad de Párkinson.

Cuatro diferentes variantes del gen para la TH por *splicing* han sido detectadas en humanos, sin embargo no se conoce el significado funcional de estas variantes. Los roedores expresan solo una variante simple de la proteína. Se ha reportado que la estabilidad del ARNm de la TH y su velocidad de traducción se encuentra regulada también, sin embargo la significancia biológica de tal regulación no ha sido determinada.

La TH es sólo uno de los miembros de la familia de hidroxilasas de aminoácidos, otro miembro es la triptófano hidroxilasa, la enzima limitante involucrada en la síntesis de la serotonina.

2.1.2 Catabolismo

Las catecolaminas pueden ser catabolizadas enzimáticamente; sin embargo, es importante enfatizar que la actividad funcional de las catecolaminas liberadas sinápticamente es primordialmente finalizada a través de la captura en la terminal nerviosa. Los productos que emergen de la ruptura enzimática de las catecolaminas incluyen el ácido homovanílico, 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol y el 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicolaldehído (Figura 1). Históricamente, estos metabolitos han sido medidos en el fluido cerebroespinal, plasma sanguíneo y orina como marcadores putativos de la función catecolaminérgica del SNC en trastornos tales como la depresión y la esquizofrenia.

2.1.2.1 Monoamina oxidasa

Las catecolaminas son convertidas a derivados de aldehído por la monoamina oxidasa (MAO), una enzima degradativa que requiere flavin adenina dinucleótido como cofactor (FAD). La MAO se encuentra tanto intra como extracelularmente, su inhibición incrementa las concentraciones intracelulares del neurotransmisor y prolonga la disponibilidad del transmisor liberado sinápticamente. Los inhibidores de la MAO (MAOIs), tales como el tranilcipromina y deprenil, son utilizados clínicamente para tratar la depresión y la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, los usos clínicos de los MAOIs como antidepresivos han sido limitados debido a sus potencialmente serios efectos secundarios, los cuales pueden deberse a la presencia de la MAO en el cerebro y en los tejidos periféricos. Se conocen dos formas de la MAO: MAO_A y MAO_B. Estas formas son derivadas de distintos genes y difieren con respecto a varias propiedades bioquímicas, incluyendo la especificidad del sustrato, localización celular y su regulación por agentes farmacológicos.

2.1.2.2 Catecol Orto Metil Transferasa

Las catecolaminas también pueden ser metabolizadas por la catecol orto metil transferasa (COMT), la cual se encuentra en el espacio sináptico. Esta enzima actúa metilando a las catecolaminas y requiere S-adenosil-metionina como donador del grupo metilo. Los inhibidores de la COMT, tales como entacapone y tolcapone, incrementan los niveles de los neurotransmisores catecolaminérgicos en el espacio sináptico y prolongan la activación de los receptores. En casos raros, los inhibidores de la COMT son coadministrados con L-DOPA para incrementar la función dopaminérgica en individuos con la enfermedad de Parkinson.

2.1.3 Dopamina

La dopamina es uno de los neurotransmisores predominantes en el cerebro de los mamíferos, participando en la regulación de una amplia variedad de funciones, entre ellas la actividad locomotora, la cognición, la emoción, el reforzamiento positivo, la ingesta de alimento y la regulación endocrina (Missale et al., 1998).

Existen tres núcleos dopaminérgicos primarios en el cerebro de la rata, estos son la sustancia nigra compacta (SNc, designada como área A9), el área tegmental ventral (VTA) (área A10) y el núcleo arqueado (ARC). La primera se encuentra íntimamente ligada a la regulación del control motor y el aprendizaje de programas motores y hábitos. La segunda posee gran importancia sobre todo en la vía de la recompensa, específicamente, las conexiones dopaminérgicas entre el VTA con el núcleo acumbens (Acc) parece mediar el reforzamiento y las propiedades de la recompensa de las drogas de abuso. El sistema dopaminérgico neuroendocrino diencefálico comprende distintos grupos de neuronas, incluyendo neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA), incertohipotalámicas (IHDA), periventricular-hipofisiales (PHDA), periventriculares y ventrolaterales (PeVDA). Las neuronas incertohipotalámicas (A13) proyectan al núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) (Figura 3).

La ontogenia y diferenciación de las neuronas dopaminérgicas diencefálicas ocurre a través de cuatro estadios cronológicos que consisten en: 1) Formación de las neuronas de las células precursoras neuroepiteliales, 2) Expresión de enzimas biosintéticas, síntesis de dopamina y sus precursores, desarrollo de los mecanismos de liberación y captura de dopamina, 3) Formación de proyecciones eferentes, y 4) Formación de conexiones aferentes y sinaptogénesis. Para el día 13 de vida embrionaria, estas células comienzan a expresar el ARNm para la tirosina hidroxilasa (TH) (Coulon et al., 1990). Durante la gestación tardía, estas células migran en agrupaciones que se identifican como núcleos hipotalámicos (Ugrumov et al., 1989). Al nacer, estas neuronas son capaces de sintetizar, liberar y recapturar dopamina, aunque en un menor grado que en neonatos o adultos (Borisova et al., 1991). Para el día 9 después del nacimiento, tres distintas poblaciones que presentan inmunoreactividad para TH pueden ser identificadas en el diencefalo, cada una localizada en regiones discretas correspondiendo con los grupos A₁₂, A₁₃ y A₁₄ en animales adultos (Figura 3) (Dahlstroem and Fuxe, 1964, van den Pol et al., 1984). El primer grupo consiste de neuronas unipolares y bipolares, la segunda población se encuentra localizada en la zona incerta y está compuesta en gran parte por neuronas

multipolares con procesos largos altamente ramificados. La tercer población incluye largas neuronas bipolares (Ugrumov et al., 1989). Antes del principio de la pubertad los patrones de distribución y las características morfológicas de las neuronas diencefálicas dopaminérgicas son similares a las de los animales adultos (van den Pol et al., 1984, Borisova et al., 1991). Durante el periodo neonatal (días 3-15) las neuronas dopaminérgicas del ARC, MZI y la substancia nigra de ratas macho y hembra muestran un patrón similar de desarrollo, con los niveles del ARNm de TH incrementados cerca de tres a cuatro veces. La actividad catalítica de la TH en el tallo/eminencia media también incrementa dos a tres veces durante este periodo. Durante los siguientes 20-25 días estos niveles permanecen relativamente constantes hasta el periodo peripubertal (días 30-40) cuando los niveles del ARNm de TH exclusivamente en las neuronas TIDA en el ARC incrementa aproximadamente tres veces en hembras, pero no en machos. Esta diferencia sexual en las neuronas TIDA se mantiene a través de la vida adulta (Arbogast and Voogt, 1991)

2.1.3.1 Almacenamiento de la dopamina

La dopamina almacenada en vesículas sinápticas sirve como un depósito que puede ser liberado por estímulos fisiológicos apropiados. La dopamina es almacenada en pequeñas vesículas localizadas cerca de la sinapsis (Figura 4), donde se encuentran listas para fusionarse con la membrana celular mediante un proceso de exocitosis. El almacenamiento en vesículas de la dopamina tiene dos funciones clave, primero, la capacidad de secuestrar a la dopamina en vesículas retarda su difusión fuera de la neurona y, segundo, el almacenamiento vesicular ofrece una protección de la inactivación metabólica por las enzimas intraneuronales.

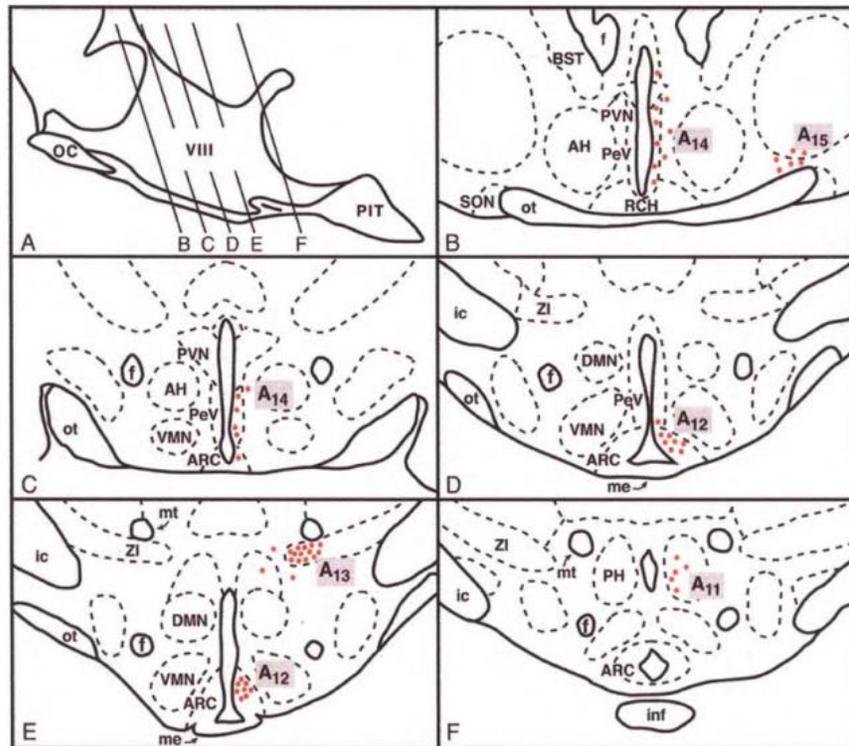


Figura 3. Localización de neuronas dopaminérgicas (A11-A15) que se muestran esquemáticamente en secciones frontales (B-F) a través del diencefalo de la rata. (Tomado del Dopamine Handbook, Elsevier)

2.1.3.2 Transportador de monoaminas vesicular

La habilidad de las vesículas de capturar a la dopamina depende de la presencia del transportador vesicular de monoaminas (VMAT, por sus siglas en ingles). El VMAT es distinto del transportador de membrana en términos de la afinidad al sustrato y localización. Existen dos transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT1 y VMAT2), el que se expresa en el cerebro y es responsable del transporte de la dopamina hacia la vesícula es el VMAT2.

2.1.3.3 Liberación de dopamina

La liberación de dopamina es un proceso que típicamente depende de Ca^{2+} , por lo que la entrada de calcio a la terminal sináptica desencadena la fusión de las vesículas dopaminérgicas y la liberación al espacio sináptico de la dopamina, misma que en ese momento puede actuar sobre receptores dopaminérgicos.

2.1.3.4 Regulación de síntesis y liberación de dopamina por autorreceptores

Las enzimas que controlan la síntesis de la dopamina pueden ser reguladas por modificaciones a nivel transcripcional y postranscripcional que alteran la actividad enzimática; también, la síntesis puede ser regulada por la interacción de la dopamina liberada de la terminal mediante autoreceptores específicos que se encuentran localizados sobre la misma terminal. Los autoreceptores existen en la mayor parte de la neurona, incluyendo el soma, dendritas y las terminales nerviosas. Los tres tipos de autoreceptores dopaminérgicos pertenecen a la familia D2-like que comprende a los receptores D2, D3 y D4. La dopamina que es liberada de la terminal sináptica puede interactuar con un autoreceptor e inhibir la liberación de la misma dopamina. Los autoreceptores dopaminérgicos también regulan directamente la síntesis de dopamina, por lo que agonistas dopaminérgicos disminuyen su síntesis, mientras antagonistas dopaminérgicos la incrementan.

2.1.3.5 Inactivación de la neurotransmisión dopaminérgica

La continua estimulación de los receptores neuronales no es una condición deseable por dos motivos. El primero, es que la actividad normal de las neuronas no es continua, sino que fluctúa con neuronas que algunas veces están activas y otras no, por lo que la estimulación continua no proporcionaría la información concerniente a la actividad de la neurona presináptica de manera exacta a la siguiente célula. La segunda razón es que la estimulación continua es típicamente patológica, resultando en un daño y la pérdida de la neurona postsináptica. De hecho, el principio para todos los neurotransmisores es simple, por lo que la activación continua del receptor celular blanco no transporta la información apropiada sobre el estado dinámico de la neurona presináptica. Existen varios mecanismos diferentes para terminar la acción de la dopamina, la simple difusión fuera del área donde se localiza el receptor seguido por la dilución en el fluido extracelular o plasma para disminuir su concentración. Los mecanismos críticos son modos activos para terminar la transmisión, incluyendo la captura de la dopamina por un transportador asociado a la membrana. En turno, esto puede ser seguido por el transporte de la dopamina al interior de las vesículas de almacenamiento o ser catabolizada por la MAO (en

membranas mitocondriales) o directamente por la COMT. La inactivación enzimática es el mecanismo predominante por el cual la dopamina es inactivada, juega un papel relevante en la terminación de la acción de la dopamina y, ciertamente, de la mayoría de los neurotransmisores debido a que termina la acción de las catecolaminas circulantes.

La captura de la dopamina liberada por la neurona a través del transportador a dopamina (DAT) es el principal modo de inactivación de ésta en el cerebro. En adición, la acumulación de la dopamina también permite a las enzimas intracelulares actuar y degradarla, así refuerzan la acción de las enzimas extracelulares. El proceso de captura es saturable y dependiente de energía, además de que requiere de la presencia de un cotransportador de Na⁺ así como de Cl⁻ extracelular (Byrne, 2004).

2.1.4 Receptores dopaminérgicos

Los receptores a dopamina forman parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Tabla 1) y se dividen en dos familias, la familia D1-like formada por los receptores D1 y D5, mientras que la familia D2-like la conforman los receptores D2, D3 y D4. Los receptores de la familia D1-like se encuentran acoplados a proteínas Gs, es decir estimulan a la adenilil ciclasa e incrementan la concentración de cAMP; mientras que los receptores de la familia D2-like se acoplan a proteínas Gi/o que inactivan a la adenilil ciclasa y disminuyen los niveles de cAMP (Figura 4).

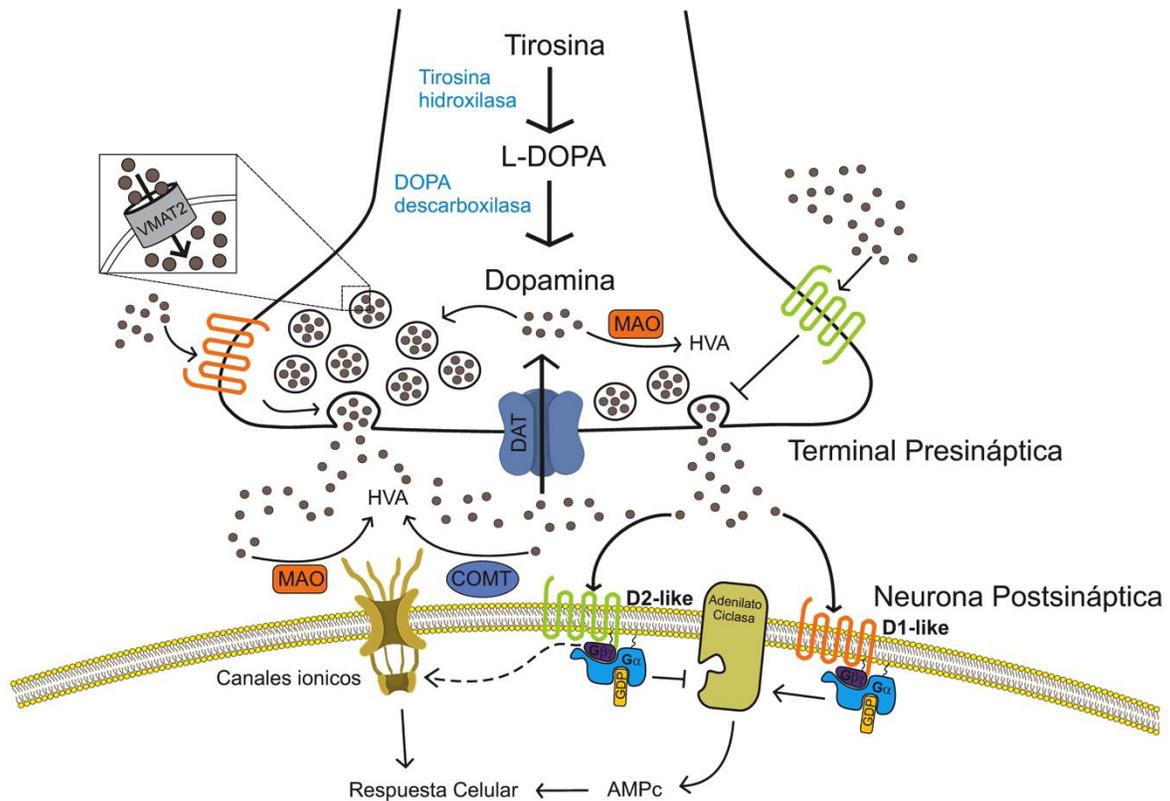


Figura 4. Modelo de sinapsis dopaminérgica. Entidades moleculares presinápticas y postsinápticas asociadas con la síntesis, liberación, señalización y recaptura de la dopamina. Note que la tirosina hidroxilasa (TH) es transportada a la terminal sináptica por lo que la dopamina puede ser sintetizada en ella. También es importante destacar que los receptores de la familia D2-like (D2, D3 y D4) se encuentran tanto presinápticamente como postsinápticamente, en el primer caso actúan como autoreceptores para inhibir la liberación de la dopamina, mientras que en el segundo asisten en la vía de señalización intracelular. VMAT, transportador de monoaminas vesicular; MAO, oxidasa de monoaminas; COM, catecol-orto-metil transferasa; AMP_c, monofosfato de adenosina cíclico; HVA, ácido homovalínico (Modificado de Kandell, 2000).

2.1.5 Vía de señalización del receptor a dopamina D4

La transducción de señales se refiere al proceso por medio del cual las señales intercelulares como los neurotransmisores (como la dopamina) producen alteraciones bioquímicas intracelulares modificando el funcionamiento neuronal. Todos los receptores catecolaminérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. A continuación hablaremos de la vía de señalización de los receptores de la familia D2-like, específicamente del D4R, debido a que es el receptor sobre el que se enfoca el presente trabajo.

La vía de señalización del receptor D4 inicia con la unión de la dopamina al receptor en la cadena amino terminal extracelular, esto inicia un cambio conformacional en el receptor que permite la activación de la proteína G_i a la que se encuentra acoplado; es así como del heterotrímero α - $\beta\gamma$ se desacopla y la subunidad α inactiva a la adenilil ciclasa, lo que disminuye las concentraciones intracelulares de cAMP, esto inactiva a la proteína-quinasa dependiente de cAMP (PKA), la cual deja de fosforilar canales de Ca^{2+} tipo L, lo que trae como resultado la disminución de la concentración de calcio intracelular, inhibiendo así la fusión de vesículas que transportan neurotransmisores con la membrana plasmática, es decir disminuyendo la liberación de neurotransmisor a nivel presináptico. Adicionalmente, la subunidad α inhibe canales de K^+ dependientes de voltaje, hiperpolarizando a la neurona. Por su parte, la subunidad $\beta\gamma$ se ha relacionado con la activación de la vía de las MAP-quinasas (Luttrell et al., 1995, Touhara et al., 1995, Oak et al., 2001, Lavine et al., 2002, Bitner et al., 2006) (Figura 5).

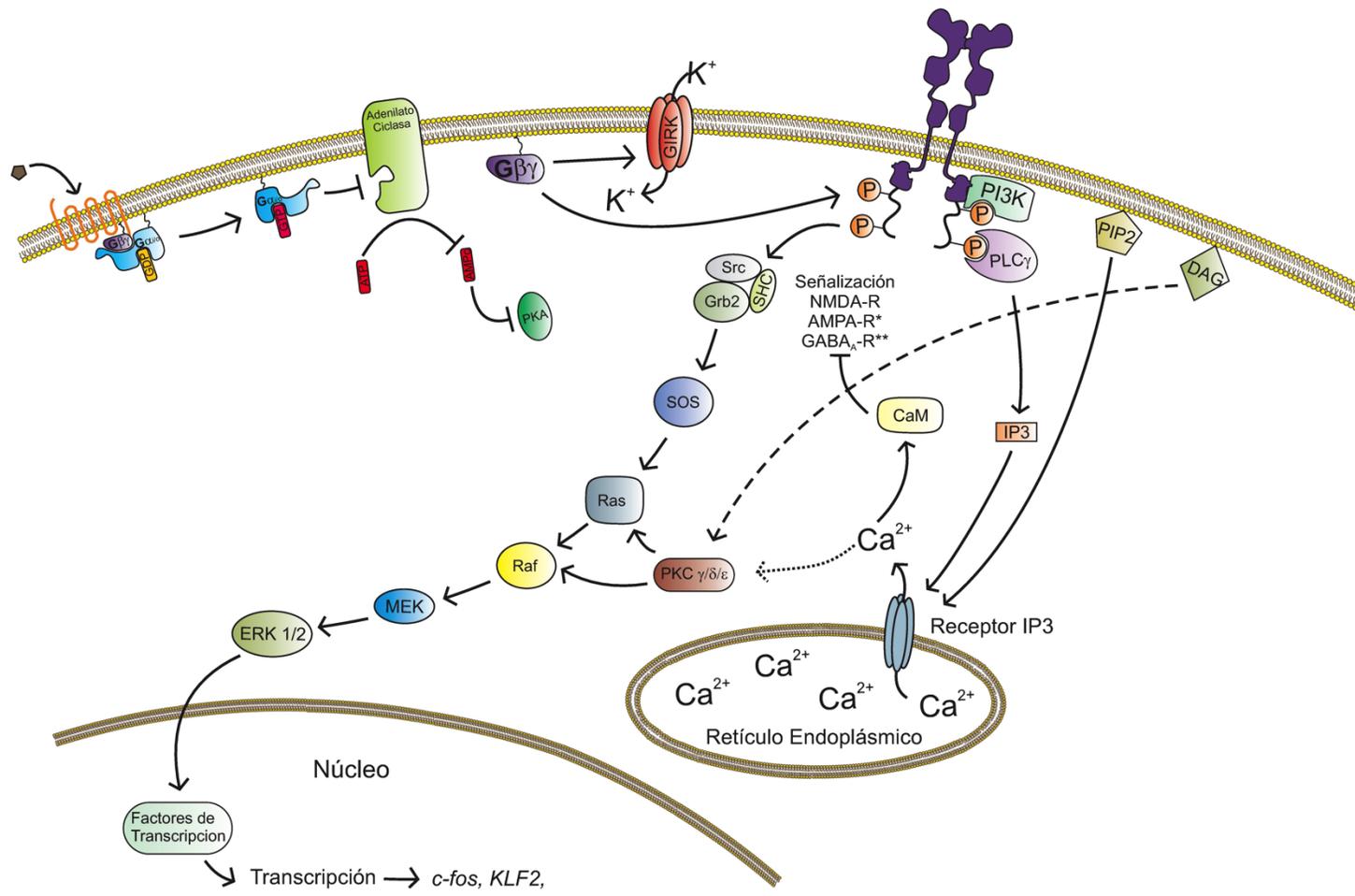


Figura 5. Vía de señalización del receptor dopaminérgico D4. Cuando se activa el receptor a dopamina, la subunidad α liberada inactiva a la adenilil ciclasa, disminuyendo los niveles de cAMP y disminuyendo la activación de la PKA, evitando la fosforilación de canales de Ca^{2+} . Con la disminución de la entrada de calcio se inhibe la liberación de neurotransmisor de la terminal sináptica. Además, la subunidad α también inactiva canales de K^+ , mientras que la subunidad $\beta\gamma$ puede activar la vía de las MAP-cinasas.

Tabla 1. Receptores dopaminérgicos, señalización, agonistas y antagonistas.

