

LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D2/D3 HIPOTALÁMICOS PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO

HYPOTHALAMIC DOPAMINERGIC D2/D3 RECEPTORS ARE INVOLVED IN FEEDING BEHAVIOR REGULATION

JUAN GABRIEL TEJAS JUÁREZ¹, JUAN MANUEL MANCILLA DÍAZ², BENJAMÍN FLORÁN GAR-
DUÑO³, RODRIGO ERICK ESCARTÍN PÉREZ^{2,3,*}

¹ DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DEL CINVESTAV, ZACATENCO

² LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA DE LA ALIMENTACIÓN, FES IZTACALA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

³ DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS DEL CINVESTAV

Resumen

La dopamina es un neurotransmisor fuertemente involucrado con la regulación del comportamiento alimentario. Se ha reportado que diferentes agonistas dopaminérgicos pueden inducir inhibición de la ingesta voluntaria de alimento, mientras que la ausencia de dopamina endógena produce una profunda hipofagia. El conocimiento de que, tanto los receptores a dopamina D2 como el ARNm que codifica para el receptor D3, se expresan en el núcleo paraventricular hipotalámico (NPH) ha sugerido que los receptores D2-like podrían desempeñar un papel importante en la regulación dopaminérgica de la alimentación. El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de la activación de los receptores D2/D3 en el NPH sobre la ingesta de alimento y la secuencia de saciedad conductual (SSC). Ratas macho Wistar (220-240 g) recibieron inyecciones intra-NPH de agonistas y/o antagonistas de los receptores D2/D3 o D4, posteriormente la ingesta de alimento y la SSC fueron evaluados durante 2 horas (fase oscura del ciclo luz/oscuridad). Los resultados muestran que la activación de los receptores D2/D3 del NPH disminuyen significativamente la ingesta de alimento en la primer hora sin desestabilizar la SSC. Lo anterior sugiere que la dopamina puede producir efectos inhibitorios vía receptores D2/D3 en el NPH.

Palabras clave: dopamina, receptores D2-like, núcleo paraventricular hipotalámico (NPH), Secuencia de Saciedad Conductual (SSC), ingesta de alimento.

Proyecto financiado por UNAM DGAPA IN 309008. Contribución de los autores: Colección y análisis de datos: JGTJ, REEP. Obtención de recursos: JMMD, REEP

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

Abstract

Dopamine is a neurotransmitter strongly involved in the feeding behavior regulation. It has been reported that different dopamine receptor agonists inhibited voluntary food intake, nevertheless, dopamine depletion induced intense hypophagia. Current knowledge of D2 receptors and D3 mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) suggests that D2-like receptors may be playing a main role in the dopaminergic feeding behavior regulation. The aim of the present study was to evaluate the effects of paraventricular D2/D3 receptor activation on food intake and behavioral satiety sequence (BSS) in rats. Male Wistar rats (220-240 g) were intra-PVN injected with D2/D3/D4 receptor agonists and/or antagonists, and food intake and BSS were evaluated during 2 hours (dark phase of light cycle). The obtained results showed that intra-PVN D2/D3 activation significantly decreased food intake without disrupting the BSS. The above results strongly suggest that hypothalamic dopamine induces inhibitory effects on food intake via D2/D3 receptors in the PVN.

Keywords: Dopamine, D2-like receptors, PVN, BSS, Food intake

Introducción

Para la mayoría de los organismos (especialmente mamíferos), la composición y cantidad de alimento varía considerablemente de una comida a otra. Las emociones, factores sociales, la hora del día, la conveniencia, así como el costo y la disponibilidad del alimento son sólo algunas de las variables que afectan la ingesta de energía de un periodo de alimentación a otro. Consecuentemente, la ingesta energética diaria es variable y no siempre se correlaciona con el gasto energético. A pesar de esta inconsistencia, el balance energético se logra mediante cambios compensatorios en la ingesta o en el gasto energético; este fenómeno refleja un proceso regulatorio activo denominado homeostasis energética, proceso mediante el cual se logra la estabilidad en la cantidad de la energía almacenada en el cuerpo en forma de grasa (Morton, Cummings, Baskin, Barsh, & Schwartz, 2006). Cuando existe un desbalance entre la cantidad de energía consumida y el gasto energético sin que haya un ajuste compensatorio (por ejemplo incremento de la actividad metabólica), se puede presentar aumento del peso corporal y posteriormente sobrepeso u obesidad. Actualmente la obesidad ha alcanzado niveles epidémicos en todo el mundo, representando serios problemas médicos y de salud pública. El sobrepeso y la obesidad se encuentran directamente asociados con un incremento en el riesgo de morbilidad para enfermedades metabólicas y cardiovasculares (enfermedades del corazón, hipertensión, dislipidemia, diabetes tipo II, infartos), cáncer (endometrial, de seno, próstata y colon), gastrointestinales (enfermedades del hígado y la vejiga), reproducción (infertilidad, ovarios poliquísticos), osteoarticulares, entre otras (Vucetic, et al., 2010). Para prevenir la ingestión excesiva de nutrientes, el organismo

cuenta con sensores que detectan disponibilidad y coordinan efectores de la ingesta de energía y su utilización. Así, actualmente se ha prestado una considerable atención a la identificación y caracterización de los sensores de nutrientes y sus blancos, una aproximación integrativa de estos puede conducir a estrategias para un tratamiento efectivo de la obesidad y los desórdenes metabólicos relacionados (Blouet & Schwartz, 2010). Dado lo anterior, es de gran importancia el estudio de los mecanismos que regulan la homeostasis energética.