Subtipo de receptor	Información estructural	Vía de señalización	Agonistas (Ki, nM)	Antagonistas (Ki, nM)
D1	446 a.a.	G _s (incrementa [AMP _C]) G _q (activa PLC) ↑ Canales de Ca ²⁺ Tipo L ↓ Corrientes de K ⁺	Dopamina (2300 nM) SKF 38393 (1 nM)	SCH 23390 (0.2 nM) SCH 39166 (1.2 nM) LE300 (0.5 nM)
D5	477 a.a.	G _s (incrementa [AMP _C]) ↑ Canales de Ca ²⁺ Tipo L	Dopamina (50-500 nM) SKF 38393 (0.5 nM) A 68930 (2.1 nM)	SCH 23390 (0.3 nM) SCH 39166 (2.0 nM)
D2	443 a.a.	G _{i/o} (disminuye [AMP _C]) G _{i/q} (incrementa [IP ₃]/[DAG]) ↑ Liberación de ácido araquidónico ↓ Corrientes de Na ⁺	Dopamina (2000 nM) Quinelorane (5.7 nM) Quinpirole (4.8 nM)	L 741626 (2.4 nM) Risperidona (3.13 nM)
D3	400 a.a.	G _{i/o} (disminuye [AMP _C]) ↑ Corrientes de K ⁺	Dopamina (30 nM) PD 128907 (2.3 nM) Quinelorane (3.4 nM) Quinpirole (~ 24 nM)	Nafadotride (0.52 nM) GR 103691 (0.3 nM) NGB 2904 (0.5 nM)
D4	419 a.a.	G _i (disminuye [AMP _C]) ↓ Canales de Ca ²⁺ Tipo L ↓ Corrientes de K ⁺	Dopamina (5-50 nM) PD 168077 (8.7 nM) Quinpirole (~ 30 nM)	L 745870 (0.43 nM) L 741742 (3.5 nM)

2.2. Control hipotalámico de la alimentación

La alimentación es un proceso altamente complejo que involucra sistemas periféricos: leptina, insulina, ghrelina, CCK, entre otros; así como sistemas centrales: NPY, dopamina, serotonina, endocannabinoides, GABA, glutamato, etc. (Schwartz et al., 2000, Morton, 2006, Berthoud and Morrison, 2008, Valassi et al., 2008). Para la regulación central de la alimentación se requiere de la actividad de diversas regiones, especialmente el hipotálamo, el cual se encarga de la función integrativa de la regulación de las necesidades fisiológicas como mantener la osmolaridad sanguínea y el tono vasomotor, regular la temperatura corporal, el control hormonal relacionado con la reproducción, las respuestas emergentes al estrés, así como el metabolismo energético mediante la regulación de la alimentación, digestión y la tasa metabólica (Kandel, 2000). El hipotálamo consta de diferentes grupos nucleares, entre ellos, se encuentran el núcleo arqueado (ARC), dorsomedial (DMN), ventromedial (VMN), lateral (LH) y paraventricular (PVN); este último es considerado el centro integrador de los mecanismos responsables de la regulación (homeostática) de la ingesta de alimento y el gasto energético, debido a que recibe aferentes de los demás núcleos hipotalámicos que transportan neuropéptidos y neurotransmisores involucrados con la ingesta de alimento de manera positiva (orexigénicos, es decir que incrementan la ingesta de alimento) y de manera negativa (anorexigénicos, que inhiben la ingesta alimentaria) (Morton, 2006).

El papel del hipotálamo en el control del peso corporal fue establecido por estudios con lesiones (Brobeck, 1948, Anand and Brobeck, 1951), quienes mostraron que lesiones en el VMN causaban hiperfagia y obesidad; por otro lado, lesiones en el LH causaban hipofagia e incluso la muerte por inanición. Por este motivo, se le denominó al VMN como el “centro de la saciedad” y al LH como el “centro del hambre”, actualmente la idea de centros especializados no es aceptada, pues se sabe que todos los núcleos del hipotálamo tienen un papel importante en la

regulación de la homeostasis energética, ya que existen muchos neuropéptidos y neurotransmisores orexigénicos y anorexigénicos.

Existen estudios que han relacionado a la dopamina hipotalámica con la regulación de la transmisión GABAérgica (Azdad et al., 2003) y glutamatérgica (Price and Pittman, 2001). Además, existen estudios que relacionan a la dopamina con el control del receptor serotoninérgico 5-HT_{2A} (Laprade et al., 1996) y de NPY (Li and Pelletier, 1986), razón por la cual es importante hablar de estos neurotransmisores y neuropéptidos respectivamente.

2.2.1. GABA (Ácido γ amino butírico)

Los dos transmisores que tienen mayor influencia sobre la transmisión sináptica en el hipotálamo sin duda alguna son el GABA y el glutamato. La activación de receptores GABA_A y el bloqueo de receptores a glutamato con agonistas y antagonistas selectivos, respectivamente, generalmente elimina la mayoría, si no es que toda, la actividad sináptica evocada en rebanadas de hipotálamo o cultivos, además se sabe que vesículas que contienen estos neurotransmisores, también contienen neuropéptidos, en los mismos botones hipotalámicos (van den Pol, 2003). La administración intracerebroventricular (i.c.v.) o la microinyección en núcleos hipotalámicos de un agonista para el receptor GABA_A como el muscimol estimula la alimentación, respuesta que puede ser bloqueada por el antagonista específico al receptor GABA_A, bicuculina (Stratford and Kelley, 1997). Por otro lado, la administración i.c.v. y sistémica de baclofen, un agonista selectivo del receptor GABA_B, causa un incremento en la ingesta de alimento en ratas y cerdos no privados y dicho incremento es prevenido por el pretratamiento con el antagonista del receptor GABA_B el phaclofen (Ebenezer and Baldwin, 1990).

Las neuronas del ARC expresan la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), de la misma manera que el ARNm que codifica para el transportador vesicular de GABA (VGAT)(Ovesjo et al., 2001). Usando técnicas de inmunohistoquímica se ha mostrado inmunoreactividad para GAD (Horvath et al., 1997, Ovesjo et al., 2001) y

GABA (Ovesjo et al., 2001) en la mayoría de las neuronas que expresan NPY/AgRP localizadas en la parte ventromedial del ARC. Por lo menos el 50 % de los botones sinápticos en el núcleo supraquiasmático, núcleo supraóptico, ARC y PVN son GABAérgicos (Decavel and Van den Pol, 1990). Lo anterior no es sorprendente dado el papel del GABA hipotalámico en la modulación de las hormonas de la pituitaria como la hormona adrenocotricotrópica (ACTH), gonadotropinas, hormona del crecimiento (GH), hormona estimulante de la tiroides o tirotrópica (TSH), hormona estimulante de los melanocitos α (α -MSH), vasopresina (VP) y oxitocina (OX)(Decavel and Van den Pol, 1990). Por otro lado se sabe que la zona peri-PVN recibe proyecciones GABAérgicas del septum lateral (LSEP), la amígdala medial (MEA), el núcleo supraquiasmático (SCN) y del núcleo ventromedial del hipotálamo (VMN). De igual manera, la zona sub-PVN recibe proyecciones GABAérgicas del VMN, LH y la estría terminalis (BST) (Herman et al., 2002).

2.2.2 Glutamato

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante para la regulación neuroendocrina del hipotálamo (Meister, 2000). La inyección de glutamato en el LH rápidamente produce una intensa alimentación en ratas saciadas (Stanley et al., 1993), en tanto que la administración del antagonista para receptores a NMDA el D-AP5 suprime la alimentación producida por NMDA (Stanley et al., 1996). La respuesta producida por la inyección de glutamato en el LH puede ser explicada por el papel excitatorio de glutamato sobre neuronas orexigénicas que sintetizan la hormona concentradora de melancortina (MCH) e hipocretina/orexina, no obstante también se ha reportado que aproximadamente el 50 % de las neuronas que expresan hipocretina/orexina también contienen el transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2) (Ziegler et al., 2002), lo que sugiere que el glutamato local excita neuronas orexigénicas del LH. Estudios inmunohistoquímicos de doble marcaje han mostrado la presencia de inmunoreactividad contra el VGLUT2 en cuerpos celulares que contienen POMC/CART en el ARC. Además, se sabe de la

colocalización del VGLUT2 y de la hormona estimulante de los melanocitos α (α -MSH) en un gran número de terminales nerviosas en los campos de proyección de neuronas que expresan pro-opiomelanocortina (POMC) en varias zonas del cerebro, sugiriendo una interacción del glutamato y la α -MSH (Meister, 2000). Con respecto a estudios relacionados con la ingesta de alimento el tratamiento con antagonistas AMPA/Kainato como NBQX, CNQX y CNQX-ds incrementaron la ingesta de alimento cuando se administraron localmente en el PVN (Hettes et al., 2003). Por otro lado se ha demostrado que la administración local de NMDA en el PVN incrementa la ingesta de alimento cuando se administra en la mitad de la fase del luz del ciclo luz/oscuridad (Stanley et al., 1993). De acuerdo con lo anterior se han encontrado los ARNm's que codifican para las subunidades NMDAR1, NMDAR2A, NMDA2B y NMDA2D en el PVN, así como las subunidades para los receptores AMPA (GLUR1, GLUR2, GLUR3, GLUR4) y Kainato (GLUR5, GLUR6 y KA2) (Herman et al., 2000).

2.23 CRH y glucocorticoides

El eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) es de suma importancia para la homeostasis y puede ser activado por una amplia variedad de estresores. La evidencia sugiere que si los mecanismos centrales por los cuales los estresores activan el eje HPA puede diferir dependiendo de su naturaleza, la respuesta final de la activación del eje HPA, e.g. el incremento en los niveles de glucocorticoides (corticosterona en ratas) en plasma es similar entre los diferentes tipos de estresores. El PVN contiene neuronas magnocelulares (13-19 μ m) que sintetizan OX y VP, estas proyectan hacia la pituitaria posterior; además, en el PVN se localizan neuronas parvocelulares (6-9 μ m) que sintetizan CRH y TRH, las cuales proyectan a la pituitaria anterior. La primera respuesta neuroendocrina al estrés es la descarga de CRH en la eminencia media que alcanza la vasculatura portal hipofisial con lo cual CRH activa la síntesis y liberación de ACTH en la adenohipófisis (pituitaria anterior) que a su vez alcanza la corteza adrenal (adrenales) para incrementar la síntesis y liberación de glucocorticoides. Los

glucocorticoides a su vez pueden retroalimentar negativamente a diferentes niveles, por ejemplo, a nivel de las células corticotropas (pituitaria) para inhibir la síntesis y liberación de ACTH, así mismo pueden hacer lo propio en las neuronas que sintetizan CRH; por último, los glucocorticoides pueden alcanzar otros sitios en el cerebro que involucran proyecciones directas o indirectas (que hagan relevo en neuronas que proyectan de manera directa) hacia las neuronas CRH del PVN (Figura 6). De esta manera los glucocorticoides pueden modular la respuesta al estrés (Watts, 2005).

La importancia de la CRH para el presente trabajo radica en que la administración central de CRH inhibe la ingesta de alimento y reduce el peso corporal en ratas (Vettor et al., 2002). La administración periférica de CRH humana incrementa el gasto de energía y la oxidación de grasa en humanos (Smith et al., 2001). Por otra parte, la infusión de leptina estimula la expresión de CRH, mientras que el pretratamiento con un antagonista CRH atenúa la reducción en la ingesta de alimento y el peso corporal inducido por leptina (Masaki et al., 2003).

2.2.4 TRH

La hormona liberadora de tirotropina (TRH), un tripéptido amida (pGlu-Hist-ProNH₂) fue originalmente aislada y caracterizada por su acción como una hormona liberadora envuelta en la regulación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT). La TRH es sintetizada por las neuronas parvocelulares del PVN (del mismo modo que la CRH) cuyas proyecciones alcanzan la eminencia media, en ese punto la TRH pasa por la vasculatura portal hipofisial para activar la síntesis y liberación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en la adenohipófisis, por su parte la TSH estimula la síntesis de tiroxina (T₄) en la tiroides, la T₄ sirve como precursor para obtener la triyodotironina (T₃) por acción de la 2 iodotiroina deiodinasa (D₂). Cabe destacar que la TSH estimula la liberación de T₄ y T₃, esta última inhibe la síntesis de TRH en las neuronas del PVN y también inhibe a las células tirotropas (que secretan TSH) para completar lo que se conoce como un ejemplo clásico de retroalimentación negativa. Las hormonas tiroideas tienen un

papel importante en la regulación del gasto de energía primordialmente a través de efectos en la termogénesis obligatoria y la termogénesis adaptativa (Lechan and Fekete, 2006).

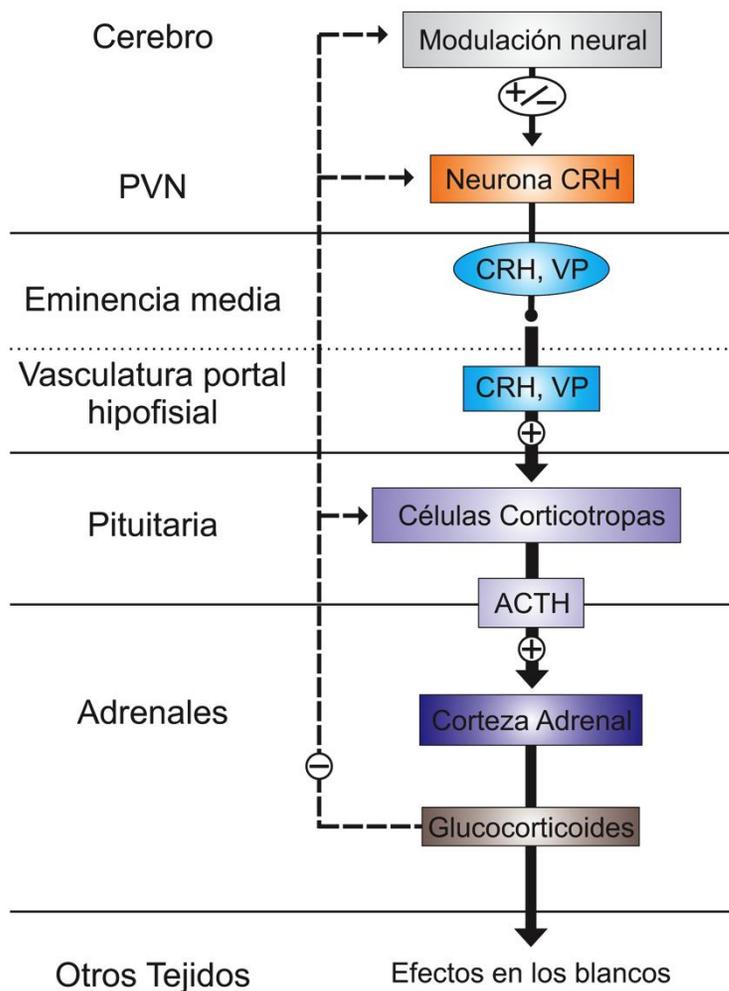


Figura 6. Estructura del eje HPA, los glucocorticoides al final del eje actúan como una señal de retroalimentación negativa a diferentes niveles: células corticotropas, neuronas CRH y sus sistemas aferentes neurales.

La administración central de TRH o sus análogos consistentemente reducen la ingesta de alimento y el tiempo de interacción con la comida en todos los modelos animales estudiados (Vijayan and McCann, 1977, Vogel et al., 1979, Morley, 1980, Suzuki et al., 1982, Horita, 1998, Steward et al., 2003). Esto incluye la reducción

en la ingesta de alimento en animales bajo condiciones de alimentación *ad-libitum*, animales que han sido sujetos a ayuno y luego se les da acceso al alimento (programa de restricción de alimento), tanto como en modelos de alimentación inducida por estrés. El efecto no es dependiente de las catecolaminas ya que la depleción de las catecolaminas con 6-hidroxidopamina no bloquea la acción de TRH para reducir la ingestión de alimento (Vogel et al., 1979). La expresión de TRH en el PVN es provocada por α -MSH, e inhibida por NPY y AgRP, ambos neuropéptidos parecen participar en el desarrollo del hipotiroidismo central que ocurre durante el ayuno (Fekete et al., 2004). En roedores, la leptina incrementa la secreción de TRH, mientras TRH inhibe la liberación de leptina. Interesantemente, se ha correlacionado una hiperactividad de TRH con hipertensión en ratas, de esta forma, se ha sugerido una correlación entre la obesidad y una elevada presión sanguínea, que puede deberse en parte por la vía Leptina-TRH (Garcia et al., 2002). Por otra parte, la administración directa de TRH en el hipotálamo medial y el núcleo accumbens, regiones que contienen terminales axónicas con TRH pueden inducir anorexia (Suzuki et al., 1982).

2.2.5 Neuronas neurosecretoras del PVN

Existen dos poblaciones neuronales en el PVN de las cuales ya se habló anteriormente, las neuronas magnocelulares (OX, VP) y las neuronas parvocelulares, dentro de estas últimas, se pueden distinguir las neuronas neurosecretoras (CRH, TRH) de las neuronas parvocelulares preautonómicas no-neurosecretoras (que proyectan a la espina dorsal). Previos estudios revelaron que las neuronas magnocelulares (Tipo I) difieren electrofisiológicamente de las neuronas parvocelulares (Tipo II), pero no se distinguía entre las neuronas parvocelulares neurosecretoras de las no-neurosecretoras (Hoffman et al., 1991, Tasker and Dudek, 1991, Luther and Tasker, 2000). Las neuronas parvocelulares del tipo II se identifican electrofisiológicamente por la ausencia de una rectificación transiente de salida, la cual es característica de las neuronas magnocelulares del tipo I (Hoffman et al., 1991, Tasker and Dudek, 1991). Las neuronas

parvocelulares no-neurosecretoras presentan un pico de bajo umbral (LTS, Low Threshold Spike) y una corriente de Ca^{2+} tipo T robusta (Figura 7, B), mientras que las neuronas neurosecretoras no muestran el LTS ni la corriente T (Figura 7, A) (Luther et al., 2002).

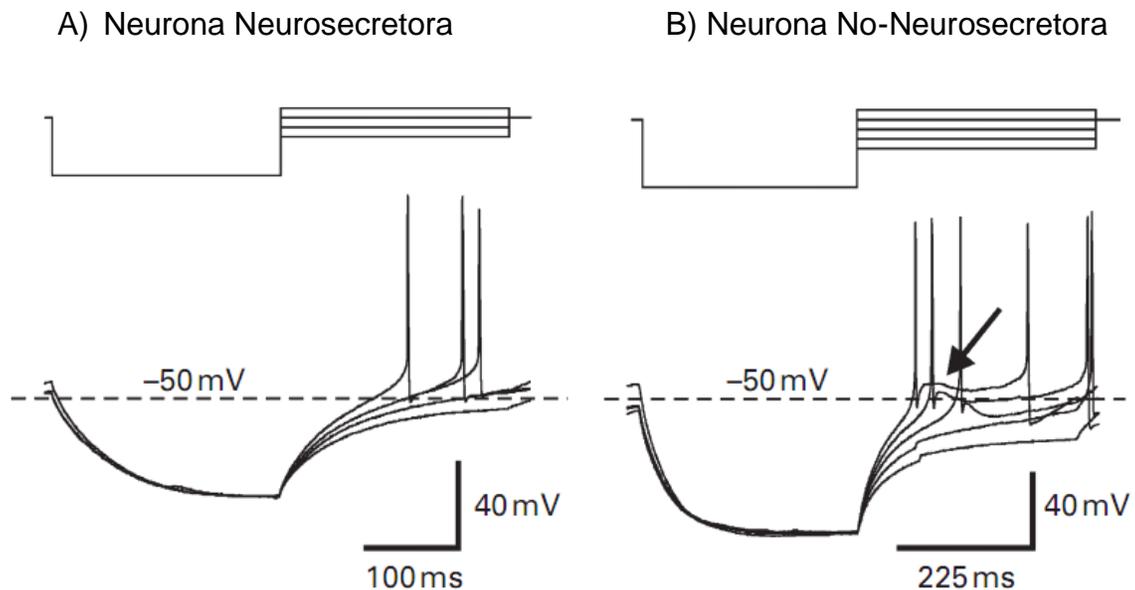


Figura 7. Propiedades electrogénicas de las neuronas parvocelulares del PVN. A) Una neurona parvocelular responde a pulsos de corriente despolarizante (30-45 pA) de un potencial de membrana de -95 mV con carga electrotrónica de la membrana, pero no genera el pico de bajo umbral (LTS), esta célula fue positivamente etiquetada con fluorogold y por tanto fue clasificada como neurosecretora. B) Una neurona parvocelular genera un LTS de aproximadamente 10 mV (flecha) en respuesta a pulsos de corriente despolarizante (35-55 pA) hasta un potencial de membrana negativo de -100 mV. Esta célula fue fluorogold negativa, o no-neurosecretora (Tomado de (Luther et al., 2002)).

2.2.6 Dopamina y receptores dopaminérgicos en el Hipotálamo

Como se mencionó anteriormente, varias son las zonas que envían proyecciones dopaminérgicas al hipotálamo, no obstante en el hipotálamo también existen neuronas que expresan TH. Estas se encuentran distribuidas en el PVN, DMN,

ARC y VMN de roedores (Meister et al., 1990, Goldstein et al., 2007, Mravec et al., 2007, Oliva and Manzanares, 2007). En primates la TH se expresa en el PVN (Tillet and Kitahama, 1998).

Con respecto a los receptores, en la literatura encontramos varios estudios que muestran que los receptores de la familia D2-like se encuentran ampliamente distribuidos dentro de los núcleos hipotalámicos vinculados con la homeostasis de energía. Por ejemplo el D2R se encuentra en el DMH, VMH y LH (Bouthenet et al., 1987), así como en el PVN, ARC, el núcleo preóptico medial (SON), SCN, y el área hipotalámica anterior (AHA) (Brock et al., 1992). Por su parte el ARNm del D2R se encuentra expresado en el ARC, el área hipotalámica anterior, en su parte posterior (AHP), el PVN en su parte medial parvocelular y en su parte posterior.

Con respecto del receptor a dopamina D3 se tiene muy pocos estudios en la literatura acerca de su localización en el hipotálamo, sin embargo, se sabe que el ARNm que codifica para el receptor D3 se expresa en el PVN en su parte medial parvocelular y en su parte posterior, así como en el VMN (Bouthenet et al., 1991). Sin embargo, un estudio con doble inmunofluorescencia reveló que los receptores D2, D3 y D4 se encuentran presentes en neuronas oxitocinérgicas del SON, PVN y del área preóptica medial (MPOA) (Baskerville et al., 2009). El receptor D3 se encuentra involucrado sobre todo en la erección del pene en ratas, ya que el agonista selectivo del D3R pramipexole indujo esta respuesta cuando se administró localmente en el PVN (Sanna et al., 2012).

Otros estudios por autoradiografía en humanos han mostrado que los receptores D2 y D3 se encuentran presentes en el PVN y en el DMN (Rieck et al., 2004).

El receptor D4 se encuentra expresado en el PVN, los primeros estudios que demostraron su presencia en este núcleo se realizaron con anticuerpos monoclonales contra el D4R, estos ensayos mostraron la presencia del receptor D4 en el núcleo paraventricular del hipotálamo en neuronas magnocelulares y

parvocelulares (Defagot et al., 1997). Al respecto, se ha reportado que los receptores D4 presentes en el PVN son funcionales, ya que en el análisis de la inmunoreactividad para *c-Fos*, después de la administración sistémica del agonista selectivo para el D4R, PD-168077, mostró un incremento significativo en la expresión de *c-Fos* (Bitner et al., 2006).

2.2.7 Receptores dopaminérgicos e ingesta de alimento

Se ha demostrado que tanto los receptores de la familia D1-like como los de la familia D2-like tienen efectos sobre la ingesta de alimento, colocando de esta manera a la dopamina y a los agonistas dopaminérgicos como posibles herramientas farmacológicas para el tratamiento farmacológico de los desórdenes de la homeostasis energética. Uno de los primeros fármacos utilizados para el tratamiento de la obesidad fue la anfetamina, cuyos efectos en humanos en su momento fueron sorprendentes, al respecto estudios en ratas demostraron su efecto anorexigénico (Leibowitz, 1975), sin embargo dentro de los principales problemas asociados al uso de este fármaco para el control del peso corporal, encontramos su capacidad de producir adicción, por otra parte las personas tratadas con anfetaminas realmente dejan de comer debido a una hiperactividad general, por tal motivo, se ha prohibido el uso de las anfetaminas como tratamiento para la obesidad (Bray and Greenway, 1999).

Más recientemente, empleando el modelo de ratones deficientes a dopamina (DD) se mostró que la ausencia de dopamina produce hipofagia e hipoactividad, sugiriendo fuertemente que la dopamina es necesaria para el inicio de la alimentación (Zhou and Palmiter, 1995). Por otro lado, la inhibición de la síntesis de dopamina con α -metil-p-tirosina (α -MPT) disminuye la ingesta de alimento en ratas, de manera contraria, el precursor de la dopamina la L-DOPA la incrementa (Friedman et al., 1973). De esta manera, la dopamina puede tener efectos contrastantes, posiblemente debido a la activación de cierto tipo de receptores dopaminérgicos en particular, tanto de la familia D1-like como de la familia D2-like.

Por ejemplo, la administración de un agonista selectivo para los receptores D1, el SKF 38393, reduce el número de episodios alimentarios totales, así como la duración total de la alimentación y la tasa local de alimentación (Cooper et al., 1990). Otros estudios han demostrado que los efectos anorexigénicos del agonista para el receptor D2, el N 0437, se producen a través de una reducción selectiva de la tasa local de alimentación (Rusk and Cooper, 1989). En investigaciones con el agonista D1R, el SKF 38393, y el agonista D2-like, quinpirole, mostraron que el SKF 38393 aumenta la preferencia por la comida palatable, mientras que el quinpirole la disminuye (Cooper and Al-Naser, 2006). Un estudio muy interesante en el que emplearon el modelo de obesidad inducida por dieta alta en grasas (cDIO), mediante la técnica de hibridación *in situ* se demostró que los niveles de ARNm del receptor D4 en el PVN fueron significativamente más altos en los ratones cDIO respecto del grupo de ratones resistentes a la obesidad (cDR) y los ratones alimentados con una dieta baja en grasas (LF) (Huang et al., 2005).

Actualmente no se ha determinado si los cambios en la expresión de receptores dopaminérgicos en modelos de obesidad inducida son causa o consecuencia de la misma, por lo que son necesarios estudios que dilucidan el papel de cada uno de los subtipos de receptores dopaminérgicos tanto en condiciones fisiológicas normales como en condiciones patológicas; de esta forma se tendrá un amplio conocimiento del posible papel de cada uno de estos en el circuito hipotalámico que regula la homeostasis energética. Al respecto nuestro grupo de trabajo ha mostrado que cuando se activa a los receptores D4 en el PVN con el agonista selectivo PD-168077 se incrementa la ingesta de alimento en la segunda hora de registro, efecto bloqueado por el pretratamiento con el antagonista selectivo de los D4R, L-745870 (Figura 8) (Tejas-Juárez, 2008).

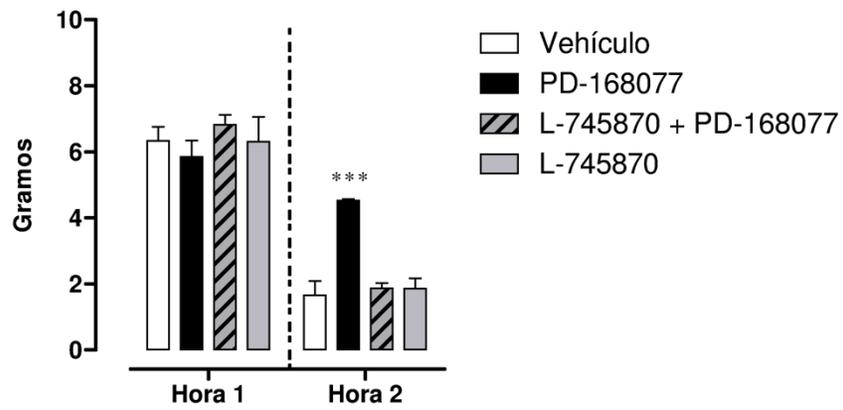


Figura 8. Ingesta de alimento cuando se activa de manera selectiva al D4R. Note que el efecto de la activación del D4R es bloqueado con el pre tratamiento con el antagonista selectivo L-745870, el antagonista por sí mismo no tuvo efecto alguno. *** $p < 0.001$.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Actualmente se ha observado un incremento de las enfermedades relacionadas con la conducta alimentaria. Los padecimientos que afectan cada vez a un mayor número de personas en nuestro país son la obesidad y el sobrepeso (INSP, 2012). Especialmente la obesidad, además de disminuir la calidad de vida de la persona, constituye un factor de riesgo para el desarrollo de diversas enfermedades (diabetes tipo 2, dislipidemias, hipertensión arterial, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otras) que incrementan el costo en los servicios de salud y los índices de mortalidad en la población (Oliver, 2006, Fazio et al., 2010, Bullon et al., 2014).

Dado lo anterior, el estudio sistemático de los mecanismos neuroquímicos y conductuales que regulan la alimentación y la homeóstasis de energía, así como en la implementación y el mejoramiento de las estrategias terapéuticas para el tratamiento de la obesidad es muy importante. En los últimos años se han realizado diversos estudios que muestran que la dopamina y sus receptores están involucrados en el control de la conducta alimentaria (Terry et al., 1995) y, en general, se ha aceptado que la activación de los receptores dopaminérgicos es una condición necesaria para el inicio de la alimentación (Zhou and Palmiter, 1995). No obstante se tiene conocimiento de que la regulación dopaminérgica de la alimentación es más compleja de lo que se había reportado, ya que la dopamina también puede producir efectos inhibitorios sobre la alimentación (Leibowitz, 1975, Kuo, 2002, Kaelin et al., 2004, Hsieh et al., 2005). Así, el esclarecimiento de dicha paradoja favorecería el mejoramiento de los actuales tratamientos contra la obesidad. Concretamente, el presente estudio sería uno de los primeros en caracterizar el mecanismo neuroquímico por medio del cual la activación específica de los receptores D4 incrementa la ingesta de alimento (Tejas-Juárez, 2008). Al respecto, se sabe que el PVN recibe proyecciones glutamatérgicas y GABAérgicas provenientes de zonas intrahipotalámicas y extrahipotalámicas

(Csaki et al., 2000, Herman et al., 2002, Herman et al., 2004). En algunas de estas zonas se expresa el ARNm que codifica para el receptor D4 (Huang et al., 2005), por lo que, es probable que el receptor D4 se exprese de manera presináptica en estas terminales y module la neurotransmisión de glutamato y/o GABA. Cabe destacar que tanto muscimol como NMDA han tenido efectos sobre la ingesta de alimento cuando se administran de manera local en el PVN (Stanley et al., 1993, Pu et al., 1999). En el PVN hay neuronas que sintetizan CRH, mismas que reciben inervación glutamatérgica y GABAérgica (Fekete et al., 2002, Wittmann et al., 2005), aunado a lo anterior, dichas neuronas se consideran el primer paso para activar el eje HPA, con el consecuente incremento de corticosterona al final del mismo (Watts, 2005). De tal forma, si el receptor D4 estuviese modulando la neurotransmisión glutamatérgica y/o GABAérgica en el PVN, es probable que una parte de esta regulación pudiera afectar la actividad de las neuronas que sintetizan CRH, con un posible efecto río abajo sobre los niveles de corticosterona al final del eje HPA.

Dado lo anterior, surgen las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuál es el mecanismo neuroquímico del incremento en la ingesta de alimento cuando se activan a los receptores a dopamina D4 en el núcleo paraventricular del hipotálamo? ¿En nuestras condiciones de estudio, que neurotransmisor se encuentra relacionado con la ingesta de alimento: GABA o glutamato? ¿Es posible que un agonista glutamatérgico o GABAérgico pudiera revertir el efecto hiperfágico de la activación de los receptores D4? ¿La activación de los receptores D4 en el PVN tiene algún efecto sobre el eje HPA?

Para resolver tales interrogantes, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el mecanismo neuroquímico por medio del cual la activación de los receptores a dopamina D4 incrementa la ingesta de alimento en ratas.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar si la activación de los receptores GABA_A y NMDA en el PVN con el agonista muscimol y NMDA respectivamente, tiene efecto sobre la ingesta de alimento y la secuencia de la saciedad conductual en nuestras condiciones de estudio.
2. Evaluar el efecto de la activación y bloqueo del receptor D4 en el PVN con agonista y antagonista del receptor D4 sobre la liberación de Glutamato in vitro.
3. Evaluar el efecto de la activación del receptor D4 en rebanadas del PVN sobre la modulación de la transmisión glutamatérgica.
4. Evaluar el efecto de la activación del receptor D4 en el PVN sobre el eje Hipotalamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) mediante radioinmunoensayo para corticosterona.
5. Evaluar si la activación de los receptores a NMDA previene el efecto hiperfágico de la activación de los receptores D4 en el PVN sobre la ingesta de alimento y la secuencia de saciedad conductual (SSC).

HIPÓTESIS

El incremento en la ingesta de alimento por la activación de los receptores D4 en el PVN se encuentra mediado en parte por la inhibición de la transmisión glutamatérgica sobre las neuronas que sintetizan CRH afectando los niveles de corticosterona en suero al final del eje HPA.

5. MÉTODO

5.1. Animales

Ratas macho de la cepa Wistar pesando entre 200 y 230 g al inicio de las sesiones de habituación. Las ratas fueron mantenidas en cajas habitación individuales en un bioterio con el ciclo de luz/oscuridad de 12 x 12 horas invertido (la luz se apagaba a las 08:00 h) a una temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Para los experimentos de liberación se utilizaron ratas del mismo peso, y se mantuvieron en cajas habitación grupales en un bioterio con el ciclo de luz/oscuridad de 12 x 12 horas normal (la luz se apagaba a las 18:00 h) a una temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Las ratas fueron tratadas con reserpina al menos 18 horas antes del experimento, la reserpina actúa sobre el transportador vesicular de las monoaminas, previniendo su almacenamiento (vesicular) y favoreciendo su degradación. El día del experimento las ratas fueron trasladadas al laboratorio para su procesamiento. Para el caso de los experimentos electrofisiológicos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 13-14 días.

Los animales fueron provistos por el Bioterio general del CINVESTAV. Los procedimientos utilizados en este estudio cumplieron con las normas de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

5.2 Dieta y programa de alimentación

Las ratas tuvieron acceso *ad libitum* al agua, mientras que la dieta (LabDiet® formulab diet #5008, % de calorías provistas: Proteína 26.849%; Grasa 16.710 %; Carbohidratos 56.441 %) estuvo disponible para los sujetos como se indica en el protocolo de habituación. Dicho protocolo fue diseñado con el objetivo de mantener un nivel basal de ingesta (gramos) de alimento alto, lo que permitió la observación tanto de efectos estimulatorios como inhibitorios en la alimentación producidos por los diferentes tratamientos farmacológicos en las sesiones experimentales al principio de la fase oscura.

El protocolo de habituación consistió en tres ciclos de privación de alimento (24 horas), alimentación restringida (acceso al alimento durante 2 horas) y alimento *ad libitum*, lo anterior con el fin de prevenir la pérdida de peso corporal que previamente ha sido reportada con protocolos en donde se priva de alimento a los sujetos de estudio y no tienen un periodo de recuperación (Blundell et al., 1985, Halford et al., 1998) (Figura 9).

5.3 Habituación al programa de alimentación restringida

Previo a la privación de alimento de 24 horas (día 0), los sujetos experimentales tuvieron acceso al alimento *ad libitum* durante 24 horas (día 1), para el siguiente día se tuvo acceso al alimento durante 2 horas (más 1 hora extra), pesando el alimento consumido en cada hora (hora 1 y hora 2) y siendo entregado al inicio de la fase de oscuridad del ciclo luz/oscuridad (día 1). Para prevenir la pérdida de peso corporal de los sujetos, estos tuvieron acceso *ad libitum* al alimento 24 horas después de la alimentación restringida (día 2). La cirugía estereotáxica se realizó después del segundo ciclo (día 6) y tuvieron un periodo de 4 días para la recuperación operatoria antes de recibir las inyecciones intrahipotalámicas (día 10). Todas las observaciones (2 registros conductuales de una hora cada uno), fueron realizadas en el inicio de la fase de oscura del ciclo luz/oscuridad del día 10.

5.4 Cirugía estereotáxica

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina y xilazina en dosis de 112.5 mg/kg y 22.5 mg/kg, respectivamente. Posteriormente, se implantó estereotáxicamente una cánula guía en el área suprayacente al PVN. Las coordenadas estereotáxicas (con relación a bregma) empleadas fueron: -0.07 mm antero-posterior; -0.04 mm medio-lateral y -0.67 mm dorso-ventral (Paxinos and Watson, 1998). Las cánulas de inyección fueron fijadas al cráneo mediante un

tornillo de acero y cemento acrílico dental. Los animales tuvieron un periodo de 4 días para recuperarse de la cirugía.

5.5 Fármacos

Los fármacos empleados en el presente estudio incluyeron al agonista selectivo de los receptores D4, PD-168077 [(N-[[4-(2-Cyanophenyl)-1-piperazinyl]methyl]-3-methylbenzamide maleate salt) sal malato]; el antagonista selectivo de los receptores D4, L-745870 [(3-[[4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl]methyl]-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine hydrochloride) hidroclorado]; el agonista para los receptores a NMDA, NMDA (N-methyl-D-aspartic acid); el antagonista para los receptores a NMDA, D-AP5 [D(-)-AP-5, D(-)-APV, D-2-Amino-5-phosphonovaleric acid]; el agonista para los receptores GABA_A, muscimol (3-Hydroxy-5-aminomethylisoxazole); el antagonista de los receptores GABA_A, Picrotoxina, el antagonista de los canales de sodio dependientes de voltaje, Tetrodotoxina (TTX), el antagonista de los receptores AMPA/Kainato, CNQX (6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, FG-9065) (Sigma-Aldrich Química S. A. Toluca, México). El antagonista de los receptores D4, Ro 10-5824 5-[(3,6-Dihydro-4-phenyl-1(2*H*)-pyridinyl)methyl]-2-methyl-4-pyrimidinamine dihydrochloride (Tocris Bioscience, United Kingdom).

Los fármacos se pesaron en una balanza analítica y se disolvieron en solución salina (0.9%) con ayuda de un vortex o sonicador (cuando se requirió). La administración de los fármacos del estudio se realizó antes del inicio de la fase de oscuridad del ciclo luz/oscuridad. Los fármacos fueron infundidos a una velocidad de 0.25 µL por minuto y en volumen de 0.5 µL en el núcleo paraventricular hipotalámico 10 minutos antes del inicio de la fase oscura del ciclo de luz/oscuridad y, para asegurar una difusión completa de las sustancias, el microinyector permaneció un minuto adicional dentro de la cánula guía y luego fue retirado. La administración central de los fármacos se realizó con una jeringa para fluidos de alta precisión (Hamilton Co., Reno, NV).

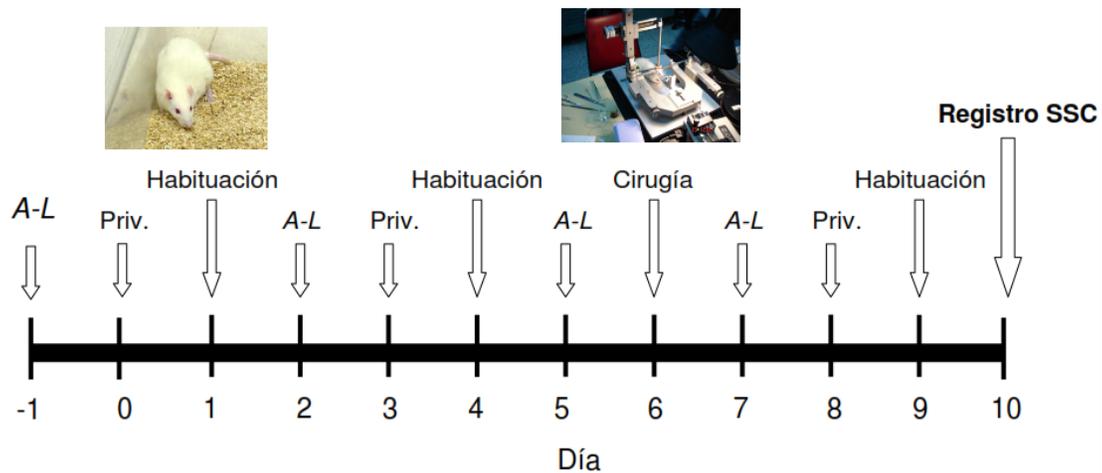


Figura 9. Programa de habituación a las condiciones experimentales (alimentación restringida). El día 10 se realiza la inyección intra-PVN de los fármacos y se registra la secuencia de saciedad conductual (SSC). A-L: alimento *ad-libitum* por 24 horas ; Priv.: Privación de alimento por 24 horas; Habituaçon: Acceso al alimento durante 2+1 horas.

5.6 Registros conductuales

En todos los casos, posterior a la inyección central (10 min), se realizaron dos registros de duración continua (60 minutos cada uno) durante las 2 horas de acceso al alimento, para lo cual se utilizó una cámara conectada a una grabadora de DVD. La grabación fue realizada en un cuarto oscuro adecuado para tal efecto y en presencia de luz roja. Posteriormente, la videograbación fue analizada *off line* para la determinación de las categorías conductuales de la SSC. La ingesta de alimento (gramos) fue evaluada, de manera independiente, durante la primer y segunda hora de registro, el alimento fue pesado individualmente (alrededor de 7-8 pellets grandes, con un tamaño aproximado de 2 cm, para cada rata) en una balanza semianalítica y se colocó en el comedero de la caja individual, después de la hora de registro, el alimento fue retirado y pesado nuevamente, por lo que el consumo neto de alimento se obtuvo de la resta del peso inicial y del peso final; para la segunda hora de registro este procedimiento fue repetido. Cabe destacar que durante las dos horas de registro las ratas tuvieron acceso *ad libitum* al agua y

el consumo de agua fue medido en términos de duración (segundos). Por otro lado, el análisis de la secuencia de saciedad conductual se efectuó en el mismo periodo de tiempo (Figura 10) a partir de la videograbación y sólo a las ratas que fueron correctamente canuladas y a las cuales se les administró de manera correcta los fármacos de estudio (Figura 11). Para el análisis de la SSC, cada hora de registro se dividió en 12 segmentos (5 minutos cada uno) donde se cuantificó la duración (segundos) de 5 categorías conductuales mutuamente excluyentes (alimentación, ingesta de agua, acicalamiento, actividad y descanso). Los datos se encuentran expresados, en la sección correspondiente, en términos de medias \pm el error estándar de la media (EEM) de la ingesta en gramos, en medias \pm EEM de las duraciones en segundos de las categorías conductuales (por periodo) para la secuencia de saciedad conductual, o bien, en medias \pm EEM del área bajo la curva (ABC) en segundos/periodo para las diferentes categorías conductuales registradas.

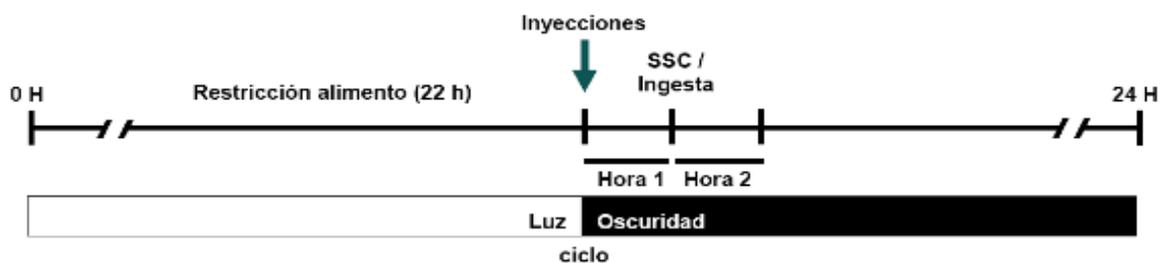


Figura 10. Representación esquemática del momento de los tratamientos y los registros conductuales. SSC, secuencia de saciedad conductual.

5.7 Diseño experimental

Los sujetos fueron aleatoriamente asignados a grupos independientes de 5-10 ratas y se habituaron de acuerdo al paradigma de restricción alimentaria ya descrito. Debido a que resultados previos mostraron que la activación de los receptores D4 incrementan la ingesta de alimento y este efecto es revertido por el antagonista de los D4R (Tejas-Juárez, 2008), por otra parte en una primera aproximación observamos que sólo el NMDA produjo efectos sobre la ingesta de alimento y no así el muscimol, por lo que el diseño experimental fue el siguiente:

		VI2					
		Vehículo (salina 0.9%)	muscimol	NMDA	DAP- V+NMDA	PD- 168077	NMDA+PD- 168077
VI1	H1	Ingesta de alimento y SSC					
	H1	Ingesta de alimento y SSC					

De acuerdo con el diseño experimental arriba esquematizado, en cada periodo de una hora (H1 y H2; VI₁ = variable independiente 1) se cuantificaron tanto el consumo de alimento (g), como las duraciones (s) de las categorías conductuales para determinar la SSC. Los grupos de ratas sólo recibieron uno de los diferentes tratamientos (VI₂ = variable independiente 2).

5.8 Histología

Posterior a las sesiones experimentales, las ratas fueron sacrificadas en una cámara de CO₂ e inmediatamente después fueron decapitadas para extraer el cerebro, mismo que fue colocado en una solución de formaldehído al 10% para fijar el tejido. Una vez fijado el tejido (al menos 24 horas después) se realizaron cortes coronales de 200 micrómetros para verificar el sitio de inyección del fármaco (Figura 11). Únicamente los datos de los sujetos que recibieron las inyecciones hipotalámicas exactamente en el PVN fueron incluidos en el presente reporte.

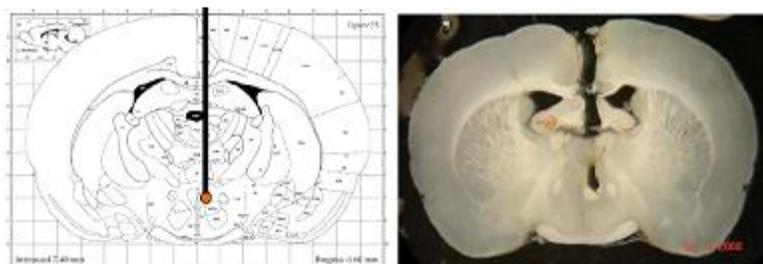


Figura 11. Esquema y fotografía de un corte coronal donde se observa la correcta inyección del fármaco de estudio en el PVN. Las ratas que recibieron inyecciones en las zonas fuera del PVN no se tomaron en consideración para el análisis estadístico de los datos.

5.9 Experimentos de liberación de [³H]-Glutamato

Se llevaron a cabo experimentos de liberación de [³H]-Glutamato en explantes de PVN del cerebro de ratas tratadas con reserpina (para eliminar el componente de la dopamina endógena). Los experimentos de liberación se llevaron a cabo de acuerdo al método adaptado de Raiteri y Levi (1974), descrito a detalle por Mitchell & Dogget (1980).

5.9.1 Soluciones

Solución Krebs Henseleit Normal: NaCl (124.5 mM), KCl (3 mM), MgSO₄ (1 mM), KH₂PO₄ (1.2 mM), CaCl₂ (1.8 mM), NaHCO₃ (16.5 mM), glucosa (11 mM) a un pH de 7.4.

Solución Krebs Henseleit alto K⁺: NaCl (81.25 mM), KCl (38.75 mM), MgSO₄ (1 mM), KH₂PO₄ (1.25 mM), CaCl₂ (1.8 mM), NaHCO₃ (16.5 mM), glucosa (11 mM) a un pH de 7.4 (concentración final de K⁺ = 40 mM)

5.9.2 Obtención de explantes del PVN

El día del experimento las ratas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical, posteriormente decapitadas y se extrajeron rápidamente los cerebros, estos se fijaron en una caja de petri, la cual fue colocada y fijada en un vibrátomo (CAMPDEN instruments LTD, USA), finalmente se le adicionó solución Krebs-Henseleit normal fría (4°C). Se realizaron cortes coronales de 300 μM de espesor, a partir de los cuales se obtuvo el PVN con ayuda de un estereomicroscopio (UNITRON ZSB, Japón). Los PVN's disecados fueron colectados en un tubo de ensaye con solución Krebs-Henseleit normal frío (4°C). Posterior a esto el tejido fue estabilizado en solución Krebs-Henseleit normal a 37°C con burbujeo constante de O₂/CO₂ (95/5) por 30 minutos.

5.9.3 Incubación con la marca radioactiva

Posterior al periodo de estabilización, las rebanadas se resuspendieron en solución Krebs-Henseleit con 10 μL de [^3H]-Glutamato y 100 μM de dihidrokainato (DHK) este último con el fin de bloquear de forma selectiva la recaptura de glutamato por células gliales, la incubación se realizó por 30 minutos. Después de la incubación, las rebanadas se lavaron tres veces con solución Krebs-Henseleit normal fría para retirar el exceso de glutamato radioactivo que no fue capturado por el tejido.

5.9.4 Desarrollo experimental

Los PVNs fueron transferidos a cámaras de perfusión acopladas a un colector de fracciones, donde se trataron con los fármacos del estudio en cada condición experimental. Las cámaras fueron perfundidas de forma constante con solución fisiológica a 37°C con burbujeo de O_2/CO_2 (95/5) con un caudal de 0.5 ml/min. Transcurridos 20 minutos correspondientes a la estabilización del flujo en el equipo y a un periodo de lavado, se colectaron 4 fracciones de 4 minutos de liberación basal y posteriormente se aplicó un pulso despolarizante de alto K^+ para inducir la despolarización de las terminales, se elevó la concentración de K^+ de 3nM a 40 mM durante 24 minutos (6 fracciones más). Al despolarizar las terminales se activan canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que resulta en un influjo de Ca^{2+} en la terminal presináptica, incrementando la probabilidad de fusión de las vesículas sinápticas con la membrana y la subsecuente liberación de neurotransmisor por exocitosis (Figura 12). El caudal utilizado en el equipo de perfusión (0.5 ml/min) disminuye la probabilidad de recaptura del neurotransmisor liberado (Mitchell and Doggett, 1980), con lo cual sólo se observaron los efectos de los fármacos utilizados en el experimento sobre la liberación del neurotransmisor. En cada experimento se procesaron 12 muestras en paralelo y para cada una de las condiciones del presente trabajo se realizaron 3 experimentos, cabe destacar que cada condición farmacológica corresponde a 3 cámaras individuales (3 réplicas experimentales).