Históricamente, uno de los primeros agentes que se emplearon para el tratamiento de la obesidad y el sobrepeso fue la anfetamina (Bray & Greenway, 1999). Su efecto consiste básicamente en la supresión del apetito (Leibowitz, 1975) y el incremento de la actividad (Norton, 1973). Posteriormente se determinó que sus efectos sobre la alimentación estaban ligados a la activación de receptores dopaminérgicos de la familia D2-like, pues el tratamiento con el antagonista haloperidol podía prevenir dicho efecto hipofágico (Leibowitz, 1975). Si bien es cierto que la anfetamina actualmente no se usa clínicamente para el tratamiento de la obesidad, existen numerosas evidencias que sugieren que el papel de la dopamina en el control alimentario es más complejo de lo que se creía, por lo que se requiere de profundizar el estudio de la función de sus receptores para proponer alternativas terapéuticas que tengan menores efectos secundarios. De acuerdo con evidencia experimental reciente, los efectos anorexigénicos de la dopamina (movilizada por anfetamina), están asociados con la reducción de la actividad del neuropéptido Y (NPY) y su ARNm en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPH) (Hsieh, Yang, & Kuo, 2005). En contraste con lo anterior, se ha reportado que los ratones deficientes de dopamina sufren de una profunda hipofagia y son hipoactivos, sólo con el tratamiento con L-DOPA (precursor de la dopamina) se revierten éstas características (Zhou & Palmiter, 1995). Tales resultados indican que, por un lado, el incremento de la dopamina en el espacio sináptico inducido por la anfetamina (o los inhibidores de la captura de dopamina) tiene un efecto supresor del consumo de alimento, mientras que la ausencia de dopamina endógena puede producir una profunda hipofagia. De tal forma, surge una interrogante: ¿Como es posible que la dopamina pueda tener efectos diametralmente opuestos? Al parecer, el efecto estimulador o inhibidor de la ingesta de alimento que produce la dopamina depende del subtipo de receptor que sea activado. De acuerdo con algunos estudios, la activación de los receptores de la familia D2-like podría explicar los efectos hipofágicos de la dopamina, ya que la administración de quinpirole (agonista no selectivo D2/D3/D4) disminuye la preferencia del alimento palatable (Cooper & Al-Naser, 2006); por su parte, la activación específica de los receptores D2 con N 0437, reduce significativamente la ingesta de alimento estándar y la tasa local de alimentación (Rusk & Cooper, 1989). En consistencia con lo anterior, otros estudios han reportado que agonistas, como la bromocriptina, que tienen mayor afinidad por el receptor D2 igualmente producen disminución de la ingesta de alimento (Davis, et al., 2009).

El análisis de la secuencia de saciedad conductual (SSC) es considerada una herramienta útil para el diagnóstico del efecto de fármacos sobre la ingesta de alimento. La SSC es el nombre que se le da a la transición ordenada de la alimentación, la actividad (por ejemplo el acicalamiento) y el descanso medido durante el periodo postingestivo. Debido a que la SSC refleja las operaciones de los procesos fisiológicos naturales que son la base de la saciedad, la SSC puede ser usada para discriminar entre diferentes fármacos (y otras manipulaciones) que reducen la ingesta de alimento vía los mecanismos fisiológicos naturales o aquellos que lo hacen por una interferencia. La SSC se observa cuando existe la presencia de una carga calórica en el intestino (por el alimento ingerido) y los factores de saciedad preabsortivos que dispara dicha carga calórica. La SSC puede ser analizada por una observación continua en vez de tiempos o técnicas de muestreo de eventos, estas observaciones continuas también permiten conocer la duración y la frecuencia de cada conducta a ser analizada, aunado a esto, pueden ser utilizadas para determinar si los perfiles asociados con la reducción de la ingesta de alimento son causados por náusea, sedación, hiperactividad o una palatabilidad alterada del alimento (Halford, Wanninayake, & Blundell, 1998). Por su parte, los estudios en los que se emplea un protocolo de ayuno moderado (3, 6 y 12 horas) han mostrado un incremento en la ingesta de alimento (gramos) y su duración (segundos) sólo en el ayuno de 6 y 12 horas (no así en la frecuencia) en la parte inicial de la prueba. Todas las condiciones de ayuno produjeron un cambio considerable a la derecha (un retraso) en la SSC, confirmando la gran sensibilidad de esta medida relativa a la ingesta de alimento per se (Ishii, Blundell, Halford, & Rodgers, 2003). De tal forma, este tipo de programas de alimentación restringida permiten registrar una ingesta de alimento basal alta y, por lo tanto, es posible identificar con detalle los efectos de los fármacos sobre el comportamiento alimentario.

Por otro lado, estudios recientes realizados por nuestro grupo de trabajo han mostrado que la activación del receptor a dopamina D4 en el NPH incrementa la ingesta de alimento (Tejas-Juárez, 2009), por lo que el efecto anorexigénico del quinpirole (agonista de los receptores D2-like) sólo puede ser explicado por su afinidad por los receptores D2/D3. En consistencia con lo anterior, se ha reportado que la administración sistémica de quinpirole incrementa significativamente la ingestión de alimento estándar mientras que el consumo de alimento palatable disminuye (Cooper & Al-Naser, 2006). Así, la evidencia experimental hasta ahora disponible sugiere que la dopamina hipotalámica podría estimular la ingesta de alimento cuando activa a los receptores D4, mientras que al activar a los D2/D3 podría producir el efecto opuesto. Así, con la finalidad de probar la hipótesis de que los receptores D2/D3 del NPH son en parte responsables de los efectos hipofágicos de la activación de los receptores D2-like, en el presente estudio se evaluaron los efectos de la activación de los receptores D2/D3 del NPH sobre el control del comportamiento alimentario mediante el registro de la ingestión voluntaria de alimento y el análisis de la SSC en ratas habituadas a un programa de alimentación restringida.

Método

Sujetos

Ratas macho de la cepa Wistar pesando entre 220 y 240 g al inicio de las sesiones de habituación. Las ratas fueron mantenidas en cajas habitación individuales con el ciclo de luz/oscuridad de 12 x 12 horas invertido (las luces se apagaban a las 08:00 h) y a una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio general del CINVESTAV. Los procedimientos empleados en el presente estudio son acordes con las Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio establecidos en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Dieta y programa de alimentación restringida

Las ratas tuvieron acceso *ad libitum* al agua, mientras que la dieta sólida (alimento estándar) estuvo disponible como se indica más adelante en el programa de alimentación restringida, mismo que fue diseñado con el objetivo de mantener un nivel basal de ingesta alto sin que se presentara pérdida de peso corporal de las ratas, como ocurre en otros protocolos de restricción de alimento. El programa de alimentación restringida (Figura 1) consistió en tres ciclos de A) alimentación *ad libitum* (24 horas), B) deprivación del alimento (22 horas), y 3) alimentación restringida (acceso al alimento durante 2 horas). El ciclo inicia colocando a las ratas en cajas habitación individuales con alimentación *ad-libitum* (día 0), el día siguiente se retira el alimento a las ratas por 22 horas después de la segunda hora del inicio del periodo de oscuridad (día 1), posteriormente se da acceso al alimento a los sujetos solamente durante dos horas en el inicio de la fase oscura del ciclo de luz (día 2). Este ciclo se repite nuevamente de los días 3-5 y 8-10, cabe destacar que para prevenir la pérdida de peso corporal las ratas tuvieron acceso al alimento *ad libitum* 24 horas después de la alimentación restringida. La cirugía estereotáxica se realizó después del segundo ciclo (día 7) teniendo un día anterior alimentación *ad libitum* como preparación para la misma, después del tercer ciclo se realizan las inyecciones intrahipotalámicas (día 11). Todas las observaciones (2 registros conductuales de una hora), fueron realizadas en el inicio de la fase oscura del ciclo luz/oscuridad del día 10 (Figura 2).

Fármacos e inyecciones

Los fármacos empleados en el presente estudio incluyeron al agonista D2-like, quinpirole (Sigma Aldrich CO. St. Louis, MO USA), el antagonista D4, L 745870 (Sigma Aldrich CO. St. Louis, MO USA) y el agonista selectivo D2/D3, quinolorane (Research Biochemicals International, MA USA). La administración de los fármacos se realizó antes del inicio de la fase oscura del ciclo luz/oscuridad (Figura 2). Los fármacos fueron infundidos a una velocidad de 0.25 microlitros por minuto y en volumen de 0.5 microlitros en el núcleo paraventricular hipotalámico. Para asegurar