Una vez terminado el experimento, se extrajeron las rebanadas de las cámaras de perfusión, se colocaron en viales y se les agregó 1 ml de HCl 0.1 N con la finalidad de solubilizar la membrana y cuantificar la radioactividad remanente en el tejido. Las condiciones farmacológicas para los experimentos de liberación fueron: control (sin fármaco), Ro 10-5824 (100 nM), L-745870 (10 nM), L-745870+ Ro 10-5824 (10 nM+100 nM)

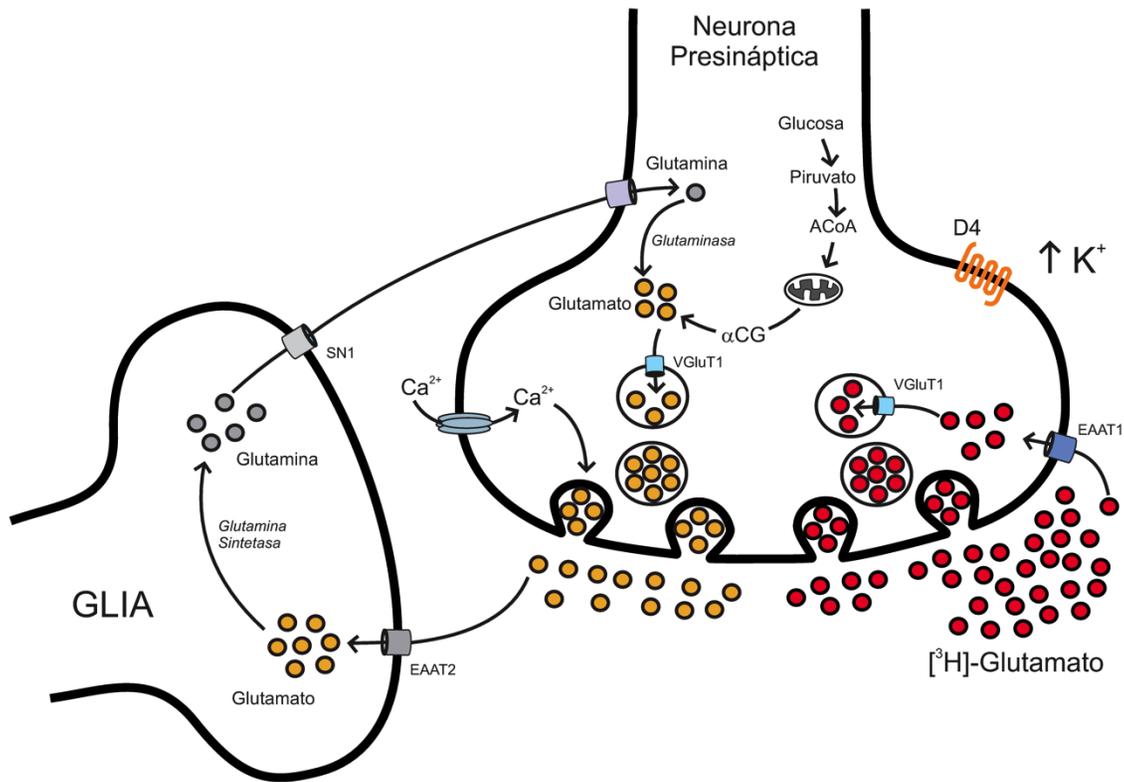


Figura 12. Principio de la prueba de liberación de [³H]-Glutamato. El pulso despolarizante de alto potasio activa canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, el flujo de calcio hacia la terminal presináptica induce la fusión de las vesículas con el [³H]-Glutamato el cual es cuantificado a partir en un contador de centelleo a partir de las colectas tomadas.

5.9.5 Cuantificación de la liberación de [³H]-Glutamato

Fueron adicionados 10 ml de líquido de centelleo a cada una de las fracciones colectadas contenidas en viales para cuantificar la radioactividad mediante un

contador de centelleo. Los resultados obtenidos se expresaron como la fracción liberada de neurotransmisor, esta se obtuvo mediante la siguiente formula:

$$F.L. = \frac{R.P.F.}{R.P.T.}$$

Donde F. L. = Fracción Liberada

R. P. F. = Radioactividad Presente en la Fracción

R. P. T. = Radioactividad Presente en el Tejido

La fracción liberada se expresa en las gráficas como el cociente de la fracción "n" entre la fracción 4 (fracción anterior al pulso de alto K⁺), esto con el fin de normalizar la fracción de liberación de cada curva por encima de la basal.

5.10 Experimentos electrofisiológicos

5.10.1 Soluciones

Solución cloruro de Colina 125 ml

Colina	124 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	1.3 mM
NaHCO ₃	26 mM
NaH ₂ PO ₄	1.2 mM
Glucosa	10 mM
CaCl ₂	2.4 mM

Solución Krebs Normal 500 ml

NaCl	124 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	2.3 mM
NaHCO ₃	26 mM
NaH ₂ PO ₄	1.2 mM
Glucosa	10 mM
CaCl ₂	2.4 mM

Solución Interna 5 ml

Gluconato de K ⁺	130 mM
NaCl	5 mM
CaCl ₂	1 mM
MgCl ₂	1 mM
EGTA	11 mM
HEPES	10 mM
ATP	4 mM

La solución interna se ajustó a un pH de 7.25-7.30

5.10.2 Desarrollo Experimental

5.10.2.1 Obtención de rebanadas

Las ratas fueron decapitadas rápidamente y el cerebro fue extraído y fijado en una caja Petri la cual fue montada en un vibrátomo (Lancer, Technical Products Internacional Corp., St. Louis, MO), se adicionó solución de colina fría (4°C) y se realizaron cortes coronales de 300 μ m. Con ayuda de un microscopio (UNITRON ZSB, Japón) se observaron las rebanadas obtenidas y se seleccionaron aquellas que presentaron el PVN. Las rebanadas fueron colocadas en solución Krebs-Normal con burbujeo de O₂/CO₂ (95/5) a temperatura ambiente durante 1 hora con el fin de estabilizarlas.

Después del periodo de estabilización, se transfirió una rebanada a la cámara de registro (volumen de 1.2 ml) y se fijó a dicha cámara con la ayuda de un bastidor al que se fijaron fibras horizontales de nylon transparente. La identificación del PVN se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Wild Heerbrugg M7A, Suiza). La cámara fue perfundida con un caudal de 2.5-3 ml/min con la solución Krebs Normal (con burbujeo de O₂/CO₂ [95/5] a temperatura ambiente).

5.10.2.2 Pipetas

Se fabricaron pipetas con capilares de borosilicato (WPI PG52165-4) en dos etapas, mediante un estirador vertical DAVID KOPF 730, posteriormente fueron pulidas mediante calor con ayuda de una microforja NARISHIGE MF-9. Las pipetas fueron llenadas con la solución interna antes descrita.

5.10.2.3 Registros

Se realizaron registros usando la técnica de Patch clamp en su configuración de célula completa (*whole cell*). Al inicio se realizaron registros intracelulares en fijación de corriente para identificar el tipo neuronal en base a su patrón de disparo (Luther et al., 2002), posteriormente se realizaron registros en fijación de voltaje (voltaje de fijación de -70 mV). De esta forma, se registraron corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (mEPSCs, por sus siglas en inglés).

La cámara de registro se colocó sobre la platina de un microscopio Axioscop I, con videocámara Hamamatsu C2400-50 adaptada. La imagen se proyectó en un monitor Toshiba. Se usó un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments), una tarjeta de adquisición analógico-digital DIGIDATA 1322A (Axon Instruments, Foster City, CA) operada por el programa pCLAMP 7.0 (Axon Inst.) instalado en una computadora personal. El monitoreo de los registros durante los experimentos se llevó a cabo con un osciloscopio TEKTRONIX 2214.

El registro de las mEPSCs se realizó en presencia de 1 μM de TTX en el medio para bloquear los canales de Na^+ y por ende, eliminar los potenciales de acción de las terminales sinápticas, debido a que las corrientes espontáneas miniatura son independientes de corrientes de Na^+ , es decir, no requieren de la propagación de potenciales de acción en la terminal que causen la liberación de neurotransmisor. Cabe destacar que las corrientes miniatura dependen de la liberación cuántica y espontánea del neurotransmisor. Debido a lo anterior, las mEPSCs permiten detectar efectos farmacológicos sobre la liberación de neurotransmisor y sobre

conductancias iónicas de las neuronas registradas, por lo que se pueden determinar efectos presinápticos y postsinápticos de los fármacos utilizados. Los registros se realizaron en presencia de picrotoxina 25 μM para eliminar el componente GABAérgico y sólo registrar las mEPSCs. Una vez finalizados los registros en presencia de PD-168077 1 μM , es decir al final de cada experimento se adicionaron 10 μM de D-AP5 y 10 μM de CNQX para comprobar que las corrientes registradas fueran glutamatérgicas y mediadas por receptores a NMDA y/o AMPA/Kainato.

5.11 Experimentos para la determinación de corticosterona

5.11.1 Procedimiento general

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar sometidas a una programa de alimentación restringida a las cuales se les realizó cirugía estereotáxica. Posterior a 30 minutos de la administración de los fármacos, las ratas fueron rápidamente decapitadas con ayuda de una guillotina y la sangre troncal fue colectada en tubos de poliuretano. Las muestras se dejaron reposar para que la sangre coagulara a temperatura ambiente por 45-60 min, posterior a eso se obtuvo el suero sanguíneo por centrifugación a 2500 rpm por 15 minutos a 4 °C, el suero se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml con ayuda de una micropipeta, las muestras se mantuvieron congeladas a -60 °C hasta que se determinó la corticosterona por Radioinmunoensayo. Cabe destacar que los cerebros fueron colectados para el análisis histológico.

Como se mencionó anteriormente, la secreción de corticosterona (CORT) se cuantificó mediante radioinmunoensayo (RIA, en esta técnica al anticuerpo se une un isótopo radiactivo siendo posible la cuantificación del complejo Antígeno-Anticuerpo a través de la radiactividad emitida). Se utilizó el kit comercial TKRC1 Coat a count Rat Corticosterone, Siemens Medical Solutions Diagnostics, para la determinación de CORT en suero de muestras sanguíneas tomadas del tronco de los animales decapitados.

5.11.2 Fundamento de la técnica

El principio básico del radioinmunoensayo nos dice que hay un desplazamiento entre un antígeno marcado con $[^{125}\text{I}]$ -Yodo radioactivo y uno no marcado, para un número fijo de sitios de unión a un anticuerpo específico (Berson and Yalow, 1971). El anticuerpo se encuentra fijo en los tubos del kit y el antígeno para este caso es la CORT que puede ser radioactiva ($[^{125}\text{I}]$ -CORT) y no radioactiva (Figura 13).

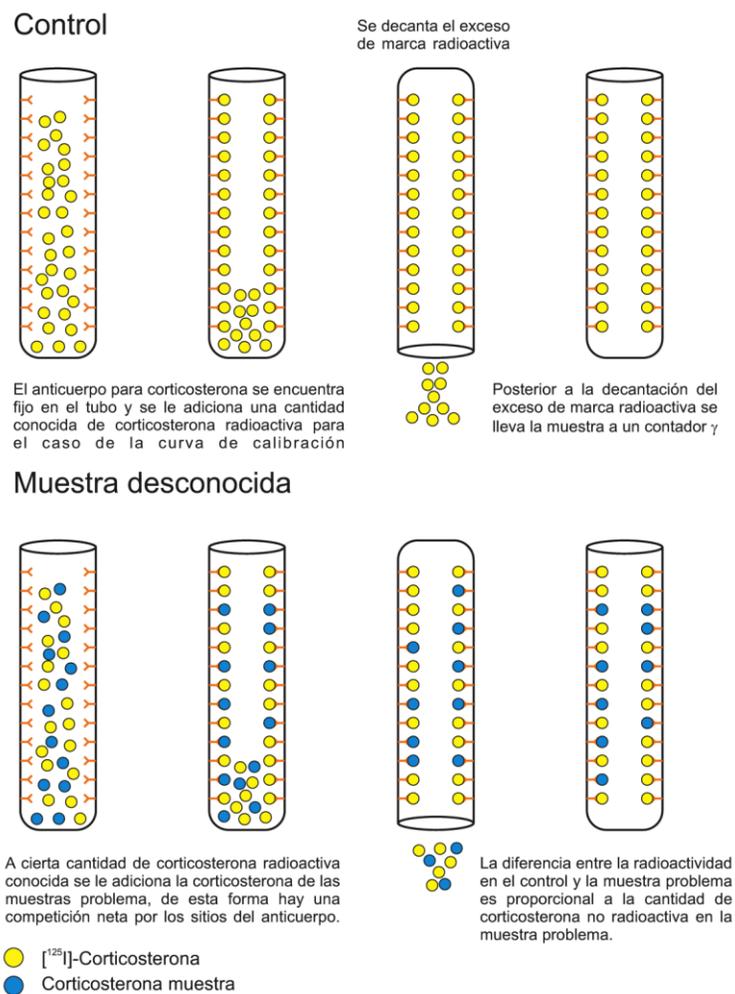


Figura 13. Esquema ilustrativo sobre el fundamento del RIA donde se muestra la competición de la corticosterona no radioactiva sobre la $[^{125}\text{I}]$ -Corticosterona por el anticuerpo que se encuentra en las paredes de los tubos del kit.

Entonces la cantidad de CORT presente en el suero de las muestras se determina en función de la cantidad de [¹²⁵I]-CORT desplazada, por lo cual cuanto menor sea la radioactividad de la muestra mayor es la cantidad de CORT no marcada, dado que la CORT está compitiendo contra su análogo radioactivo por los sitios de unión al anticuerpo. De esta manera podemos decir que la concentración de [¹²⁵I]-CORT es inversamente proporcional a la concentración de CORT en la muestra problema.

5.11.3 Procedimiento del RIA

Se permitió a los reactivos alcanzar la temperatura ambiente (15-28 °C) antes de su uso.

1. Se etiquetaron 4 tubos sin anticuerpo 2 para las cuentas totales (TC) y dos para la unión inespecífica (NSB). Se etiquetaron 16 tubos con anticuerpo desde A (unión máxima) hasta H por duplicado.
2. Se tomaron 50 µl de cada calibrador (cantidad conocida de CORT) y se colocaron en el tubo correspondiente de acuerdo a la siguiente tabla:

Calibrador	ng/ml
A (MB)	0
B	20
C	50
D	100
E	200
F	500
G	1000
H	2000

Nota: MB = Maxim binding. Lo cual implica una unión máxima de la [¹²⁵I]-CORT ya que no hay CORT sin marca en dicho tubo.

Para el caso de las muestras también se adicionaron 50 µl de cada suero a los tubos con anticuerpo previamente etiquetados para cada muestra, teniendo cuidado de colocar la muestra al fondo de cada tubo, también se tuvo cuidado de cambiar la punta de la micropipeta para cada muestra.

3. Posteriormente se adicionó 1 ml de [¹²⁵I]-CORT a cada tubo y se mezcló cuidadosamente con ayuda de un vortex.
4. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente.
5. Se decantaron los tubos cuidadosamente de 2 a 3 minutos (excepto los tubos etiquetados como T, que fueron las cuentas totales), posterior al tiempo de escurrido, se golpearon los tubos vigorosamente sobre papel absorbente para asegurar que no quedaran residuos en los tubos (gotas pequeñas adheridas a las paredes de los tubos).
6. Por último se cuantificó la marca radioactiva de los tubos en un contador gamma.

5.10.4 Cálculos

Se procedió a calcular el promedio de las cuentas obtenidas (CPM, cuentas por minuto) de cada condición en el experimento del RIA, esto incluyó estándares, las diferentes condiciones farmacológicas, TC (cuentas totales) y NSB (unión no específica). Posteriormente se restó el valor del NSB a todas las cuentas obtenidas ya mencionadas, de esta manera se obtuvieron las **cuentas netas** (Cuentas Netas = CPM – NSB). El porcentaje de enlace se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de enlace} = \frac{\text{Cuentas netas}}{\text{Cuentas netas MB}} \cdot 100$$

Con estos resultados se graficó la cantidad de CORT de los estándares o calibradores en el eje de las abscisas (X) contra el porcentaje de unión de la [¹²⁵I]-CORT que corresponde a dichas concentraciones de CORT en el eje de las

ordenadas (Y). De esta manera el 100 % de unión de la [¹²⁵I]-CORT corresponde al estándar o calibrador A que tiene 0 ng/ml de CORT (MB = Maxim Binding o unión máxima), este porcentaje de unión va disminuyendo conforme incrementa la concentración de CORT debido a una competición por los sitios de enlace al anticuerpo (Figura 14). A partir de esta gráfica se interpoló el porcentaje de enlace de las muestras de suero en las diferentes condiciones farmacológicas para obtener la concentración de CORT con ayuda del Graph Pad 5.0.

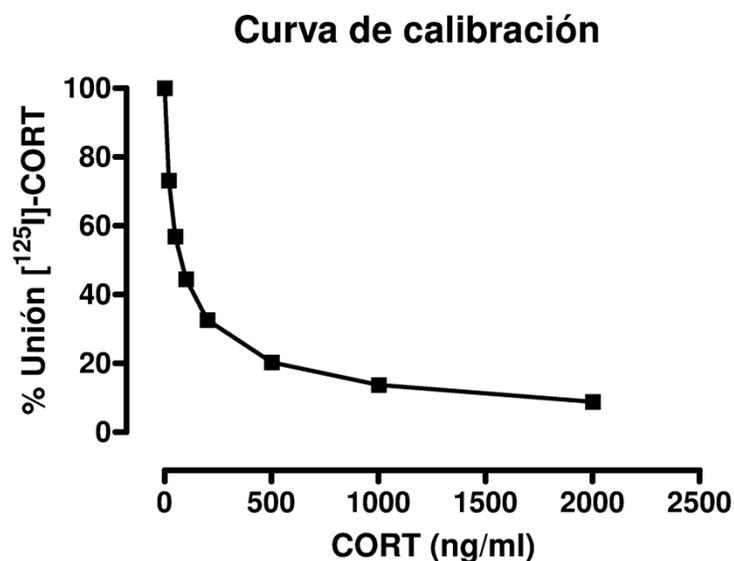


Figura 14. Curva de calibración a partir de las CPM obtenidas de los calibradores de CORT (que corresponden a cantidades de CORT conocidas en ng/ml) y el correspondiente porcentaje de unión de [¹²⁵I]-CORT. Note como a medida que incrementa la concentración de CORT la unión de la [¹²⁵I]-CORT disminuye.

5.11.5 Consideraciones al realizar el experimento.

Se tuvo cuidado de recibir el kit del RIA al menos 30 días antes de la fecha de caducidad del mismo y el kit se mantuvo en refrigeración (2-8 °C), por lo cual los reactivos suministrados en el kit, fueron óptimos para medir los niveles de corticosterona en el suero de la rata, por otro lado, se evitó el descongelamiento repetido de las muestras de suero. Además, los sueros lipémicos y hemolizados se desecharon para evitar la presencia de resultados erróneos.

5.11.6 Diseño experimental

El diseño experimental fue el siguiente:

- 1) Efecto del protocolo de habituación sobre los niveles de corticosterona.

		VI ₂		
		Normal	Vehículo (salina 0.9%)	Sham
VI ₁	30 min	Determinación de corticosterona		

- 2) Efecto de la activación de los receptores D4 con PD-168077, y del antagonista D4 L-745870 sobre los niveles de corticosterona.

		VI ₂			
		Vehículo (salina 0.9%)	PD-168077	L-745 + PD-168	L-745870
VI ₁	30 min	Determinación de corticosterona			

- 3) Efecto del pre tratamiento con NMDA sobre la activación de los receptores D4 con PD168077 y del NMDA sobre los niveles de corticosterona.

		VI ₂			
		Vehículo (salina 0.9%)	PD-168077	NMDA+PD-168	NMDA
VI ₁	30 min	Determinación de corticosterona			

El grupo "Normal" son ratas con acceso *ad-libitum* al alimento.

El grupo Sham son ratas sin la cirugía estereotáxica pero sometidas al protocolo de restricción de alimento.

El grupo control recibió al igual que los demás grupos la administración intra-PVN de las sustancias ya descritas.

5.12 Análisis estadístico

La significancia de las diferencias de la ingestión de alimento de los grupos en las diferentes condiciones fue determinada mediante ANOVAS de dos vías con ayuda del software Graph Pad 5.0. Para dicho análisis estadístico se consideró a la hora de registro (Hora 1 y Hora 2) como el factor 1 y a los diferentes tratamientos como el factor 2. Posterior al ANOVA significativo, se aplicó la prueba *post hoc* de Bonferroni para las comparaciones múltiples. Asimismo, el análisis cuantitativo de los datos correspondientes a la SSC se llevó a cabo mediante el cálculo de las áreas bajo la curva (ABC) de cada una de las categorías conductuales, mismas que posteriormente fueron igualmente tratadas estadísticamente con ANOVAS de dos vías y comparaciones múltiples de Bonferroni. El criterio para la significancia estadística fue de $p < 0.05$.

Se calculó el área bajo la curva (ABC) para cada una de las curvas de liberación en las condiciones experimentales mediante el software Graph Pad Prism 5.0. La significancia de las diferencias entre las ABC de las condiciones farmacológicas fue determinada mediante una ANOVA de una vía. Posterior al ANOVA significativo se aplicó la prueba *post hoc* de Bonferroni para las comparaciones múltiples. El criterio para la significancia estadística fue de $p < 0.05$.

Las mEPSC se analizaron con el programa Minianalysis (Synptosoft), mediante este programa se contó el número de eventos y estos se clasificaron en base a su valor de amplitud e intervalo inter-evento, a partir de los datos obtenidos se crearon histogramas de frecuencia acumulada tanto para las amplitudes como para el intervalo inter-evento, el siguiente paso fue aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov determinando el nivel de significancia ($p < 0.05$.) entre la población de eventos control y bajo el efecto de los fármacos.

La significancia de las diferencias entre los niveles de corticosterona fue determinada mediante ANOVAS de una vía. Posterior al ANOVA significativo, se

aplicó la prueba *post hoc* de Bonferroni para las comparaciones múltiples. El criterio para la significancia estadística fue de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados correspondientes a la administración local de muscimol (agonista de los receptores GABA_A) y NMDA (agonista de los receptores a NMDA sobre la ingesta de alimento, las duraciones de las diferentes categorías conductuales, así como del análisis de la secuencia de saciedad conductual. Los datos son presentados en términos de medias \pm el EEM.

6.1. Efecto del NMDA y Muscimol sobre la ingesta de alimento

En la introducción del presente trabajo se habló del papel de los receptores D4 en la regulación de la ingesta de alimento y, dada la evidencia experimental disponible, era posible que el sistema que se encontraba relacionado con este efecto era el GABA y/o el glutamato, por lo cual fue necesario en primera instancia realizar experimentos sobre la ingesta de alimento administrando un fármaco que afectara a receptores GABAérgicos A y a receptores a NMDA (cabe destacar que estos receptores son los que se ha reportado se encuentran involucrados con un incremento en la ingesta de alimento). Por tal motivo se administró de manera local NMDA y muscimol de manera independiente, en la dosis que han mostrado tener efecto sobre la ingesta de alimento, sin embargo cabe destacar que los experimentos se realizaron en la fase oscura del ciclo luz/oscuridad, es decir, en las mismas condiciones en las cuales se obtuvo el efecto del PD-168077.

El ANOVA de dos vías reveló cambios significativos en la ingesta de alimento como resultado de los tratamientos intra-PVN, resultando una interacción hora de registro x tratamiento significativa ($F_{(3,60)} = 3.887$; $p = 0.0132$), además de que el efecto de los tratamientos (factor tratamiento $F_{(3,60)} = 1.140$; $p = 0.3404$) se observó en ambas horas de registro (factor hora registro $F_{(1,60)} = 103.4$; $p < 0.0001$). La *post hoc* de Bonferroni mostró que la administración de muscimol (0.11 nmoles) por sí misma no tiene efecto (Hora 1 y Hora 2), sin embargo, el tratamiento con NMDA (3.3 nmoles) inhibe significativamente la ingesta de alimento en la primer hora (hora 1) sin afectar esta variable en la hora 2, dicho efecto es revertido por el pre-

tratamiento con el antagonista de los receptores a NMDA, D-AP5 (10 μ M) (Figura 15).