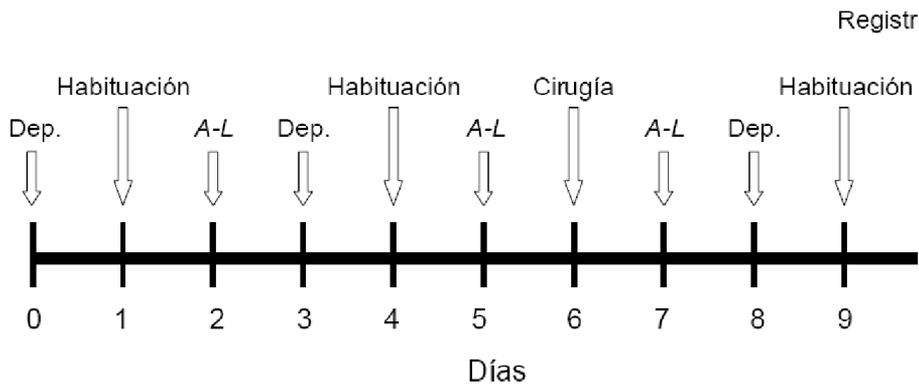


Figura 1. Programa de habituación a las condiciones experimentales (alimentación restringida). El día del registro de la secuencia de saciedad conductual (SSC) se administran los fármacos intra-NPH. A-L= *Ad libitum*.

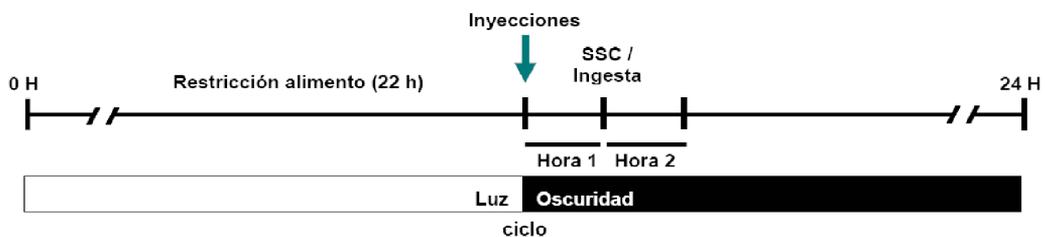


Figura 2. Representación esquemática del momento de los tratamientos y los registros conductuales. SSC, secuencia de saciedad conductual.

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).

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. Estando bajo los efectos de la anestesia, fueron colocados en el aparato estereotáxico y se les implantó una cánula guía en el área suprayacente al NPH (Figura 3). Las coordenadas estereotáxicas (con relación a bregma) empleadas fueron: - 0.07 mm antero-posterior; - 0.04 mm latero-medial y - 0.67 mm dorso-ventral (Paxinos, Watson, Pennisi, & Topples, 1985). La cánula de inyección fue fijada al cráneo mediante un tornillo de acero y cemento acrílico dental. Los animales tuvieron un periodo de 4 días para recuperarse de la cirugía.

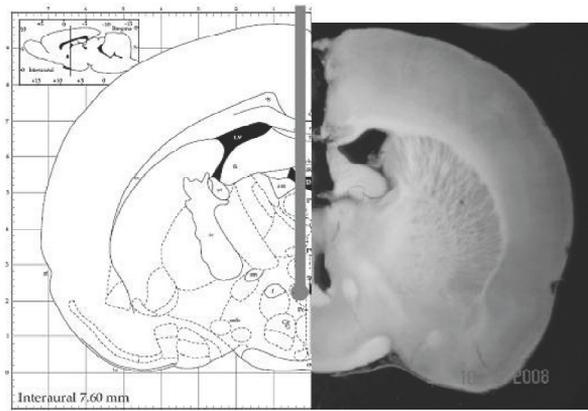


Figura 3. Representación esquemática del sitio de canulación y área de inyección en un corte coronal de cerebro de rata.

Registros conductuales

Posterior a las inyecciones intrahipotalámicas, se realizaron dos registros de duración continua (60 minutos cada uno) durante las 2 horas de acceso al alimento (inicio de la fase oscura del ciclo de luz/oscuridad) del día 11 (Figura 1). La grabación de los registros se llevó a cabo mediante una cámara de video conectada a un grabador de DVD; la grabación se realizó en un cuarto oscuro adecuado para tal efecto y en presencia de luz roja. La videograbación fue analizada posterior al análisis histológico, siendo las ratas correctamente canuladas e inyectadas las utilizadas para la determinación de las categorías conductuales de la secuencia de saciedad conductual. Durante los dos periodos de registro se determinó la ingesta de alimento (gramos) de manera independiente (hora 1 y hora 2). Las ratas tuvieron acceso al agua todo el tiempo. El análisis de la secuencia de saciedad conductual se efectuó en los mismos periodos de tiempo (hora 1 y hora 2) a partir de la videograbación.

Para el análisis de la secuencia de saciedad conductual, cada hora de registro fue dividida en 12 segmentos (5 minutos c/u) y se cuantificó la duración (segundos) de 5 categorías conductuales mutuamente excluyentes: alimentación, ingesta de agua, acicalamiento, actividad y descanso. Al no encontrarse diferencias significativas (por efecto de los tratamientos) en las duraciones de las categorías conductuales de beber agua y acicalamiento, estas duraciones fueron incorporadas a la categoría actividad, mostrándose en la sección de los resultados únicamente las categorías alimentación, actividad y descanso. Los datos fueron expresados en términos de medias \pm el error estándar de la media (EEM) de las duraciones (segundos) de las categorías conductuales de cada registro (hora 1 y hora 2). La SSC está definida como la progresión ordenada de la alimentación al descanso, del tal forma que inicialmente se determinó el periodo promedio en el que los sujetos dejan de alimentarse para descansar, este momento se representa gráficamente con una línea vertical en

la SSC. Para el análisis cuantitativo de la secuencia de saciedad conductual, a partir de los datos de las duraciones de cada una de las 3 categorías conductuales, se calculó del área bajo la curva (ABC) y se expresó en términos de medias \pm el EEM.

Diseño experimental

Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a grupos independientes de 5-7 ratas y se habituaron de acuerdo al paradigma de restricción alimentaria ya descrito. El diseño experimental que se empleó para determinar los efectos de los diferentes tratamientos incluyó a los siguientes grupos: 1) Vh + Vh (Salina 0.9 %) (n= 5), 2) Vh + Quinpirole (0.1 μ g; n= 6), 3) L 745870 (0.1 μ g) + Quinpirole (0.1 μ g) (n= 6), 4) Vh + Quinelorane (0.1 μ g; n= 7), 5) L 745870 (0.1 μ g) + Vh (n= 7). Posterior a las inyecciones, los sujetos fueron colocados de nuevo en sus cajas habitación donde el alimento pre-pesado se encontraba en el comedero y, simultáneamente con el inicio la fase oscura del ciclo de luz, se realizaron los registros de duración continua (hora 1 y hora 2). Las ratas sólo recibieron uno de los diferentes tratamientos.

Histología

Posterior a los registros conductuales, las ratas fueron sacrificadas por una sobredosis de pentobarbital sódico e inmediatamente 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 (24 horas después) se realizaron cortes coronales de 200 μ g para verificar el sitio de inyección del fármaco (Figura 3). En el presente reporte sólo se incluyeron los datos de los sujetos que fueron inyectados en el NPH (un total de 31 ratas distribuidas en los diferentes grupos).

Análisis estadístico

La significancia de las diferencias en cuanto a la ingestión de alimento de los diferentes grupos en cada hora de registro se determinó mediante un ANOVA de dos vías. Para dicho análisis estadístico se consideró el tratamiento (factor grupo) y la hora de registro (hora 1 y hora 2, factor hora registro). Posterior al ANOVA significativo, se realizó la prueba *post hoc* de Bonferroni para las comparaciones múltiples. 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 tratadas estadísticamente con diferentes ANOVA de dos vías y comparaciones múltiples de Bonferroni. El software empleado para el análisis estadístico fue el Graph Pad Prism 5.0. El criterio para determinar la significancia estadística de las diferencias fue $p < 0.05$.

Resultados

Ingesta

El ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas en la ingesta de alimento de los diferentes grupos, resultando una interacción (tratamiento x hora registro) significativa ($F_{(4,49)} = 3.655$; $p < 0.05$), además de un efecto significativo del factor hora registro ($F_{(1,48)} = 135.5$; $p < 0.001$). Las comparaciones múltiples evidenciaron que tanto la administración de quinpirole en presencia de L 745870 (grupo L 745870 + quinpirole), como de quinolorane (grupo quinolorane + Vh), disminuyó significativamente la ingestión de alimento en la primer hora de registro (hora 1). Los tratamientos con quinpirole o con L 745870 por sí mismos no tuvieron efecto alguno (Figura 4).

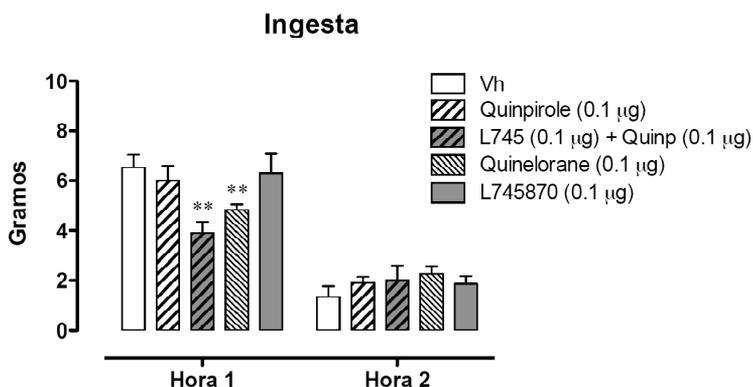


Figura 4. Media \pm EEM de la ingesta de alimento (gramos) durante los registros de la primera y segunda hora (Hora 1 y Hora 2). ** $p < 0.05$ vs grupo Vh + Vh. L745= L 745870, Quinp= Quinpirole.