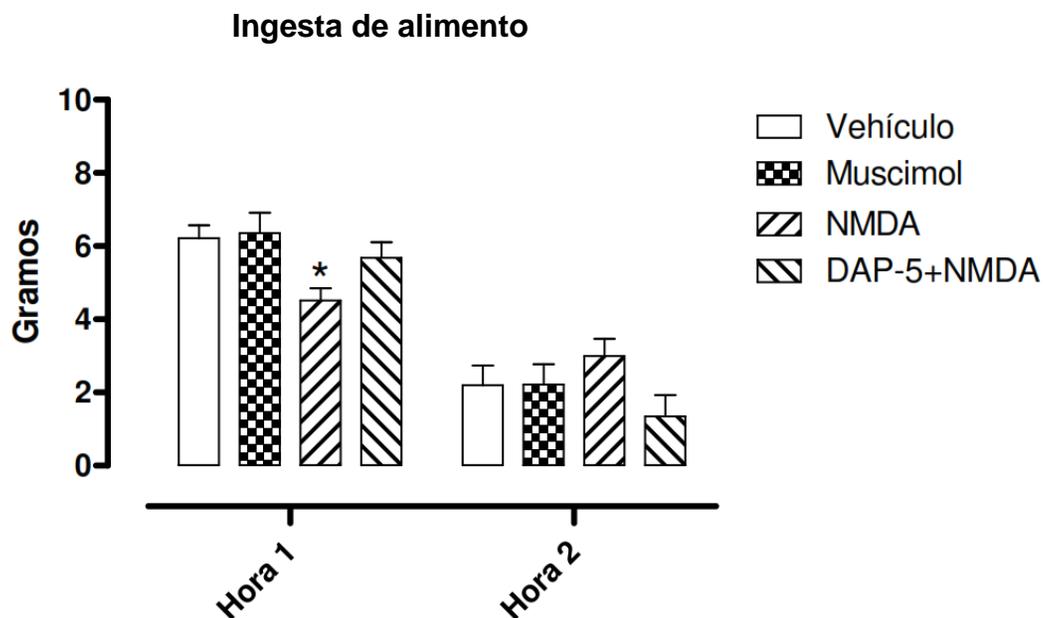


Figura 15. Media \pm EEM de la ingesta de alimento en gramos durante los registros de la primera y segunda hora (Hora 1 y Hora 2). Observe como el NMDA disminuye la ingesta de alimento en la primer hora de registro, el efecto del NMDA es revertido por el pretratamiento con el antagonista de los receptores a NMDA, DAP-5. * $p < 0.05$. Vh (n=8), Muscimol (9), NMDA (9), D-AP5+NMDA (8).

6.2. El efecto mediado por los receptores D4 es prevenido por el pretratamiento con NMDA

El siguiente paso fue probar si el pretratamiento con el NMDA prevenía el efecto mediado por los receptores D4, en los resultados obtenidos se observa como el NMDA previene el incremento en la ingesta de alimento mediado por los receptores D4 cuando se activan con PD-168077 (0.1 μ g) (Figura 16).

Como un control de especificidad de los efectos de la activación de los receptores D4 en el PVN se realizó el análisis estadístico a un grupo de ratas que fueron inyectadas con PD-168077 fuera del PVN (dorsal, ventral o lateral). No se

observaron cambios significativos en la ingesta de alimento en el grupo que fue inyectado con PD-168077 fuera del PVN respecto del grupo control (Figura 17).

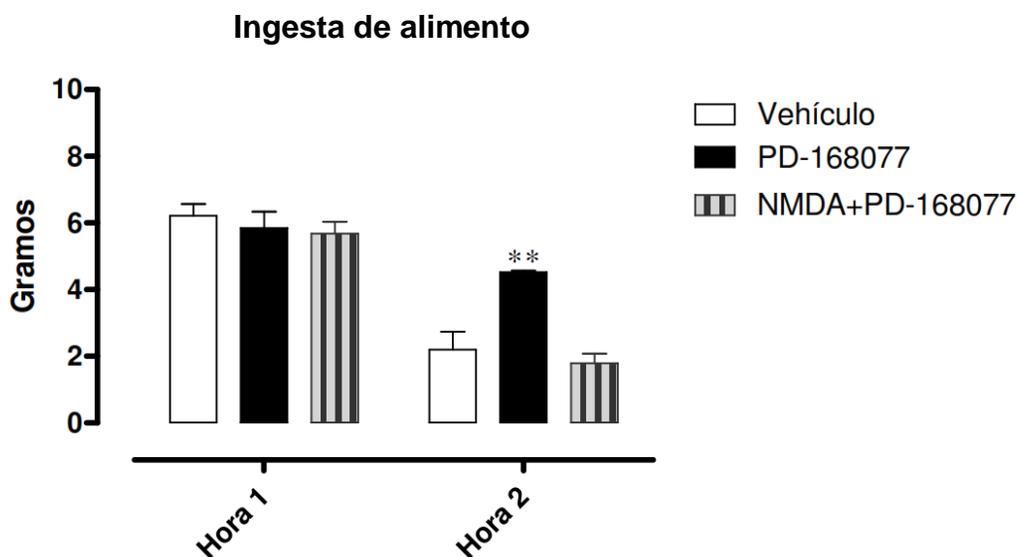


Figura 16. Media \pm EEM de la ingesta de alimento en gramos durante los registros de la primera y segunda hora (Hora 1 y Hora 2). Observe como el NMDA revierte el efecto mediado por la activación de los D4R con PD-168077 en la segunda hora de registro. ** $p < 0.01$. Vh (n=8), PD 168077 (n=5), NMDA + PD 168077 (n=7).

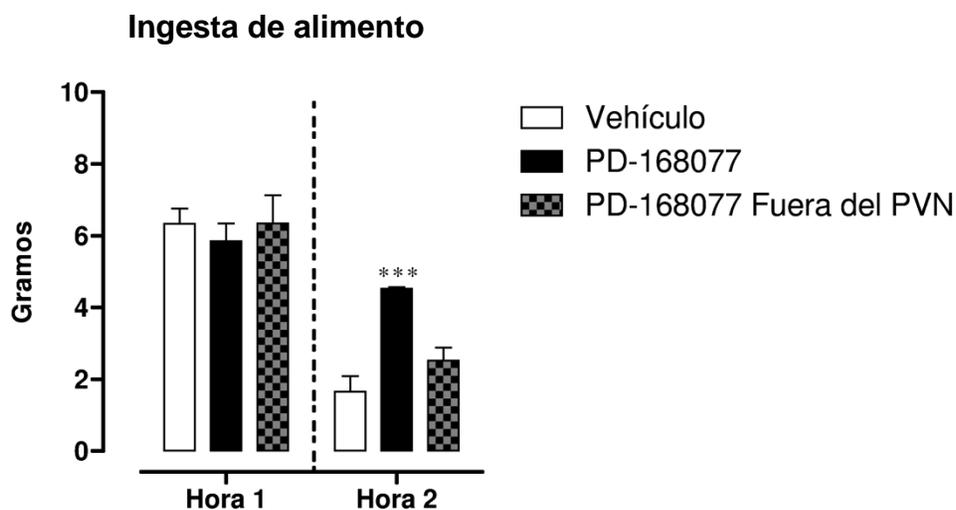


Figura 17. Media \pm EEM de la ingesta de alimento en gramos durante los registros de la primera y segunda hora (Hora 1 y Hora 2). En esta gráfica se observa el efecto del PD-168077 en la segunda hora de registro. El efecto del PD-168077 no se observa en las ratas que fueron inyectadas fuera del PVN. *** $p < 0.001$. Vh (n=6), PD 168077 (n=5), PD 168077 fuera del PVN (n=7).

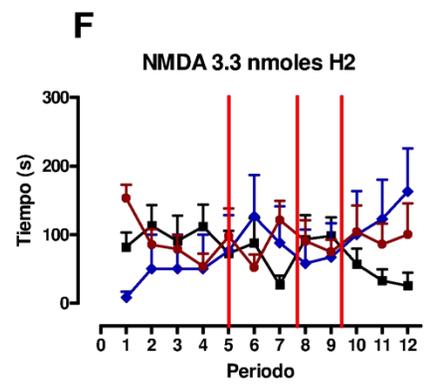
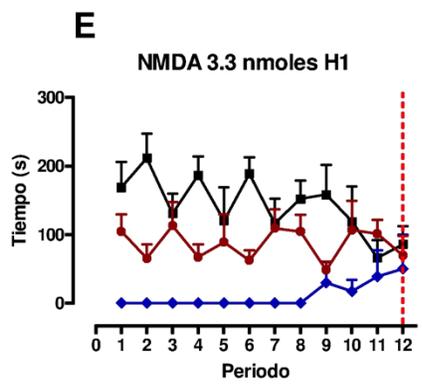
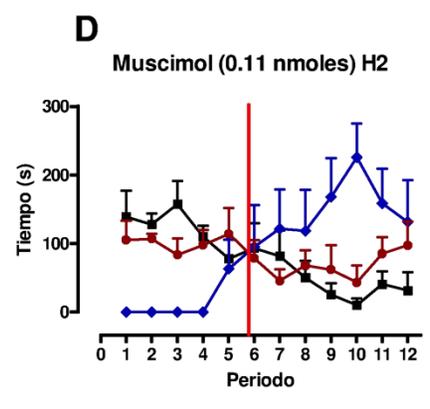
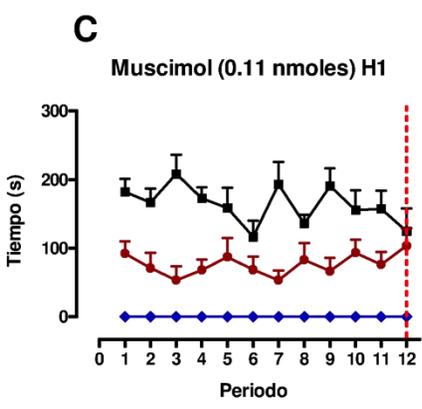
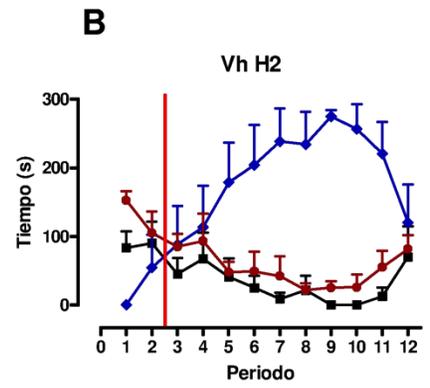
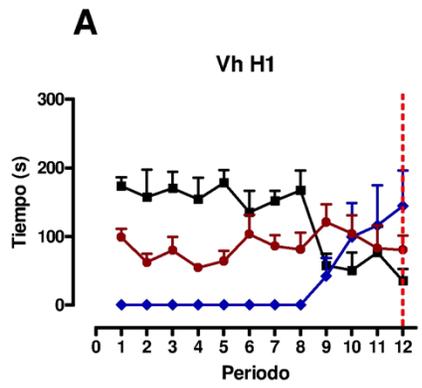
6.3. Análisis de la secuencia de saciedad conductual

En las gráficas de la secuencia de saciedad conductual sólo se muestran las categorías correspondientes a descanso, alimentación y actividad no alimentaria, se omiten las curvas correspondiente a la categoría beber y acicalamiento para evitar el traslape de curvas, no obstante se obtuvo el área bajo la curva para las cinco categorías conductuales.

De acuerdo con el análisis de la secuencia de saciedad conductual del grupo administrado con vehículo (salina al 0.9 %), se encontró que los sujetos mostraron un patrón conductual de saciedad típico, es decir, durante los primeros periodos de tiempo de la primer hora del registro, la categoría conductual predominante fue el consumo de alimento (expresado en tiempo), disminuyendo progresivamente hacia el final de los primeros 60 minutos, mientras que paralelamente se incrementaba el tiempo del descanso (transición alimentación-descanso entre periodos 8-9). Durante la segunda hora de registro, los sujetos tratados con solución salina inician nuevos episodios de alimentación, aunque a partir del periodo 3, los sujetos emplean la mayor parte del tiempo para descansar, reflejando el proceso saciatorio alimentario, es decir, la transición ordenada de la alimentación al descanso que determina a la saciedad (Figura 18, A y B).

Por otra parte, en el caso de la administración central de muscimol (Figura 18, C y D) se observa que este grupo no presenta descanso al término de la primer hora de registro como en el caso del grupo control, por otro lado la transición ordenada de la alimentación al descanso en la segunda hora se observa después del periodo 6, es decir el muscimol retrasó la aparición de la saciedad postprandial por 3 periodos, sin tener efecto en los resultados de ingesta de alimento. Por otro lado, la administración intra-PVN de NMDA desestabilizó la secuencia de saciedad conductual ya que se observa que la curva para descanso en la segunda hora se interseca con la de alimentación varias veces, es decir, no se observó la transición ordenada de la alimentación al descanso (Figura 18, E y F

Para el caso del NMDA la desestabilización de la SSC se debió a un incremento en la actividad no alimentaria y por ende, a una disminución en el descanso.



Continuación de la figura 18

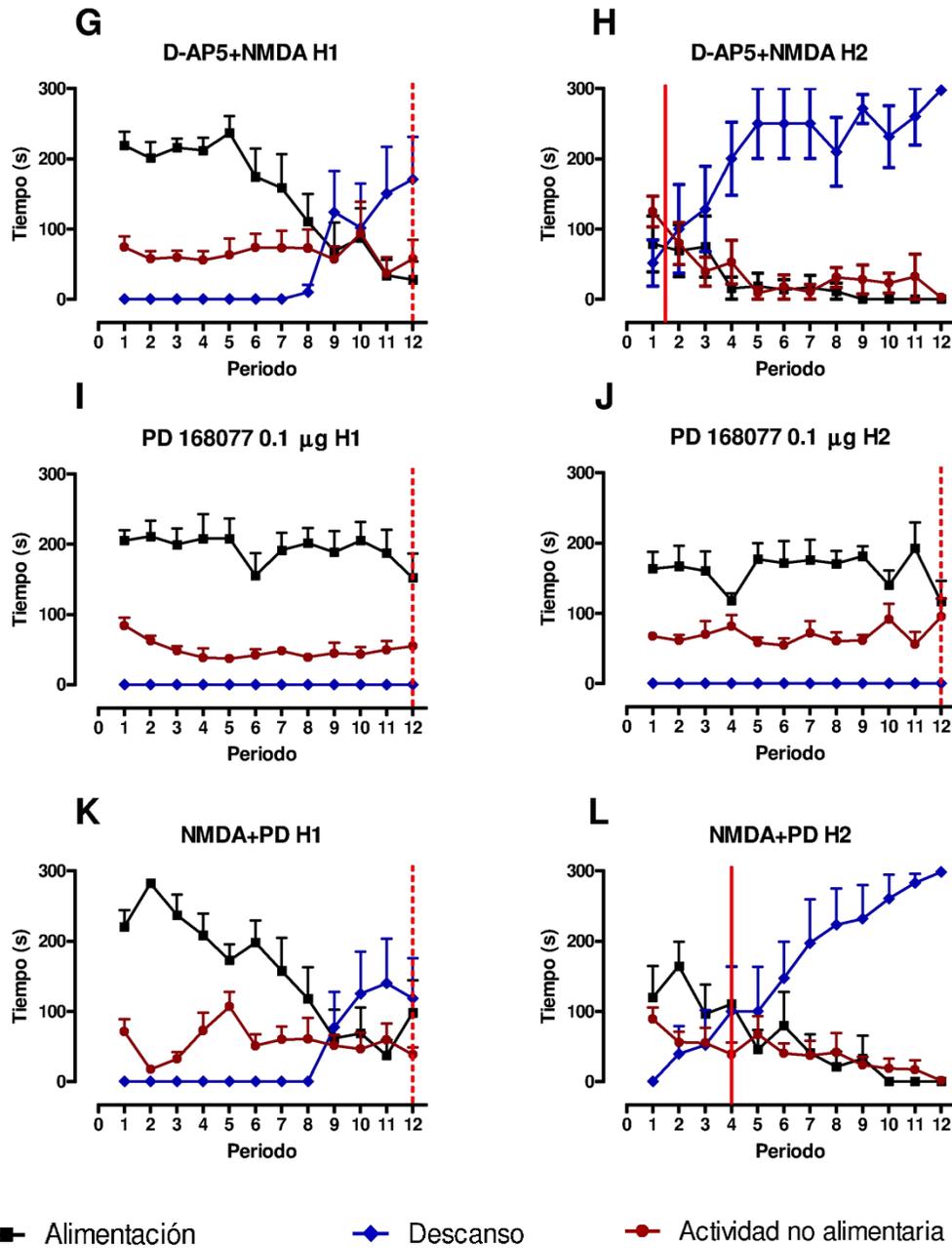


Figura 18. Duración media de tiempo que emplean los sujetos en las categorías conductuales de alimentación (—■—), descanso (—◆—) y actividad (—●—) en las diferentes condiciones: Vehículo (salina 0.9%), Muscimol 0.11 nmoles (agonista GABA_A), NMDA 3.3 nmoles (agonista de los receptores a NMDA), D-AP5 10 µM (Antagonista de los receptores a NMDA), PD 168077 0.1 µg/0.5 µL (agonista D4R), administrados intra-NPH. Los dos registros de 60 min (Hora 1 y Hora 2) fueron divididos en periodos de 5 min cada uno. La línea vertical roja continua representa la transición de la ingesta al descanso (expresión de la saciedad postprandial cuando el descanso es continuo y la ingesta de alimento es baja), cuando es discontinua dicha transición no se presenta durante el tiempo de registro. Vh (n=6), Muscimol (6), NMDA (6), D-AP5+NMDA (6), PD 168077 (n=5), NMDA + PD 168077 (n=6).

Por su parte, el pre-tratamiento con el antagonista de los receptores a NMDA, D-AP5 revirtió el efecto en la desestabilización de la SSC por NMDA, ya que se observa la transición ordenada de la alimentación al descanso después del período 1 en la segunda hora de registro (Figura 18, H). Similar al grupo control, este grupo presenta un incremento en el tiempo de descanso al finalizar la primer hora de registro (Figura 18, G). Interesantemente, el tratamiento con PD-168077 (agonista selectivo D4R) previno por completo la transición entre la alimentación y el descanso, inhibiendo el desarrollo de la saciedad postprandial, por lo que, la categoría conductual predominante fue la alimentación (Figura 18, I, J). Cabe destacar que en ambas horas de registro no hubo descanso en este grupo. Por su parte, el pre-tratamiento con NMDA revierte por completo el efecto de la administración de PD-168077 sobre la secuencia de saciedad conductual. De igual manera que en el caso del grupo control, este grupo al finalizar la primer hora presenta un incremento en el descanso. Para la segunda hora las ratas inician con episodios de alimentación y se observa la transición de la alimentación al descanso después del periodo 4 (Figura 18, K y L).

6.4 Análisis cuantitativo de la SSC de los tratamientos intrahipotalámicos

El análisis cuantitativo de las categorías conductuales representadas en el análisis de la secuencia de saciedad conductual fue realizado mediante el cálculo del área bajo la curva (ABC). A continuación se presentan los datos correspondientes a los parámetros del ABC de los diferentes tratamientos intra-PVN, expresados en medias del ABC \pm el EEM.

6.4.1 Alimentación

Como puede observarse en la Figura 19 A, las inyecciones del agonista selectivo de los D4R (PD-168077) en el núcleo paraventricular produjo efectos significativos sobre el ABC de la categoría conductual alimentación, encontrándose efectos significativos tanto por el factor hora de registro ($F_{(1, 58)} = 92.73$; $p < 0.0001$), como por el factor tratamiento ($F_{(5, 58)} = 9.240$; $p < 0.0001$), para el caso de la interacción

hora registro x tratamiento no se encontró efecto significativo ($F_{(5, 58)} = 2.262$; $p < 0.0601$). Específicamente, se observó un incremento significativo del ABC del tiempo de ingesta de alimento en la Hora 1 y en la hora 2 cuando se aplicaron las inyecciones intra-PVN del PD-168077, el efecto para el caso de la segunda hora de registro estuvo acompañado con un incremento de la ingesta de alimento.

6.4.2 Ingesta de agua

Cuando se analizó el ABC correspondiente a la duración de la ingesta de agua, no fueron encontradas diferencias significativas por efecto de los tratamientos intra-PVN en ninguno de los periodos de registro (Fig. 19 B).

6.4.3 Acicalamiento

De acuerdo con el análisis de los datos correspondientes al ABC del acicalamiento, no se encontraron efectos significativos de las inyecciones intra-PVN en ninguno de los periodos de registro (Figura 19 C)

6.4.4 Descanso

El análisis estadístico del ABC del tiempo de descanso mostró que los tratamientos intra-PVN produjeron cambios significativos, tanto en interacción ($F_{(5, 58)} = 2.999$; $p < 0.0178$, como por los factores hora de registro ($F_{(1, 58)} = 52.44$; $p < 0.0001$) y tratamiento ($F_{(5, 58)} = 7.515$; $p < 0.0001$). Se observó en la segunda hora de registro (Hora 2) que la activación de los D4R produjo disminuciones significativas del ABC del tiempo de descanso y este efecto fue prevenido por el tratamiento con el agonista de los receptores a NMDA. Por sí mismo, el NMDA disminuyó el ABC del tiempo del descanso (Hora 2), al igual que el NMDA y el pre-tratamiento con D-AP5 no previno este (Figura 19 D).

6.4.5 Actividad no alimentaria

Posterior al análisis estadístico de los datos correspondientes al ABC de la actividad no alimentaria, se encontró solamente un efecto significativo del factor

tratamiento ($F_{(5, 58)} = 4.406$; $p < 0.0018$). La prueba *post hoc* de Bonferroni mostró que fue la condición en la que referencialmente se encuentran activados los receptores D4 (grupo tratado con PD-168077) donde se disminuye significativamente el ABC de tiempo de actividad no alimentaria (Figura 19 E).

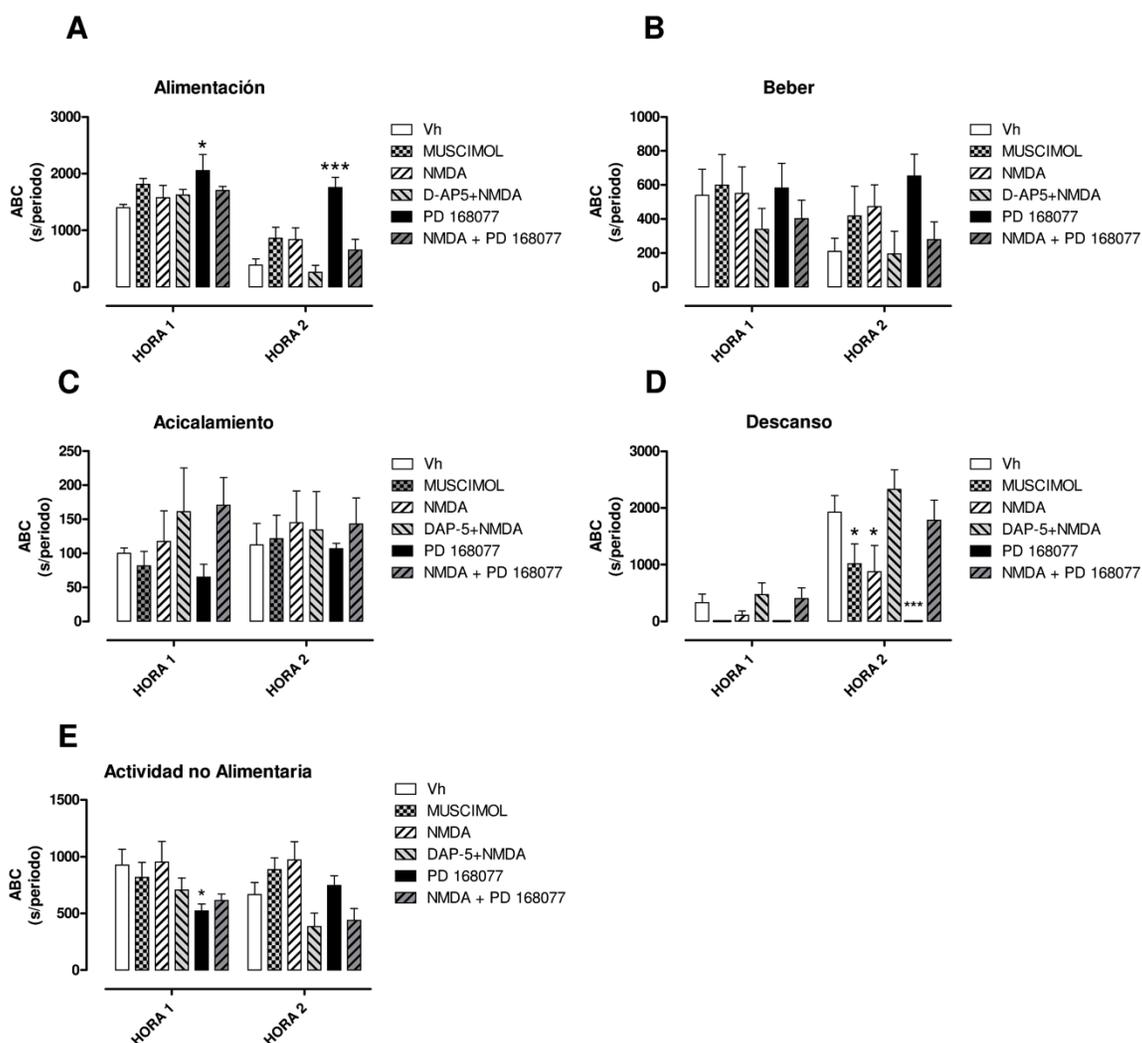


Figura 19. Media \pm EEM (Error Estándar de la Media) del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro Hora1 y Hora 2 del tiempo que las ratas emplearon para: A) alimentación, B) ingesta de agua, C) acicalamiento, D) descanso y E) actividad no alimentaria. Vehículo (n=6), 0.11 nmoles Muscimol (n=6), 3.3 nmoles NMDA (6), 10 μ M D-AP5 + 3.3 nmoles NMDA (n=6), 0.1 μ g/0.5 μ L PD 168077 (n=5), 3.3 nmoles NMDA + 0.1 μ g/0.5 μ L PD 168077 (n=6), administrados intra-NPH. Anova de dos entradas y *post hoc* de Bonferroni, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

6.5 Tasa Local de Alimentación

Se calculó la Tasa Local de Alimentación (TLA), no se encontraron efectos significativos de las inyecciones intra-PVN en ninguno de los periodos de registro y de los diferentes tratamientos (Figura 20).

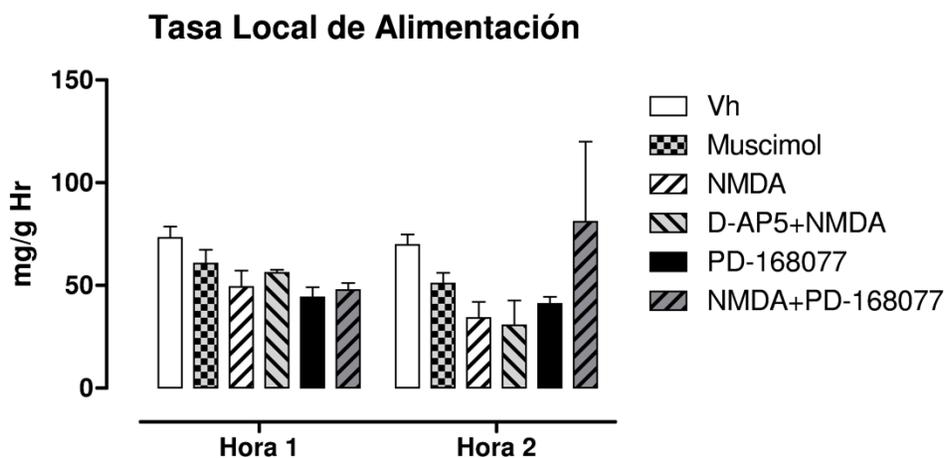


Figura 20. Media \pm EEM (Error Estándar de la Media) de la TLA de los periodos de registro Hora1 y Hora 2 del tiempo que las ratas emplearon para alimentarse con respecto del tiempo y del peso corporal de los diferentes tratamientos farmacológicos. Vh (n=6), Muscimol (6), NMDA (6), D-AP5+NMDA (6), PD 168077 (n=5), NMDA + PD 168077 (n=6).

6.6 La activación de los receptores D4 en el PVN disminuye la liberación de [³H]-Glutamato.

Con base en las observaciones conductuales del primer experimento, encontramos que bajo las condiciones del presente estudio, solamente la administración intra paraventricular de NMDA produjo cambios significativos sobre la ingestión de alimento. Este resultado inesperado reveló la necesidad de cambiar algunas variables (hora de registro, dosis, disponibilidad del alimento, etc.) para determinar la razón por la que no se encontraron efectos estimulatorios del consumo de alimento tras la administración de muscimol (agonista GABA_A); tras modificar dichas variables (hora de registro, a la mitad de la fase de luz), no logramos encontrar efectos significativos de la activación de los receptores GABA_A

en el PVN sobre la ingesta de alimento (datos no mostrados). Por lo anterior se realizaron experimentos para la determinación de los efectos de la activación de los D4R con Ro-105824 sobre la liberación de [³H]-Glutamato, así como con el antagonista para este receptor, L-745870. En el análisis estadístico de los datos correspondientes al área bajo la curva de la liberación de glutamato se encontró un efecto significativo de la activación de los D4R con Ro-105824 ($p < 0.05$), dicho efecto fue bloqueado por el antagonista selectivo de los D4R, L-745870. El antagonista por sí mismo no tuvo efectos significativos sobre la liberación de [³H]-Glutamato (Figura 21).

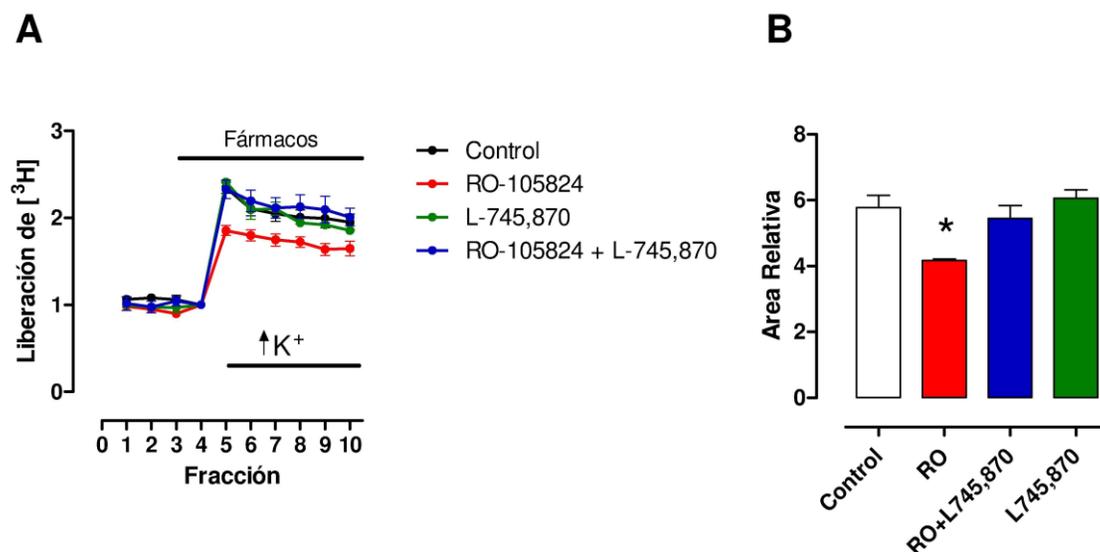


Figura 21. Media \pm EEM (Error Estándar de la Media) de la liberación de glutamato radioactivo. En A se observa una gráfica típica de liberación, el eje de las ordenadas muestra la liberación fraccional de [³H]-Glutamato en rebanadas del PVN, las fracciones se muestran en el eje de las abscisas. Condición control (sin fármaco), Ro-105824 (60 nM), L-745870 (10 nM). En B se observa el área bajo la curva de la gráfica mostrada en A con las diferentes condiciones farmacológicas, observe como la activación de los D4R en el PVN inhiben la liberación de glutamato de manera significativa y como este efecto es revertido por el antagonista de los D4R, el L-745870. * $p < 0.05$ (control [n=4], Ro-105824 [n=4], Ro-105824 + L745870 [n=3], L-745870 [n=3]).

6.7 Efecto de la activación de los receptores D4 por PD-168077 sobre corrientes postsinápticas excitatorias miniatura: inhibición de la transmisión glutamatérgica.

El resultado de que el agonista de los receptores D4 inhibe la liberación de glutamato radioactivo en explantes del hipotálamo (y que el antagonista selectivo de los receptores D4 previenen el efecto), proporciona evidencia empírica de que dichos receptores cumplen una función inhibitoria presináptica a nivel de los axones glutamatérgicos que inervan al PVN. Así, decidimos evaluar dicha función desde una perspectiva experimental distinta con una herramienta electrofisiológica, evaluando los cambios producidos por la activación de los receptores D4 en el PVN sobre las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura espontáneas (mEPSCs, de naturaleza glutamatérgica). Para asegurar que los registros se llevaran a cabo en neuronas parvocelulares neurosecretoras del PVN se procedió a determinar el patrón de disparo de estas células, de acuerdo con lo descrito en el trabajo publicado por Luther en el 2002 (Figura 22).

En general es aceptado que un efecto presináptico afecta la frecuencia de las mEPSCs (cambios en la liberación cuántica de neurotransmisor) sin afectar la amplitud (sin afectar conductancias de la membrana postsináptica) y, por el contrario, cambios en la amplitud pero no en la frecuencia sugieren que los efectos son postsinápticos (Del Castillo and Katz, 1954, Edwards et al., 1990).

Para los experimentos electrofisiológicos se exploró si la activación del D4R tenía efecto sobre las mEPSCs. En la figura 23 se muestra que 1 μ M de PD-168077 (agonista selectivo D4) disminuye de manera significativa la frecuencia de las mEPSCs. Los efectos sobre la amplitud son más evidentes en las curvas de frecuencia acumulada (Figura 23, B y C). Se observa que la amplitud no se modificó (Figura 23, B), por otro lado la curva para el intervalo inter-evento (frecuencia) se desplazó a la derecha, indicando una disminución en la frecuencia (Figura 23, C).

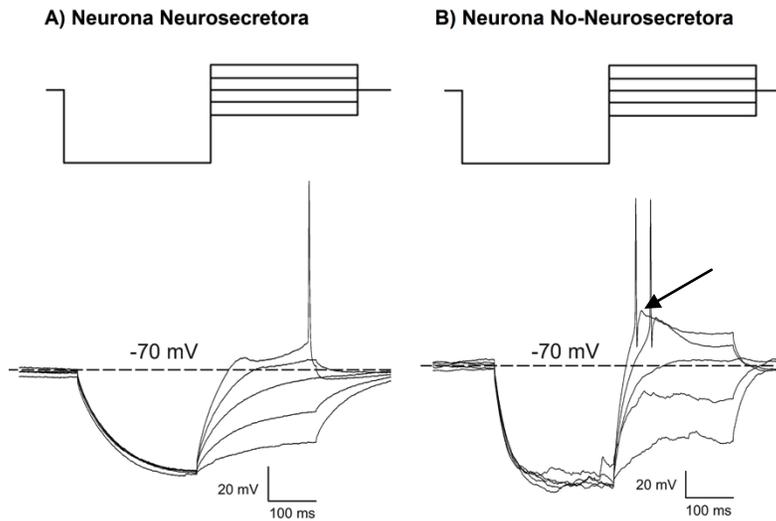


Figura 22. Caracterización electrofisiológica de las neuronas del PVN, patrón de disparo de una neurona neurosecretora (A) y de una neurona no-neurosecretora (B). Observe que la neurona no-neurosecretora presenta un pico de bajo umbral (LTS, low threshold spike) característica de una neurona parvocelular no-neurosecretora y que este pico se encuentra ausente en la neurona neurosecretora (Flecha). (Luther et al., 2002)

6.8 El programa de restricción de alimento, así como la activación del receptor D4 tiene efecto sobre los niveles de corticosterona en suero de rata: interacción de los receptores NMDA y D4.

A partir de los resultados de los experimentos conductuales, neuroquímicos y electrofisiológicos hasta ahora descritos, pudimos establecer que los efectos estimulatorios sobre la alimentación de la activación de los receptores a dopamina D4 hipotalámicos involucran a la inhibición de la liberación de glutamato en el PVN, lo que sugiere que la actividad de alguna señal hipofágica dejó de ser estimulada. Elegimos a las neuronas CRH del PVN como potenciales blancos de la acción moduladora de la dopamina (vía receptores D4) en el PVN, ya que se ha descrito que la administración central de CRH produce disminución de la ingestión de alimento (Arase et al., 1988), además de que las neuronas CRH posiblemente expresan el ARNm de receptores NMDA (Herman et al., 2000).

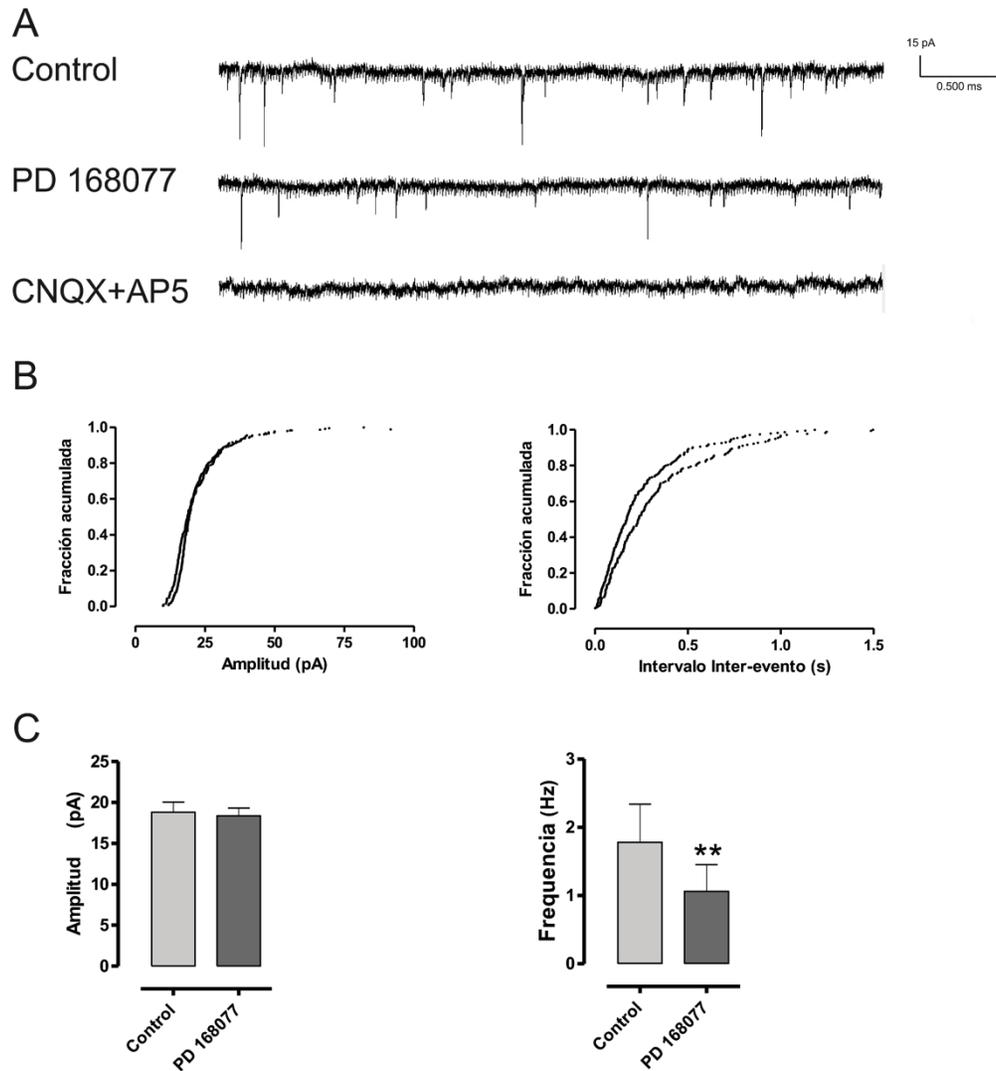


Figura 23. A) Trazos representativos de las mEPSCs registradas en presencia de 1 μ M del agonista selectivo para el receptor D4, donde se observa el efecto de este agonista al disminuir la frecuencia de las mEPSCs con respecto del control; se corroboró que las mEPSCs fueran excitatorias ya que cuando se agregó al medio CNQX [10 μ M] + D-AP5 [10 μ M] desaparecieron las miniaturas registradas. El inserto muestra trazos expandidos de las mEPSCs registradas. B) Gráficas de frecuencia acumulada (intervalo inter-evento y amplitudes) de los registros ilustrados en (A). La prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov reveló que hay diferencia significativa entre la frecuencia acumulada en la condición de PD-168077 vs el control. C) Gráficas en barra de los resultados obtenidos en (A) para la amplitud y la frecuencia. La prueba estadística t de student indica que hay una diferencia significativa entre el control y el grupo con PD-168077 para el caso de la frecuencia. ** $p < 0.01$ ($n = 6$ neuronas).

Con base en lo anterior y dado que la actividad del dicho eje puede ser evaluada por medio de la concentración plasmática de corticosterona, procedimos a evaluar los efectos de la activación de los receptores D4 sobre las concentraciones plasmáticas de corticosterona. En una primer serie de experimentos se realizó el RIA para corticosterona en tres grupos: un grupo con alimentación *ad-libitum* (para observar si el protocolo de restricción de alimento tenía efectos sobre los niveles de corticosterona en suero), un grupo sham (a este grupo no se le practicó la cirugía estereotáxica, pero fue sometido al protocolo de restricción de alimento) y el grupo control (este recibió una inyección intra-PVN de salina al 0.9%). Posterior a las determinaciones de corticosterona en suero por radioinmunoensayo en los grupos ya citados, se encontró una diferencia significativa de los grupos que fueron sometidos al protocolo de restricción de alimento ($p < 0.001$) sobre el grupo de ratas que tuvo acceso al alimento *ad-libitum* (figura 24 A).

Posteriormente, se realizó otra serie de experimentos con las siguientes manipulaciones farmacológicas: un grupo al cual se le administró PD-168077 con el fin de observar si la activación de los D4R tenía efecto sobre los niveles de corticosterona en suero, otro grupo en presencia del antagonista L-745870 y el PD-168077 y, el grupo que sólo recibió el tratamiento con el antagonista D4R para observar si el antagonista por sí sólo tenía algún efecto sobre los niveles de corticosterona. Se observó la disminución significativa de los niveles de corticosterona cuando se activó al receptor D4 con PD-168077 ($p < 0.001$), y dicho efecto fue revertido parcialmente por el L-745870 (antagonista D4R), el antagonista D4 por sí mismo no tuvo efecto significativo en los niveles de corticosterona respecto del grupo control (figura 24 B).

De acuerdo a los resultados anteriores encontrados, las nuevas condiciones farmacológicas quedaron de la siguiente manera: un grupo con pretratamiento con NMDA en presencia de PD-168077 para observar si el NMDA podría revertir el efecto del PD-168077, así como un grupo que recibió solamente el NMDA para

observar si este tenía efecto sobre los niveles de corticosterona. El efecto de la activación del receptor D4 también fue revertido por el NMDA (agonista de los receptores a NMDA), la administración de NMDA por si misma produjo efectos significativos sobre los niveles de corticosterona en suero respecto del grupo control (Figura 24 C).

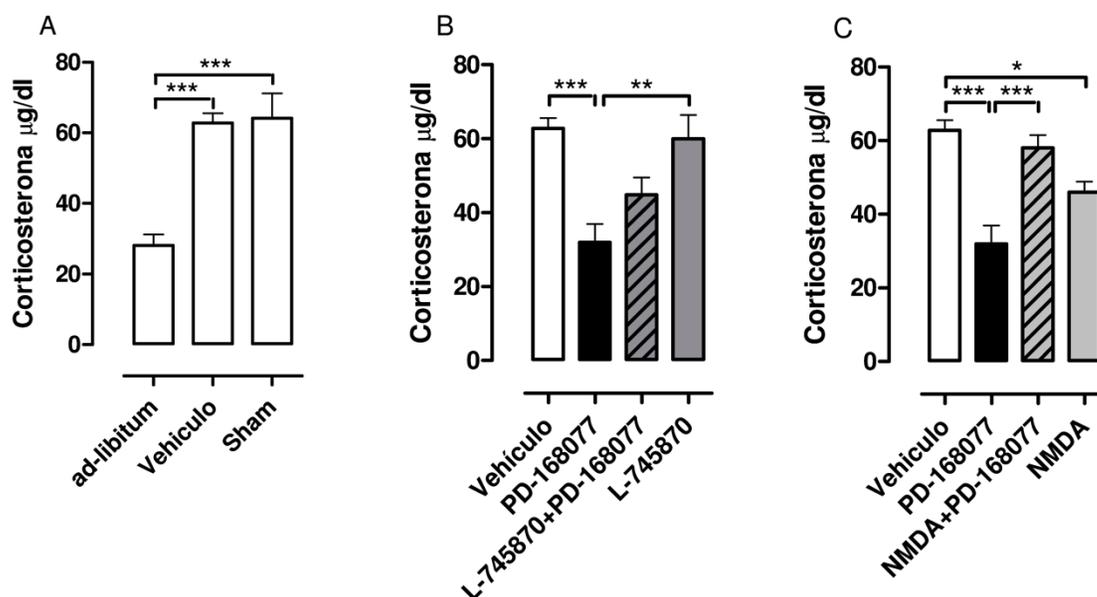


Figura 24. Media \pm EEM (Error Estándar de la Media) de los niveles de corticosterona en suero de rata en $\mu\text{g/dL}$ para las diferentes condiciones farmacológicas. Los niveles de corticosterona aquí mostrados fueron obtenidos después de 30 min de los tratamientos intra-PVN. El grupo de ratas *ad-libitum* no fue sometido al protocolo de alimentación restringida como los demás grupos. Por otro lado al grupo sham no se le practicó la cirugía estereotáxica y fue sometida al protocolo de alimentación restringida como los demás grupos. *Ad-libitum* (n=7), Vehículo (n=7), Sham (n=7), PD-168077 (n=8), L-745870+PD-168077 (n=9), L-745870 (n=8), NMDA (n=9), NMDA+PD-168077 (n=9). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

El grupo de ratas con alimentación *ad-libitum* fue mantenido en el mismo cuarto y bajo el mismo ciclo invertido de luz/oscuridad que las ratas que fueron sometidas al protocolo de alimentación restringida. De la misma forma, los animales fueron sacrificados en tiempos similares que las ratas de los grupos con alimentación restringida.

Dado que al grupo sham no se le practicó la cirugía estereotáxica, pero si fue sometido al protocolo de restricción de alimento, la ausencia de diferencias significativas entre el grupo vehículo y sham sugiere que la cirugía estereotáxica por sí misma no produce cambios sobre la concentración de corticosterona.

7. DISCUSIÓN

7.1 Efectos estimulatorios de la ingestión de alimento de la dopamina mediados por receptores D4 hipotalámicos.

Los trabajos realizados con agonistas D2 no selectivos son abundantes, dentro de estos encontramos el hallazgo de que la administración de bromocriptina (agonista no selectivo de la familia D2-like), reduce la ingesta de alimento en ratas privadas de alimento (Carruba et al., 1980, Hawkins et al., 1986, Zarrindast et al., 1991), otro agonista D2/D3, N-0437, también indujo efectos inhibidores de la ingesta de alimento palatable en ratas y ratones no privados de alimento (Van der Weide et al., 1986). Recientemente se utilizó el agonista quinpirole (agonista no selectivo de la familia D2-like) y se encontró que disminuyó la ingesta de alimento palatable e incremento la ingesta de alimento estándar, cuando a las ratas se les dio acceso a ambos alimentos (Cooper and Al-Naser, 2006). Este trabajo es de suma importancia porque es el primero que da indicios de que los receptores de la familia D2-like se encuentran involucrados con un efecto estimulatorio de la alimentación mediado por dopamina. Cabe mencionar que aunque la mayoría de los reportes hasta ahora citados sugieren que los fármacos utilizados son selectivos para el receptor D2, las dosis utilizadas podrían activar receptores D3 y D4 (Terry et al., 1995, Missale et al., 1998). Sin embargo la activación de los receptores D4 en el PVN incrementan la ingesta de alimento (Tejas-Juárez, 2008), lo anterior sugiere que los efectos de la dopamina sobre la ingesta de alimento se deben primordialmente al tipo de receptor que se active (Terry et al., 1995).

El PVN se considera un centro integrador de vías orexigénicas y anorexigénicas, ya que recibe proyecciones de los demás núcleos del hipotálamo, aunado a que, sólo en este núcleo del hipotálamo se ha reportado la expresión del receptor D4 (Defagot et al., 1997, Bitner et al., 2006), no obstante, el ARNm del receptor D4 se encuentra en el VMN y LH, así como en otras áreas extrahipotalámicas que envían proyecciones hacia el PVN (Huang et al., 2005). El receptor D4 en el PVN

es funcional, esto fue mostrado cuando el PD-168077 incrementó de manera significativa la inmunoreactividad para *c-fos*, un marcador de actividad neuronal (Bitner et al., 2006). En experimentos previos (Tejas-Juárez, 2008), cuando se administró directamente el PD-168077 en el PVN, este incrementó de manera significativa la ingesta de alimento 60 minutos posteriores a su administración, previniendo la aparición de la saciedad postprandial (la saciedad postprandial se definió anteriormente como la transición ordenada de la alimentación al descanso), dicho efecto fue revertido por el antagonista selectivo de los receptores D4, L-745870, mientras que la administración intra-PVN de quinpirole no produjo efecto significativo alguno sobre la ingesta de alimento (Tejas-Juárez, 2008). Tomando en conjunto los hallazgos citados, la naturaleza de los efectos estimulatorios de la dopamina sobre la conducta alimentaria puede ser explicada en buena medida por la activación de los receptores D4 del PVN.