Análisis de la secuencia de saciedad conductual

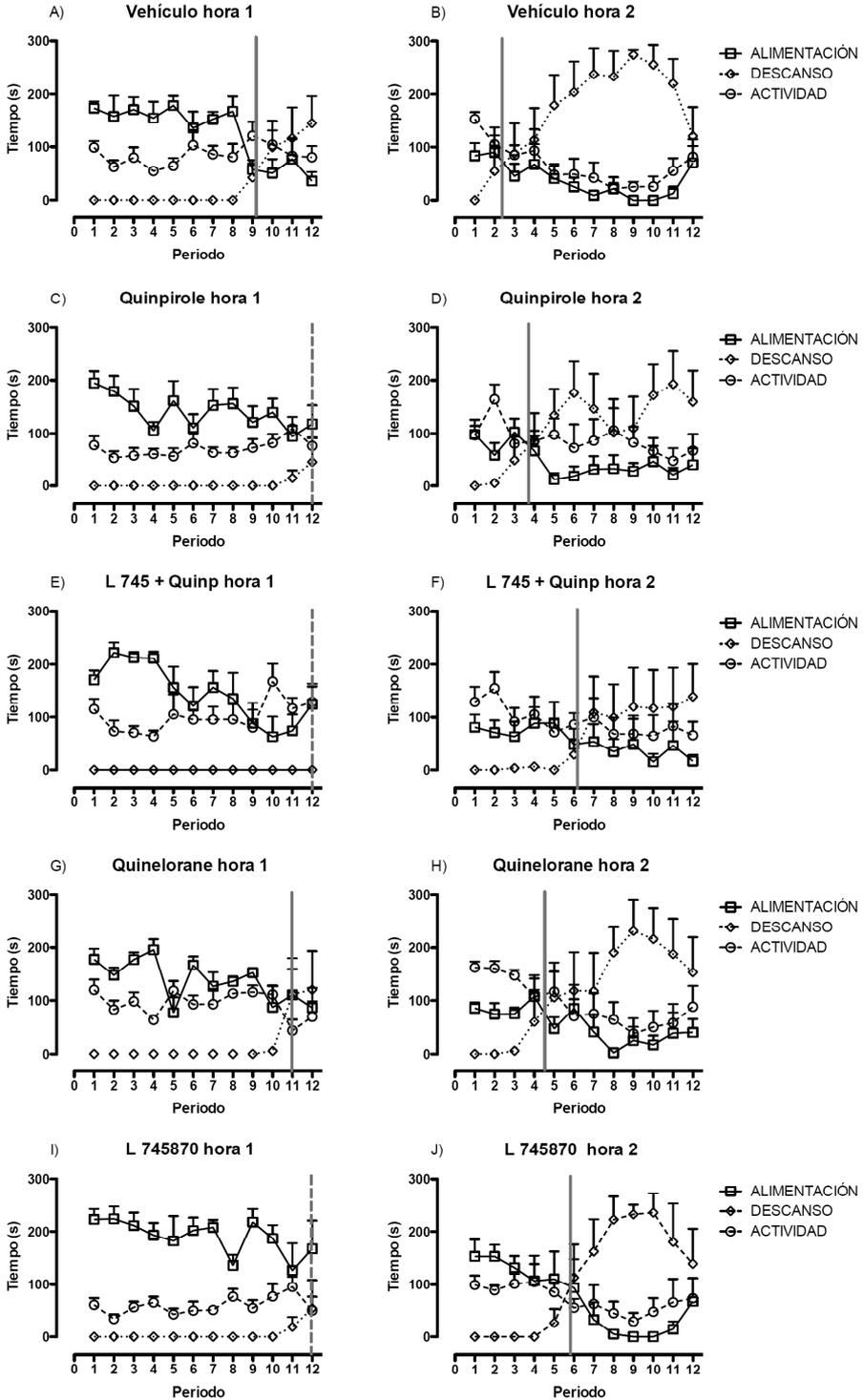
De acuerdo con el análisis de la secuencia de saciedad conductual, durante los primeros periodos de tiempo de la hora de registro 1, en el grupo Vh + Vh los sujetos mostraron un patrón conductual de saciedad donde la categoría conductual predominante fue el consumo de alimento, disminuyendo progresivamente hacia el final de los primeros 60 minutos, mientras que paralelamente se incrementó el tiempo del descanso (transición alimentación-descanso entre periodos 9-10). Durante la segunda hora de registro, los sujetos tratados con vehículo iniciaron nuevos episodios de alimentación, aunque a partir del periodo 3, los sujetos emplearon 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 5 A y B).

Por su parte, la administración central de quinpirole previno la transición alimentación-descanso observada en la primera hora de registro de la situación control,

mientras que en la segunda hora de registro se retrasó ligeramente la aparición de la saciedad (periodo 4); también se observó que la administración intrahipotalámica de quinpirole (0.1 μ g) produjo una tendencia a disminuir el tiempo de descanso en la segunda hora de registro (cuando se observa la saciedad postprandial), sin que esto represente la desestabilización de la secuencia de saciedad conductual (Figura 5 C y D). En el grupo L 745870 + Quinpirole no se observó desestabilización de la secuencia de saciedad conductual, únicamente se encontró que el tiempo de descanso en la primera hora de registro tiende a disminuir al final del registro (hora 1); durante la segunda hora de registro (hora 2), en este grupo se retrasó la aparición de la saciedad en tres periodos (transición observada en el periodo 6, a diferencia de la situación control que presentó la transición en el periodo 3); de igual forma, se observó una disminución del tiempo de descanso cuando se presenta la expresión de la saciedad alimentaria (hacia el final del segundo registro, hora 2) (Figura 5 E y F). Por otra parte, la administración intrahipotalámica de quinlorane retrasó la aparición de la saciedad por un periodo (periodo 4) sin desestabilizar la SSC (Figura 5 G y H). El antagonista de los receptores D4 por sí mismo produjo una tendencia a disminuir el tiempo de descanso durante el final de la primer hora de registro y durante el inicio de la segunda, sin que haya sido desestabilizada la secuencia de saciedad conductual (Figura 5 I y J).

El análisis cuantitativo de las duraciones de cada una de las categorías conductuales en los diferentes grupos se muestra en la Figura 6. Con relación a la duración de la ingestión de alimento, se encontró un efecto significativo del factor tratamiento ($F_{(4,49)} = 3.655$; $p < 0.01$) y las comparaciones múltiples revelaron que la duración del grupo tratado con el antagonista de los receptores D4, L 745870, produjo un incremento del tiempo en que los sujetos se alimentaron (Figura 6 A). Con respecto a la duración de la actividad, ninguno de los tratamientos produjo cambio en alguno en los registros conductuales (Figura 6 B). Por el contrario, la duración del tiempo de descanso en la segunda hora de registro mostró diferencias significativas como efecto principal del factor tratamiento ($F_{(4,49)} = 3.94$; $p < 0.01$), específicamente los grupos Vh + quinpirole, L 745870 + quinpirole y L 745870 descansaron durante menos tiempo en comparación con el grupo Vh + Vh (Figura 6 C). Finalmente, se calculó el consumo de alimento por unidad de tiempo (mg/hora, tasa local de alimentación [TLA]) y se encontró un efecto significativo del factor tratamiento ($F_{(4,49)} = 3.949$; $p < 0.01$), donde el grupo L 745870 + quinpirole consumió una menor cantidad de alimento por unidad de tiempo durante la primer hora de registro (Figura 6 D).

Figura 5 (sig. pag) Duración media \pm EEM de las categorías conductuales de alimentación (cuadrado con línea continua), descanso (rombo con línea discontinua) y actividad (circulo con línea discontinua) en las diferentes condiciones: Vh + Vh, Quinpirole + Vh (0.1 μ g), L745870 (0.1 microgramo) + Quinpirole (0.1 μ g), Quinelorane (0.1 microgramo) y L745870 (0.1 microgramo). La línea vertical gris continua representa la transición de la ingesta al descanso (transición de la alimentación al descanso), cuando es discontinua dicha transición no se presenta durante el tiempo de registro.



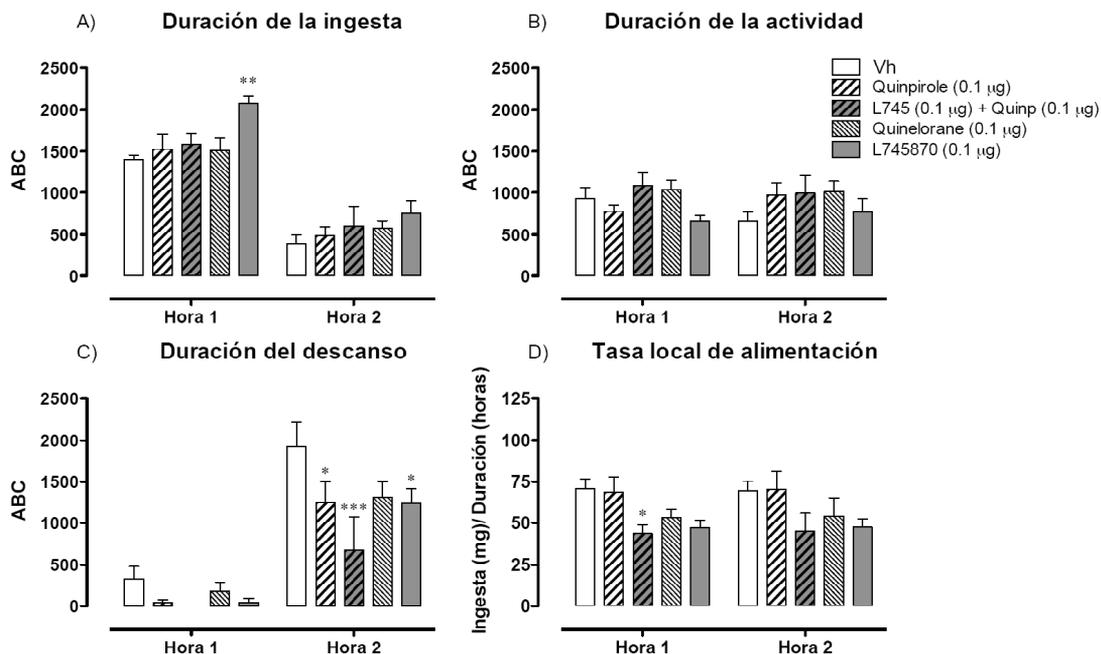


Figura 6. Media \pm EEM del área bajo la curva (ABC) de los periodos de registro Hora 1 y Hora 2 de la duración de la ingesta (A), actividad (B) y descanso (C), así como de la Tasa local de Alimentación (D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Vh + Vh.