7.2 Efectos de la administración de NMDA y muscimol sobre la ingesta de alimento

Debido a que el esclarecimiento del mecanismo neuroquímico por medio del cual la activación de los receptores D4 incrementa la ingesta de alimento fue el principal interés del presente estudio, es relevante explicar de qué forma la dopamina vía los receptores D4 interactúa con la actividad neural en la región paraventricular del hipotálamo. Se sabe que el ARNm del receptor D4 se encuentra presente en diversas estructuras hipotalámicas como el LH, VMN, el septum lateral y la estria terminalis (Huang et al., 2005), estas regiones envían proyecciones glutamatérgicas (Csaki et al., 2000) y GABAérgicas (Herman et al., 2000) al PVN, lo cual nos sugirió que los receptores D4 que se encuentran en el PVN (Defagot et al., 1997, Bitner et al., 2006) podrían encontrarse en estas terminales regulando la transmisión glutamatérgica y/o GABAérgica. Así, el primer paso fue probar en nuestro sistema de estudio si la administración de un agonista glutamatérgico (NMDA) y GABAérgico (muscimol) producía efectos sobre la ingesta de alimento y la SSC. Cabe destacar que las cantidades en nanomoles

administradas en los presentes experimentos fueron previamente reportadas con efectos sobre la ingestión de alimento (Stanley et al., 1996, Pu et al., 1999). Sólo encontramos cambios significativos como resultado de la administración de NMDA, el cual indujo la disminución de la ingesta de alimento en la primera hora de registro; por su parte, el muscimol, no tuvo efecto significativo respecto del grupo control. Los trabajos en los cuales se ha administrado de manera central tanto NMDA, glutamato, ácido kaínico y AMPA (Roeling et al., 1991, Stanley et al., 1993) así como muscimol (Kelly et al., 1977, Pu et al., 1999), han mostrado que se produce incremento de la ingesta de alimento, sin embargo, la mayoría de los experimentos se han realizado en la mitad de la fase de luz, donde el nivel de actividad y el consumo de alimento es naturalmente bajo debido al ritmo circadiano de las ratas; los resultados del presente estudio, soportan la idea de que los mecanismos neuroquímicos que regulan la ingesta de alimento en la fase oscura en ratas varían con los que utilizarían en la fase de luz (en donde se encuentran descansando). Esta afirmación se basa en la observación de que los resultados del presente trabajo muestran que muscimol, un agonista GABA_A no tiene efecto significativo sobre la ingesta de alimento, mientras que el NMDA si la disminuye. Cabe señalar que varios estudios han demostrado cómo los neuropéptidos orexigénicos como el NPY/AgRP se encuentran incrementados al inicio de la fase oscura (Sanacora et al., 1990, Swart et al., 2001, Fekete et al., 2004, Kaelin et al., 2004), mientras que los anorexigénicos como POMC/CART se encuentran disminuidos (Swart et al., 2002, Germano et al., 2007). Una vez que los sujetos de estudio se alimentan, los niveles de NPY/AgRP disminuyen mientras los niveles de POMC/CART aumentan. Sin embargo, no sólo estos neuropéptidos o sustancias relacionadas con la conducta alimentaria pudieran encontrarse disminuidas o incrementadas a nivel central, sino que existen otras señales tanto a nivel central como a nivel periférico (Berthoud and Morrison, 2008). Cabe destacar que los efectos obtenidos en la disminución en la ingesta de alimento por la administración de NMDA pueden vincularse a la regulación de la actividad endócrina que contribuye con la modulación del balance energético y el

comportamiento alimentario, ya que se ha reportado que las neuronas parvocelulares expresan el ARNm para los receptores a NMDA, AMPA y Kainato (Herman et al., 2000), por lo cual con la activación de los receptores a NMDA en las neuronas parvocelulares que sintetizan CRH y TRH habría un posible incremento en la síntesis y liberación de CRH y TRH, recordemos que ambas hormonas poseen un papel anorexigénico (Vijayan and McCann, 1977, Vettor et al., 2002) por lo que, el incremento de la liberación de ambas hormonas disminuiría la ingesta de alimento, tal y como se observó con la administración central del NMDA.

Algo que nos ayudaría a comprender mejor lo anterior, es recordar cuales son las poblaciones neuronales que encontramos en el PVN. En el PVN encontramos dos tipos de neuronas: las magnocelulares (OX y VP) y las parvocelulares (CRH y TRH). Las neuronas que son de nuestro interés por tener relación con la regulación de la conducta alimentaria son las neuronas CRH y TRH. Cuando se administra i.c.v. TRH (Vijayan and McCann, 1977, Vogel et al., 1979, Morley, 1980, Suzuki et al., 1982, Horita, 1998, Steward et al., 2003) o CRH (Morley and Levine, 1982, Arase et al., 1988, Krahn et al., 1990) disminuye la ingesta de alimento. Por otro lado tanto las neuronas CRH y TRH reciben inervación glutamatérgica (Wittmann et al., 2005) y GABAérgica (Fekete et al., 2002, Miklos and Kovacs, 2002) y, dado que algunas de las fuentes de estas proyecciones poseen el ARNm del D4R, entonces, el D4R podría regular la transmisión de estos neurotransmisores, no obstante, los resultados obtenidos muestran que sólo el NMDA es capaz de tener efecto bajo las condiciones del presente trabajo, por lo cual el siguiente paso fue determinar si la activación del receptor D4 tenía efecto sobre la liberación del aminoácido excitatorio por excelencia en el sistema nervioso central, el glutamato.

7.3 La activación selectiva del receptor D4 disminuye la liberación de glutamato y la transmisión glutamatérgica en neuronas neurosecretoras del PVN

Los resultados de los presentes experimentos indican que la activación del receptor D4 con Ro 10-5824 disminuye significativamente la liberación de glutamato, efecto revertido por el antagonista D4, L-745870. Estos resultados sugieren que el receptor D4 se encuentra de manera presináptica modulando la transmisión glutamatérgica. Existen dos herramientas electrofisiológicas que pueden complementar los experimentos de liberación de neurotransmisor, estas son los pulsos pareados y las miniaturas excitatorias (mEPSC's). Con ayuda de estas herramientas se puede determinar si un receptor se encuentra no sólo de manera presináptica, sino también de manera postsináptica. De tal forma que los siguientes experimentos estuvieron encaminados a complementar los resultados de liberación de glutamato mediante la técnica de corrientes postsinápticas excitatorias miniatura. En concordancia con los estudios de liberación de glutamato radioactivo, los resultados de los experimentos electrofisiológicos aportan evidencia adicional de la localización presináptica de los receptores D4 en el PVN, donde cumplen una función inhibitoria de la transmisión glutamatérgica, ya que la activación de los receptores D4 con PD-168077 disminuyó significativamente la frecuencia de las miniaturas excitatorias sin afectar su amplitud. Hasta este punto la evidencia experimental muestra que, efectivamente los receptores D4 inhiben la liberación de glutamato en el PVN ya que es un receptor presináptico, pero esta inhibición de la liberación de glutamato ¿Qué afecta? Sabemos que las neuronas CRH y TRH son invadidas por fibras glutamatérgicas, de forma que, la inhibición en la liberación de glutamato, traería como consecuencia la disminución de la activación de estas neuronas, probablemente disminuyendo su efecto río abajo.

Por otra parte, dado que la activación de los receptores D4 en el PVN incrementa la ingesta de alimento y disminuye la liberación de glutamato, entonces es posible que la administración de NMDA pudiese revertir los efectos del PD-168077. Para

probar la hipótesis anterior se realizaron experimentos conductuales con la finalidad de evaluar los efectos de la administración del agonista selectivo D4 sobre la ingesta de alimento y la SSC en animales pre-tratados con NMDA. Adicionalmente, evaluamos la concentración de corticosterona en suero de ratas cuando se les administro directamente en el PVN el PD-168077, en animales pre-tratados con L-745870, así como el NMDA, pues parte de nuestra hipótesis sugiere que la activación del eje HPA depende de la regulación glutamatérgica sobre las neuronas que sintetizan CRH, con la consecuente modulación de la liberación de ACTH y de los niveles de corticosterona en suero.

7.4 La activación de los receptores D4 en el PVN estimula la ingesta de alimento y disminuye los niveles de corticosterona en suero y este efecto es prevenido por el pre-tratamiento con NMDA

Los resultados encontrados mostraron que el NMDA previene el incremento en la ingesta de alimento producido por el PD-168077; por otra parte, el agonista selectivo D4 disminuye los niveles de corticosterona en suero después de 30 minutos de su aplicación, y el efecto es revertido por el antagonista selectivo D4R (L-745870) y por NMDA. Estos resultados sugieren fuertemente que el mecanismo neuroquímico por medio del cual la activación de los receptores D4 incrementa la ingesta de alimento involucra en parte una inhibición en la activación de las neuronas que sintetizan CRH (neurosecretoras) vía la disminución de liberación de glutamato, lo cual se ve reflejado al final del eje HPA con una inhibición en los niveles de corticosterona en suero (Figura 24).

Es importante señalar que los niveles de corticosterona en ratas bajo el protocolo de restricción alimentaria (sham) tuvieron niveles más altos que los de los animales con alimentación *ad-libitum*, lo que indica un efecto estresor de la restricción del alimento. A este respecto, se ha demostrado que los niveles de corticosterona y de ACTH aumentan cuando se somete a los sujetos experimentales a diferentes tipos de estrés (e.g. estrés por restricción, estrés por

nado forzado)(Dal-Zotto et al., 2000, Kelliher et al., 2000, Harris et al., 2002, Retana-Marquez et al., 2003, Calvez et al., 2011, Garcia-Iglesias et al., 2013), la restricción de alimento puede considerarse como estrés nutricional. Los niveles de corticosterona en suero al inicio de la fase oscura para el grupo de ratas con alimentación *ad-libitum* promedia 28.12 $\mu\text{g/dL}$ (Figura 23), para el caso de las ratas sham, aquellas que fueron sometidas sólo al protocolo de restricción de alimento tuvieron en promedio un nivel de 64.16 $\mu\text{g/dL}$, mientras que el grupo control que sólo recibió la administración intracanalicular de solución salina (0.9 %) tuvo una media de 62.76 $\mu\text{g/dL}$. Estos niveles son comparables con los niveles de corticosterona para ratas sometidas a estrés por inmovilización (Garcia-Iglesias et al., 2013).

Para el caso del grupo con PD-168077, el nivel promedio de corticosterona fue de 33.52 $\mu\text{g/dL}$, niveles muy parecidos a los que presentó el grupo de ratas con alimentación *ad-libitum*, por otro lado, esta disminución es significativa respecto del grupo control (62.76 $\mu\text{g/dL}$). El efecto del PD-168077 es parcialmente revertido por el antagonista L-745870 (41.11 $\mu\text{g/dL}$), mientras que el antagonista D4, L-745870, no tuvo efecto significativo por sí mismo.

El efecto del PD-168077 sobre los niveles de corticosterona fue casi totalmente prevenido por el pretratamiento con el NMDA (56.40 $\mu\text{g/dL}$), mientras que la administración de NMDA por si misma produjo la disminución significativa de la concentración de corticosterona en plasma. Estos resultados soportan la hipótesis propuesta sobre el mecanismo neuroquímico que involucra la activación de los receptores D4 sobre el incremento de la ingesta de alimento (Figura 24).

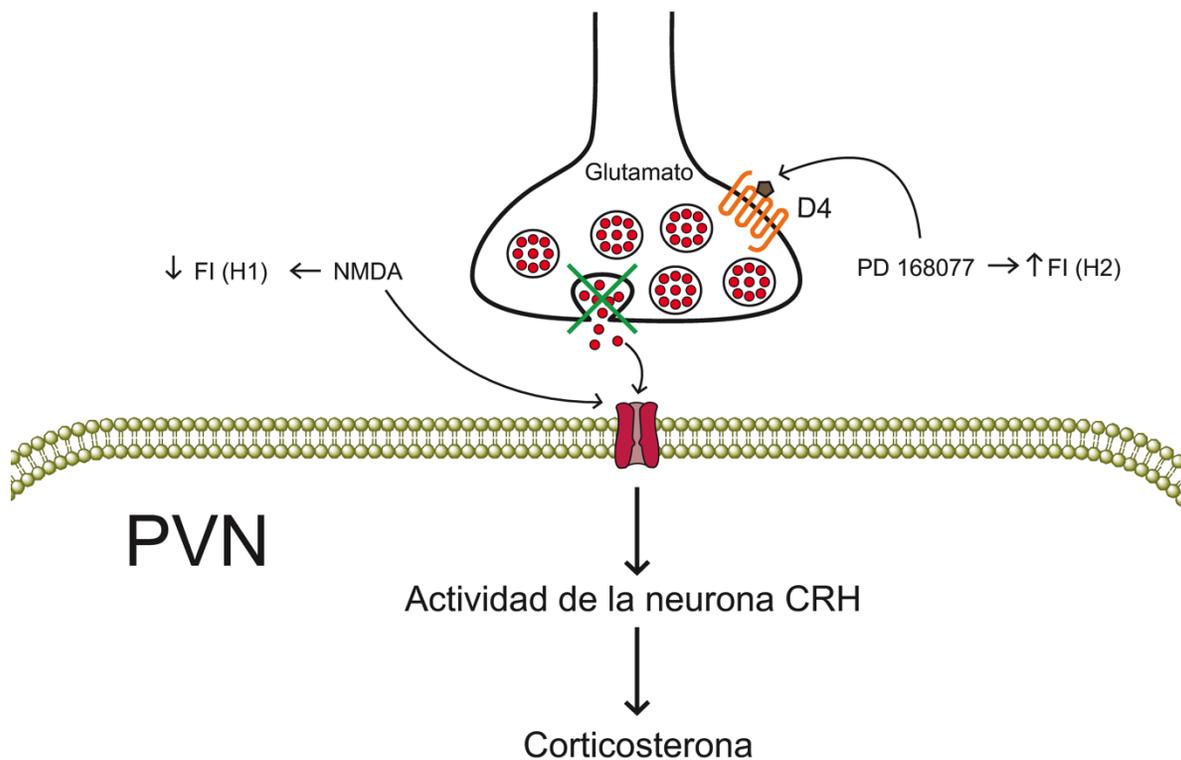


Figura 24. Esquema propuesto para los efectos de la activación del receptor a dopamina D4. Parte de los efectos de la activación del D4R sobre el incremento de la ingesta de alimento involucran de manera directa la inhibición de la transmisión glutamatérgica que inerva a neuronas que sintetizan CRH. Lo anterior tiene como consecuencia una disminución en la actividad de la neurona CRH y por ende, una disminución en los niveles de corticosterona en suero.

Al principio de los experimentos de RIA, las determinaciones de corticosterona se realizaron después de 30 ó 60 minutos de las inyecciones intra-PVN, encontrándose que los niveles de corticosterona no cambiaron significativamente por la administración de PD-168077 a los 60 minutos (datos no mostrados), razón por la cual los experimentos subsecuentes se llevaron a cabo a los 30 min, tiempo en el que el agonista selectivo D4 produjo disminución significativa de los niveles de corticosterona. Se sabe que el sistema neuroendocrino tiene dos procesos fundamentales relacionados a sus acciones como moto neuronas: a) La síntesis de péptidos y b) La liberación de estos. La tasa de la síntesis de péptidos se encuentra regulada por una amplia variedad de procesos dentro de la ruta

biosintética que transcurren desde la transcripción hasta la exocitosis. La liberación de péptidos en la vasculatura portal hipofisiaria es función del estado del potencial de membrana en la terminal, el cual se encuentra influenciado por una gran extensión de la integración de las entradas inhibitorias y excitatorias a las neuronas CRH. De esta manera, la regulación de la excitabilidad de la membrana es una respuesta inmediata que altera la tasa de liberación del péptido, mientras que las aferentes que regulan la síntesis de CRH (de la cual la transcripción del gen *Crh* es el componente inicial) es una respuesta retrasada y adaptativa que conduce a la acumulación del péptido, de esta manera se prepara a la neurona para respuestas a largo plazo (Watts, 2005). De lo anterior puede sugerirse que la activación de los receptores D4 sobre las neuronas CRH tiene un efecto rápido posiblemente afectando la excitabilidad de la membrana al inhibir la liberación de glutamato, este hecho produciría una disminución en la liberación de CRH, lo que traería como consecuencia una disminución en la liberación de ACTH y por ende una disminución en los niveles de corticosterona en suero.

7.5 Posible implicación de CRH y TRH sobre los efectos de la activación del receptor a D4 sobre la ingesta de alimento.

Existen dos receptores a CRH, el CRH-R1 y el CRH-R2, ambos acoplados a proteínas G estimuladoras (G_s). Es importante señalar que la CRH no sólo se expresa en las neuronas parvocelulares del PVN, sino también en otras regiones, una de estas es el LH que envía proyecciones CRHérgicas de manera abundante a la región parvocelular del PVN en donde se expresa CRH y TRH (Watts et al., 1999). Dado lo anterior, si el D4R se expresara en las terminales CRHérgicas, su activación podría inhibir la liberación de CRH y por consiguiente CRH no podría activar a los receptores CRH-R2 que se encuentran en el PVN (Chalmers et al., 1995), de esta forma la inhibición de un inhibidor de la ingesta de alimento traería como consecuencia un incremento en la ingesta de alimento, que es el efecto modulado por la dopamina vía la activación del receptor D4. No obstante, el efecto observado por la activación del receptor D4 sobre la ingesta de alimento se obtuvo

en la segunda hora de registro, tomando en consideración los resultados de liberación con la activación del receptor D4 sobre glutamato, si se trazara una línea de tendencia sobre los puntos cuando se inicia la inhibición de la liberación de glutamato se obtiene que aproximadamente a las 1.66 horas después de la acción del fármaco el efecto de este sería nulo, es decir, se llegaría al estado de liberación basal, de tal forma que los mecanismos involucrados con la transmisión glutamatérgica se restablecerían para poder incrementar la síntesis y liberación de CRH hasta obtener un efecto anorexigénico después de la alimentación.

De acuerdo con los resultados de los experimentos conductuales neuroquímicos y electrofisiológicos del presente estudio, es posible proponer que la activación de los receptores D4 en el PVN, al disminuir la liberación de glutamato, también disminuyó la actividad de las neuronas CRH, lo que a su vez se reflejó en la disminución de los niveles de corticosterona en suero a los 30 min de la administración del agonista de los receptores D4 en el PVN. Dado que los efectos sobre la ingesta de alimento se observaron en la segunda hora de registro, es necesario explicar la asincronía de los resultados. En primer lugar, es relevante mencionar que la administración de glucocorticoides (hidrocortisona) a dosis bajas y altas (5 y 15 mg/kg peso corporal) disminuye la ingesta de alimento y el peso corporal en ratas normales y obesas, así como los niveles del ARNm de NPY, AgRP y CART (Liu et al., 2011). No obstante la administración i.c.v. de glucocorticoides ha reportado mostrar incrementos en la ingesta de alimento y el peso corporal (Chen and Romsos, 1995, Zakrzewska et al., 1999). Debido a los efectos tan contrastantes de la corticosterona sobre la ingesta de alimento, se ha sugerido que la corticosterona presenta una curva dosis-respuesta bitónica sobre el peso corporal y la eficiencia en la alimentación (Devenport et al., 1989). Para explicar los presentes resultados, es necesario mencionar que el protocolo de alimentación restringida *per se* produjo el aumento de los niveles de corticosterona en el plasma de la rata, es decir, durante las observaciones conductuales existieron niveles basales de corticosterona altos; por lo que los efectos

conductuales de la activación de los receptores D4 del PVN no fueron observables sino hasta que el metabolismo de la corticosterona fue tal que el tono inhibitorio de ésta sobre la alimentación disminuyó (la vida media de la corticosterona total es de 25 minutos cuando se administran 5 mg/kg en ratas (Sainio et al., 1988).

En apoyo a lo anterior, cuando se somete a sujetos a estrés agudo por restricción, se ha observado una disminución en la ingesta de alimento, concomitantemente con un incremento en la expresión de POMC en el hipotálamo (Calvez et al., 2011), además las neuronas que sintetizan CRH en el PVN inervan y son inervadas por neuronas que sintetizan el péptido precursor anorexigénico POMC y por neuronas que producen el péptido orexigénico NPY en el ARC del hipotálamo (Chrousos, 1998, Williams et al., 2001). La inhibición en la ingesta de alimento inducida por estrés agudo puede ser debido a un efecto anoréxico directo de CRH (por ejemplo, a través de la inhibición de sistema nervioso parasimpático y sus consecuencias sobre la motilidad gástrica y el vaciado gástrico (Stengel and Tache, 2009), o debido a un efecto indirecto de CRH vía la inhibición de la expresión de NPY y/o la estimulación de la expresión de POMC en el hipotálamo (Morley et al., 1987, Heinrichs et al., 1993, Heinrichs and Richard, 1999, Millington, 2007).

Otra posible explicación de los resultados de los presentes experimentos es la participación de la hormona TRH. Se sabe que TRH administrada de manera central, al igual que CRH, inhibe la ingesta de alimento en ratas *ad-libitum* y privadas de alimento (Vijayan and McCann, 1977, Vogel et al., 1979, Morley and Levine, 1982, Suzuki et al., 1982, Horita, 1998, Steward et al., 2003). Sin embargo, se ha descrito que existen dos regiones neuronales que sintetizan TRH en el PVN que tienen efectos separados, por un lado encontramos a las neuronas que se encuentran en la parte medial parvocelular y periventricular en el PVN que son las que se relacionan con el eje HPT, estas se han relacionado con la termogénesis obligatoria y la termogénesis adaptativa, mientras que las neuronas de la parte

anterior parvocelular se están relacionadas con los efectos de inhibición sobre la ingesta de alimento (Lechan and Fekete, 2006).

Esto dificulta en gran medida el poder saber si las neuronas TRH fueron afectadas por la acción de la activación de los receptores D4, debido a que si se midieran los efectos del agonista D4 sobre los niveles de las hormonas tiroideas en suero (T4 y T3), un posible cambio en estas, no necesariamente estaría relacionado con la inhibición de la ingesta de alimento mediada por la activación de los receptores D4 (aunque si probablemente con la temperatura corporal de la rata), por otro lado si no se observaran cambios en estas hormonas, estos resultados nos harían pensar que probablemente la TRH vinculada al eje HPT no estaría participando en los efectos del D4, pero abre la posibilidad a que las neuronas que se encuentran en la parte anterior parvocelular del PVN si lo estén haciendo .

Una aproximación que nos ayudaría a comprender si las neuronas TRH se encuentran participando en los efectos del PD-168077 sería medir los niveles de pCREB, tanto en la zona que se encuentra relacionada con el eje HPT como en la que se encuentra relacionada con los efectos sobre la ingesta de alimento, cuando CREB es fosforilado, fosfoCREB (pCREB) recluta al co-activador CBP (proteína de enlace a CREB) para permitir la activación transcripcional del gene TRH, de esta forma, si el receptor D4 tuviese un efecto sobre la inhibición de glutamato o GABA sobre las neuronas que sintetizan TRH, esto se vería reflejado en una disminución o incremento de la actividad de estas neuronas y posiblemente dichos efectos pudieran observarse a nivel de pCREB. No obstante, se ha mostrado que el efecto en la reducción de la ingesta de alimento por TRH no es dependiente de catecolaminas, dado que el agotamiento de catecolaminas con 6-hidroxidopamina no bloquea la acción en la reducción de la ingesta de alimento por TRH (Vogel et al., 1979).

Debido al incremento de los niveles de corticosterona en las ratas habituadas al protocolo de restricción alimentaria, se hace evidente que un mejor entendimiento entre las vías que regulan el estrés y la alimentación así como de la recompensa es crítica para el desarrollo y la aplicación de nuevas terapias para la obesidad y el sobrepeso.

CONCLUSIONES

1. La activación de los receptores D4 en el núcleo paraventricular del hipotálamo incrementa la ingesta de alimento e inhibe la expresión de la saciedad en ratas sometidas a un protocolo de restricción de alimento por medio de la inhibición de la liberación de glutamato.
2. El receptor a dopamina D4 se encuentra de manera presináptica en terminales glutamatérgicas regulando la liberación de glutamato.
3. La activación de los receptores D4 puede disminuir la actividad de neuronas neurosecretoras que sintetizan CRH (disminuyendo la actividad del eje HPA), produciendo la disminución los niveles de corticosterona en suero, efecto mediado en parte por la activación de receptores NMDA.
4. La administración de NMDA previene los efectos hiperfágicos y de disminución de la corticosterona en plasma producidos por la activación de los receptores D4 del PVN, sugiriendo que los receptores D4 inhiben presinápticamente la liberación de glutamato para modular las salidas hipotalámicas que, por su parte, contribuyen con el control de la ingestión de alimento (estimulándolo).

Perspectivas y limitaciones

A partir de los estudios y discusiones mostrados a lo largo de esta tesis doctoral, las perspectivas se encaminan en futuros trabajos orientados a complementar los resultados ya mostrados, en un primer plano, se requieren experimentos destinados a localizar al receptor D4, es decir, si se encuentran localizados presinápticamente o postsinápticamente en neuronas magnocelulares y/o neuronas parvocelulares (de las cuales se distinguen dos subtipos, neurosecretoras y no neurosecretoras). Una vez dilucidado lo anterior, se podrían realizar experimentos para conocer con qué tipo de neuronas se encuentran haciendo sinapsis las terminales que pudieran expresar el receptor D4, por ejemplo, dentro de las neuronas magnocelulares, encontramos neuronas que sintetizan oxitocina y otras que lo hacen para vasopresina, mientras que en las neuronas parvocelulares neurosecretoras, se encuentran aquellas que expresan TRH y otras que producen CRH, otra parte no menos importante sería plantear experimentos que nos digan si el receptor D4 se expresa en otro tipo de terminales diferentes a las glutamatérgicas, debido a que se sabe que el receptor D4 podría expresarse en terminales GABAérgicas. Una vez que se conozcan las interrogantes anteriores, se podrían proponer experimentos encaminados a saber si la activación del receptor D4 en el PVN afecta el mRNA que codifica para CRH, TRH, oxitocina o vasopresina. Por otro lado, es posible que las neuronas del PVN se encuentren involucradas con la síntesis local de NPY en este núcleo, por lo cual sería muy interesante experimentos en donde se proponga conocer si el tratamiento con el agonista PD-168077 o incluso de otros agonistas dopaminérgicos (por ejemplo agonistas selectivos D2 y D3 respectivamente) afecta la expresión de este neuropéptido, e incluso determinar si la activación de estos receptores se encuentra involucrada con la liberación de NPY, AgRP, POMC, CART o GABA en el PVN.

REFERENCIAS

- Allen JM, Adrian TE, Tatemoto K, Polak JM, Hughes J, Bloom SR (1982) Two novel related peptides, neuropeptide Y (NPY) and peptide YY (PYY) inhibit the contraction of the electrically stimulated mouse vas deferens. *Neuropeptides* 3:71-77.
- Anand BKK, Brobeck JR (1951) Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 24:123-140.
- Arase K, York DA, Shimizu H, Shargill N, Bray GA (1988) Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am J Physiol* 255:E255-259.
- Arbogast LA, Voogt JL (1991) Ontogeny of tyrosine hydroxylase mRNA signal levels in central dopaminergic neurons: development of a gender difference in the arcuate nuclei. *Brain Res Dev Brain Res* 63:151-161.
- Azdad K, Piet R, Poulain DA, Oliet SH (2003) Dopamine D4 receptor-mediated presynaptic inhibition of GABAergic transmission in the rat supraoptic nucleus. *J Neurophysiol* 90:559-565.
- Baskerville TA, Allard J, Wayman C, Douglas AJ (2009) Dopamine-oxytocin interactions in penile erection. *Eur J Neurosci* 30:2151-2164.
- Berson SA, Yalow RS (1971) Applications of radioimmunoassay to problems of clinical interest. Sampling of some physiologic applications and diagnostic uses of radioimmunoassay indicates potentialities of method. *R I Med J* 54:501-508 passim.
- Berthoud HR, Morrison C (2008) The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol* 59:55-92.
- Bitner RS, Nikkel AL, Otte S, Martino B, Barlow EH, Bhatia P, Stewart AO, Brioni JD, Decker MW, Moreland RB (2006) Dopamine D4 receptor signaling in the rat paraventricular hypothalamic nucleus: Evidence of natural coupling involving immediate early gene induction and mitogen activated protein kinase phosphorylation. *Neuropharmacology* 50:521-531.
- Blundell JE, Rogers PJ, Hill AJ (1985) Behavioural structure and mechanisms of anorexia: calibration of natural and abnormal inhibition of eating. *Brain Research Bulletin* 15:371-376.
- Borisova NA, Saponova AY, Proshlyakova EV, Ugrumov MV (1991) Ontogenesis of the hypothalamic catecholaminergic system in rats: synthesis, uptake and release of catecholamines. *Neuroscience* 43:223-229.
- Bouthenet ML, Martres MP, Sales N, Schwartz JC (1987) A detailed mapping of dopamine D-2 receptors in rat central nervous system by autoradiography with [¹²⁵I]iodosulpride. *Neuroscience* 20:117-155.
- Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC (1991) Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ

- hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain research* 564:203-219.
- Bray GA, Greenway FL (1999) Current and potential drugs for treatment of obesity. *Endocrin Reviews* 20:805-875.
- Brobeck JR (1948) Regulation of energy exchange. *Annu Rev Physiol* 10:315-328.
- Brock JW, Farooqui S, Ross K, Prasad C (1992) Localization of dopamine D2 receptor protein in rat brain using polyclonal antibody. *Brain research* 578:244-250.
- Bullon P, Newman HN, Battino M (2014) Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontology 2000* 64:139-153.
- Byrne JHR, J.L. (2004) From Molecules to Networks. An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience. 250-261.
- Calvez J, Fromentin G, Nadkarni N, Darcel N, Even P, Tome D, Ballet N, Chaumontet C (2011) Inhibition of food intake induced by acute stress in rats is due to satiation effects. *Physiol Behav* 104:675-683.
- Carruba MO, Ricciardi S, Muller EE, Mantegazza P (1980) Anorectic effect of lisuride and other ergot derivatives in the rat. *Eur J Pharmacol* 64:133-141.
- Clifton PG, Rusk IN, Cooper SJ (1989) Stimulation and inhibition of food intake by the selective dopamine D2 agonist, N-0437: a meal pattern analysis. *Pharmacol Biochem Behav* 33:21-26.
- Cooper SJ, Al-Naser HA (2006) Dopaminergic control of food choice: contrasting effects of SKF 38393 and quinpirole on high-palatability food preference in the rat. *Neuropharmacology* 50:953-963.
- Cooper SJ, Francis J, Rusk IN (1990) The anorectic effect of SK&F 38393, a selective dopamine D1 receptor agonist: a microstructural analysis of feeding and related behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 100:182-187.
- Coulon JF, Biguet NF, Cavoy A, Delacour J, Mallet J, David JC (1990) Gene expression of tyrosine hydroxylase in the developing fetal brain. *J Neurochem* 55:1412-1417.
- Csaki A, Kocsis K, Halasz B, Kiss J (2000) Localization of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus studied by retrograde transport of. *Neuroscience* 101:637-655.
- Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB (1995) Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci* 15:6340-6350.
- Chen HL, Romsos DR (1995) A single intracerebroventricular injection of dexamethasone elevates food intake and plasma insulin and depresses metabolic rates in adrenalectomized obese (ob/ob) mice. *J Nutr* 125:540-545.
- Chrousos GP (1998) Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci* 851:311-335.

- Dahlstroem A, Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl SUPPL* 232:231-255.
- Dal-Zotto S, Marti O, Armario A (2000) Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behav Brain Res* 114:175-181.
- Decavel C, Van den Pol AN (1990) GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J Comp Neurol* 302:1019-1037.
- Defagot MC, Malchiodi EL, Villar MJ, Antonelli MC (1997) Distribution of D4 dopamine receptor in rat brain with sequence-specific antibodies. *Brain Res Mol Brain Res* 45:1-12.
- Del Castillo J, Katz B (1954) The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. *J Physiol* 124:553-559.
- Devenport L, Knehans A, Sundstrom A, Thomas T (1989) Corticosterone's dual metabolic actions. *Life Sci* 45:1389-1396.
- Ebenezer IS, Baldwin BA (1990) Effect of intracerebroventricular administration of the GABAB-receptor agonist baclofen on operant feeding in satiated pigs. *Br J Pharmacol* 101:559-562.
- Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B (1990) Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J Physiol* 430:213-249.
- Fazio G, Vernuccio D, Di Gesaro G, Bacarella D, D'Angelo L, Novo G, Novo S (2010) Obesity: a new pathology to pay attention to in young people. *Current pharmaceutical design* 16:463-467.
- Fekete C, Marks DL, Sarkar S, Emerson CH, Rand WM, Cone RD, Lechan RM (2004) Effect of Agouti-related protein in regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the melanocortin 4 receptor knockout mouse. *Endocrinology* 145:4816-4821.
- Fekete C, Wittmann G, Liposits Z, Lechan RM (2002) GABA-ergic innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain research* 957:251-258.
- Friedman E, Starr N, Gershon S (1973) Catecholamine synthesis and the regulation of food intake in the rat. *Life Sci* 12:317-326.
- Garcia-Iglesias BB, Mendoza-Garrido ME, Gutierrez-Ospina G, Rangel-Barajas C, Noyola-Diaz M, Terron JA (2013) Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: Involvement of 5-HT7 receptors. *Neuropharmacology* 71:216-227.
- Garcia SI, Landa MS, Porto PI, Alvarez AL, Schuman M, Finkielman S, Pirola CJ (2002) Thyrotropin-releasing hormone decreases leptin and mediates the leptin-induced pressor effect. *Hypertension* 39:491-495.
- Germano CM, de Castro M, Rorato R, Laguna MT, Antunes-Rodrigues J, Elias CF, Elias LL (2007) Time course effects of adrenalectomy and food intake on cocaine- and amphetamine-regulated transcript expression in the hypothalamus. *Brain research* 1166:55-64.

- Gillard ER, Dang DQ, Stanley BG (1993) Evidence that neuropeptide Y and dopamine in the perifornical hypothalamus interact antagonistically in the control of food intake. *Brain research* 628:128-136.
- Goldstein J, Perello M, Nillni EA (2007) PreproThyrotropin-releasing hormone 178-199 affects tyrosine hydroxylase biosynthesis in hypothalamic neurons: a possible role for pituitary prolactin regulation. *J Mol Neurosci* 31:69-82.
- Halford JC, Wanninayake SC, Blundell JE (1998) Behavioral satiety sequence (bss) for the diagnosis of drug action on food intake. *Pharmacol Biochem Behav* 1998 Oct;61(2):159-68.
- Harris RB, Zhou J, Mitchell T, Hebert S, Ryan DH (2002) Rats fed only during the light period are resistant to stress-induced weight loss. *Physiol Behav* 76:543-550.
- Hawkins MF, Barkemeyer CA, Tulley RT (1986) Synergistic effects of dopamine agonists and centrally administered neurotensin on feeding. *Pharmacol Biochem Behav* 24:1195-1201.
- Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Hauger RL, Koob GF (1993) Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain research* 611:18-24.
- Heinrichs SC, Richard D (1999) The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides* 33:350-359.
- Herman JP, Eyigor O, Ziegler DR, Jennes L (2000) Expression of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *J Comp Neurol* 422:352-362.
- Herman JP, Mueller NK, Figueiredo H (2004) Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration. *Ann N Y Acad Sci* 1018:35-45.
- Herman JP, Tasker JG, Ziegler DR, Cullinan WE (2002) Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration: glutamate-GABA connections. *Pharmacol Biochem Behav* 71:457-468.
- Hettes SR, Gonzaga J, Heyming TW, Perez S, Wolfsohn S, Stanley BG (2003) Dual roles in feeding for AMPA/kainate receptors: receptor activation or inactivation within distinct hypothalamic regions elicits feeding behavior. *Brain research* 992:167-178.
- Hoffman NW, Tasker JG, Dudek FE (1991) Immunohistochemical differentiation of electrophysiologically defined neuronal populations in the region of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *J Comp Neurol* 307:405-416.
- Horita A (1998) An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sci* 62:1443-1448.
- Horvath TL, Bechmann I, Naftolin F, Kalra SP, Leranath C (1997) Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain research* 756:283-286.

- Hsieh YS, Yang SF, Kuo DY (2005) Amphetamine, an appetite suppressant, decreases neuropeptide Y immunoreactivity in rat hypothalamic paraventriculum. *Regul Pept* 127:169-176.
- Huang XF, Yu Y, Zavitsanou K, Han M, Storlien L (2005) Differential expression of dopamine D2 and D4 receptor and tyrosine hydroxylase mRNA in mice prone, or resistant, to chronic high-fat diet-induced obesity. *Brain Res Mol Brain Res* 135:150-161.
- INSP E (2012) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, .
- Kaelin CB, Xu AW, Lu XY, Barsh GS (2004) Transcriptional regulation of agouti-related protein (Agrp) in transgenic mice. *Endocrinology* 145:5798-5806.
- Kandel ER, Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. (2000) *Principles of Neural Science*. 974-976.
- Kelliher P, Connor TJ, Harkin A, Sanchez C, Kelly JP, Leonard BE (2000) Varying responses to the rat forced-swim test under diurnal and nocturnal conditions. *Physiol Behav* 69:531-539.
- Kelly J, Alheid GF, Newberg A, Grossman SP (1977) GABA stimulation and blockade in the hypothalamus and midbrain: effects on feeding and locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav* 7:537-541.
- King BM (2006) The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav* 87:221-244.
- Krahn DD, Gosnell BA, Majchrzak MJ (1990) The anorectic effects of CRH and restraint stress decrease with repeated exposures. *Biol Psychiatry* 27:1094-1102.
- Kuo DY (2002) Co-administration of dopamine D1 and D2 agonists additively decreases daily food intake, body weight and hypothalamic neuropeptide Y level in rats. *J Biomed Sci* 9:126-132.
- Laprade N, Radja F, Reader TA, Soghomonian JJ (1996) Dopamine receptor agonists regulate levels of the serotonin 5-HT_{2A} receptor and its mRNA in a subpopulation of rat striatal neurons. *J Neurosci* 16:3727-3736.
- Lavine N, Ethier N, Oak JN, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois RV, Bouvier M, Hebert TE, Van Tol HH (2002) G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 277:46010-46019.
- Lechan RM, Fekete C (2006) The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res* 153:209-235.
- Leibowitz SF (1975) Amphetamine: possible site and mode of action for producing anorexia in the rat. *Brain research* 84:160-167.
- Li S, Pelletier G (1986) The role of dopamine in the control of neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 69:74-77.
- Liu XY, Shi JH, Du WH, Fan YP, Hu XL, Zhang CC, Xu HB, Miao YJ, Zhou HY, Xiang P, Chen FL (2011) Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats. *Exp Ther Med* 2:977-984.

- Luther JA, Daftary SS, Boudaba C, Gould GC, Halmos KC, Tasker JG (2002) Neurosecretory and non-neurosecretory parvocellular neurones of the hypothalamic paraventricular nucleus express distinct electrophysiological properties. *J Neuroendocrinol* 14:929-932.
- Luther JA, Tasker JG (2000) Voltage-gated currents distinguish parvocellular from magnocellular neurones in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *J Physiol* 523 Pt 1:193-209.
- Luttrell LM, van Biesen T, Hawes BE, Koch WJ, Touhara K, Lefkowitz RJ (1995) G beta gamma subunits mediate mitogen-activated protein kinase activation by the tyrosine kinase insulin-like growth factor 1 receptor. *J Biol Chem* 270:16495-16498.
- Masaki T, Yoshimichi G, Chiba S, Yasuda T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H (2003) Corticotropin-releasing hormone-mediated pathway of leptin to regulate feeding, adiposity, and uncoupling protein expression in mice. *Endocrinology* 144:3547-3554.
- Meister B (2000) Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam Horm* 59:265-304.
- Meister B, Villar MJ, Ceccatelli S, Hokfelt T (1990) Localization of chemical messengers in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei: an immunohistochemical study using experimental manipulations. *Neuroscience* 37:603-633.
- Miklos IH, Kovacs KJ (2002) GABAergic innervation of corticotropin-releasing hormone (CRH)-secreting parvocellular neurons and its plasticity as demonstrated by quantitative immunoelectron microscopy. *Neuroscience* 113:581-592.
- Millington GW (2007) The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond)* 4:18.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Mitchell PR, Doggett NS (1980) Modulation of striatal. *Life Sci* 26:2073-2081.
- Morley JE (1980) The neuroendocrine control of appetite: the role of the endogenous opiates, cholecystikinin, TRH, gamma-amino-butyric-acid and the diazepam receptor. *Life Sci* 27:355-368.
- Morley JE, Levine AS (1982) Corticotrophin releasing factor, grooming and ingestive behavior. *Life Sci* 31:1459-1464.
- Morley JE, Levine AS, Gosnell BA, Kneip J, Grace M (1987) Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. *Am J Physiol* 252:R599-609.
- Morton GJC, D.E.; Baskin, D.G.; Barsh, G.S.; Schwartz, M.W. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289-295.
- Mravec B, Lukackova R, Bodnar I, Kiss A, Pacak K, Palkovits M, Kvetnansky R (2007) Stress-induced alterations in catecholamine enzymes gene expression in the hypothalamic dorsomedial nucleus are modulated by caudal brain and not hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *Brain Res Bull* 74:147-154.

- Oak JN, Lavine N, Van Tol HH (2001) Dopamine D(4) and D(2L) Receptor Stimulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Is Dependent on trans-Activation of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor. *Mol Pharmacol* 60:92-103.
- Oliva JM, Manzanares J (2007) Gene transcription alterations associated with decrease of ethanol intake induced by naltrexone in the brain of Wistar rats. *Neuropsychopharmacology* 32:1358-1369.
- Oliver JE (2006) The politics of pathology: how obesity became an epidemic disease. *Perspectives in biology and medicine* 49:611-627.
- Ovesjo ML, Gamstedt M, Collin M, Meister B (2001) GABAergic nature of hypothalamic leptin target neurones in the ventromedial arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol* 13:505-516.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press Fourth Edition.
- Price CJ, Pittman QJ (2001) Dopamine D4 receptor activation inhibits presynaptically glutamatergic neurotransmission in the rat supraoptic nucleus. *J Neurophysiol* 86:1149-1155.
- Pu S, Jain MR, Horvath TL, Diano S, Kalra PS, Kalra SP (1999) Interactions between neuropeptide Y and gamma-aminobutyric acid in stimulation of feeding: a morphological and pharmacological analysis. *Endocrinology* 140:933-940.
- Retana-Marquez S, Bonilla-Jaime H, Vazquez-Palacios G, Dominguez-Salazar E, Martinez-Garcia R, Velazquez-Moctezuma J (2003) Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 28:207-227.
- Rieck RW, Ansari MS, Whetsell WOJ, Deutch AY, Kessler RM (2004) Distribution of dopamine D2-like receptors in the human thalamus: autoradiographic and PET studies. *Neuropsychopharmacology* 29:362-372.
- Roeling TA, van Erp AM, Meelis W, Kruk MR, Veening JG (1991) Behavioural effects of NMDA injected into the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain research* 550:220-224.
- Rusk IN, Cooper SJ (1989) Microstructural analysis of the anorectic effect of N-0437, a highly selective dopamine D2 agonist. *Brain research* 494:350-358.
- Sainio EL, Lehtola T, Roininen P (1988) Radioimmunoassay of total and free corticosterone in rat plasma: measurement of the effect of different doses of corticosterone. *Steroids* 51:609-622.
- Sanacora G, Kershaw M, Finkelstein JA, White JD (1990) Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology* 127:730-737.
- Sanna F, Succu S, Hubner H, Gmeiner P, Argiolas A, Melis MR (2011) Dopamine D2-like receptor agonists induce penile erection in male rats: differential role of D2, D3 and D4 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Behav Brain Res* 225:169-176.

- Sanna F, Succu S, Melis MR, Argiolas A (2012) Dopamine agonist-induced penile erection and yawning: differential role of D(2)-like receptor subtypes and correlation with nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats. *Behav Brain Res* 230:355-364.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
- Smith SR, de Jonge L, Pellymounter M, Nguyen T, Harris R, York D, Redmann S, Rood J, Bray GA (2001) Peripheral administration of human corticotropin-releasing hormone: a novel method to increase energy expenditure and fat oxidation in man. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1991-1998.
- Stanley BG, Willett VLr, Donias HW, Dee MGn, Duva MA (1996) Lateral hypothalamic NMDA receptors and glutamate as physiological mediators of eating and weight control. *Am J Physiol* 270:R443-449.
- Stanley BG, Willett VLr, Donias HW, Ha LH, Spears LC (1993) The lateral hypothalamus: a primary site mediating excitatory amino acid-elicited eating. *Brain research* 630:41-49.
- Stengel A, Tache Y (2009) Neuroendocrine control of the gut during stress: corticotropin-releasing factor signaling pathways in the spotlight. *Annu Rev Physiol* 71:219-239.
- Steward CA, Horan TL, Schuhler S, Bennett GW, Ebling FJ (2003) Central administration of thyrotropin releasing hormone (TRH) and related peptides inhibits feeding behavior in the Siberian hamster. *Neuroreport* 14:687-691.
- Stratford TR, Kelley AE (1997) GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci* 17:4434-4440.
- Suzuki T, Kohno H, Sakurada T, Tadano T, Kisara K (1982) Intracranial injection of thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses starvation-induced feeding and drinking in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 17:249-253.
- Swart I, Jahng JW, Overton JM, Hout TA (2002) Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 283:R1020-1026.
- Swart I, Overton JM, Hout TA (2001) The effect of food deprivation and experimental diabetes on orexin and NPY mRNA levels. *Peptides* 22:2175-2179.
- Tasker JG, Dudek FE (1991) Electrophysiological properties of neurones in the region of the paraventricular nucleus in slices of rat hypothalamus. *J Physiol* 434:271-293.
- Tejas-Juárez (2008) Papel de la dopamina y de los receptores D4 en el núcleo paraventricular del hipotálamico en control alimentario. Tesis de Maestría.
- Terry P, Gilbert DB, Cooper SJ (1995) Dopamine receptor subtype agonists and feeding behavior. *Obes Res* 3 Suppl 4:515S-523S.
- Tillet Y, Kitahama K (1998) Distribution of central catecholaminergic neurons: a comparison between ungulates, humans and other species. *Histol Histopathol* 13:1163-1177.

- Touhara K, Hawes BE, van Biesen T, Lefkowitz RJ (1995) G protein beta gamma subunits stimulate phosphorylation of Shc adapter protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9284-9287.
- Ugrumov MV, Taxi J, Tixier-Vidal A, Thibault J, Mitskevich MS (1989) Ontogenesis of tyrosine hydroxylase-immunopositive structures in the rat hypothalamus. An atlas of neuronal cell bodies. *Neuroscience* 29:135-156.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F (2008) Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:158-168.
- van den Pol AN (2003) Weighing the role of hypothalamic feeding neurotransmitters. *Neuron* 40:1059-1061.
- van den Pol AN, Herbst RS, Powell JF (1984) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons of the hypothalamus: a light and electron microscopic study. *Neuroscience* 13:1117-1156.
- Van der Weide J, De Vries JB, Tepper PG, Horn AS (1986) Pharmacological profiles of three new, potent and selective dopamine receptor agonists: N-0434, N-0437 and N-0734. *Eur J Pharmacol* 125:273-282.
- Vettor R, Fabris R, Pagano C, Federspil G (2002) Neuroendocrine regulation of eating behavior. *J Endocrinol Invest* 25:836-854.
- Vijayan E, McCann SM (1977) Suppression of feeding and drinking activity in rats following intraventricular injection of thyrotropin releasing hormone (TRH). *Endocrinology* 100:1727-1730.
- Vogel RA, Cooper BR, Barlow TS, Prange AJJ, Mueller RA, Breese GR (1979) Effects of thyrotropin-releasing hormone on locomotor activity, operant performance and ingestive behavior. *J Pharmacol Exp Ther* 208:161-168.
- Watts AG (2005) Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Front Neuroendocrinol* 26:109-130.
- Watts AG, Sanchez-Watts G, Kelly AB (1999) Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration-induced anorexia. *J Neurosci* 19:6111-6121.
- Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH (2001) The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74:683-701.
- Wittmann G, Lechan RM, Liposits Z, Fekete C (2005) Glutamatergic innervation of corticotropin-releasing hormone- and thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain research* 1039:53-62.
- Zakrzewska KE, Cusin I, Stricker-Krongrad A, Boss O, Ricquier D, Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F (1999) Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes* 48:365-370.
- Zarrindast MR, Owji AA, Hosseini-Nia T (1991) Evaluation of dopamine receptor involvement in rat feeding behaviour. *Gen Pharmacol* 22:1011-1016.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.

Zhou QY, Palmiter RD (1995) Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell* 83:1197-1209.

Ziegler DR, Cullinan WE, Herman JP (2002) Distribution of vesicular glutamate transporter mRNA in rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 448:217-229.