Discusión y conclusiones

Uno de los primeros fármacos utilizados para el tratamiento de la obesidad fue la anfetamina, misma que compite con la dopamina por la unión al transportador de dopamina (DAT), induciendo un eflujo de dopamina citoplasmática vía el DAT, es decir, la dopamina es transportada del interior de la terminal hacia el espacio sináptico, no es un proceso de liberación por exocitosis sino que el transportador funciona en sentido opuesto (Kahlig & Galli, 2003), esto incrementa el nivel de dopamina extracelular, lo que a su vez aumenta la probabilidad de que se activen los receptores dopaminérgicos. Dicha activación no selectiva de los receptores dopaminérgicos es la principal responsable de los efectos anorexigénicos de la anfetamina (Cole, 1973; Burridge & Blundell, 1979). Así, parte del efecto anorexigénico de la anfetamina ha sido atribuido a los receptores D2-like, ya que el antagonista D2-like sulpiride previene dicho efecto (Leibowitz, 1975).

En el presente estudio se encontró que la activación de los receptores D2/D3 (grupos L 745870 + quinpirole y Vh + Quinelorane) consistentemente disminuye la ingesta de alimento sin alterar el patrón conductual de la SSC (se sigue observando

la transición ordenada de la alimentación al descanso), únicamente disminuyó el tiempo del descanso en la segunda hora de registro. En el grupo donde se estimulan los receptores D2/D3 con quinpirole mientras están bloqueados los receptores D4 con L 745870, se observó la disminución significativa del consumo de alimento por unidad de tiempo (TLA), lo anterior sin que se presentara efecto de sedación o hiperactividad (no aumenta el tiempo de descanso, tampoco incrementa el tiempo de actividad), sugiriendo que el proceso motivacional afectado fue el del apetito (proceso que dirige y guía a la alimentación una vez que ha iniciado la alimentación). Considerando que los fármacos que activan a los receptores dopaminérgicos D2-like de manera no selectiva, en general (por ejemplo la anfetamina), inducen hipofagia por mecanismos conductuales inespecíficos (hiperactividad, desestabilización de la secuencia de saciedad conductual) (Blundell, Rogers, & Hill, 1985; Simansky & Vaidya, 1990; Kitchener & Dourish, 1994; Halford, et al., 1998), los resultados del presente estudio sugieren que los receptores D2/D3 son potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento de algunas patologías del comportamiento alimentario (obesidad, trastorno por atracón, comedores compulsivos).

Una alternativa de explicación del rol de los receptores D2/D3 en el control hipotalámico de la alimentación consiste en la modulación de la liberación de neurotransmisores hipotalámicos. A este respecto, se ha mostrado que existen terminales glutamatérgicas y GABAérgicas que inervan al NPH y que participan activamente en la regulación del comportamiento alimentario (Decavel & Vandepol, 1990; van den Pol, Wuarin, & Dudek, 1990; Csaki, Kocsis, Halasz, & Kiss, 2000). Los estudios al respecto muestran que tanto la administración intrahipotalámica del agonista GABA_A, muscimol, (Grandison & Guidotti, 1977; Kelly, Alheid, Newberg, & Grossman, 1977; Pu, et al., 1999), como la de NMDA (por la misma vía) producen un efecto hiperfágico (Stanley, Willett, Donias, Dee, & Duva, 1996; Roeling, van Erp, Meelis, Kruk, & Veening, 1991), lo que sugiere que el efecto hipofágico de la activación de los receptores D2/D3 podría estar relacionado con la inhibición de la transmisión GABAérgica y glutamatérgica. En apoyo a esta idea, se ha reportado que el NPY y el GABA se coexpresan en las neuronas del núcleo arqueado (ARC) (Horvath, Bschmann, Naftolin, Kalra, & Leranth, 1997) que proyectan hacia el NPH (Bai, et al., 1985); adicionalmente, se ha reportado la presencia del ARNm del receptor D2 en las neuronas del ARC (Mansour, et al., 1990), de forma que el receptor D2 podría estar expresado en las terminales NPY/GABAérgicas que inervan al NPH. Lo anterior ayudaría a explicar los efectos de los agonistas D2/D3, mismos que podrían estar inhibiendo la liberación de NPY y GABA, produciendo un efecto hipofágico.

También el ARNm que codifica para el receptor D2 se ha encontrado en el NPH (Mansour, et al., 1990), por lo que el receptor D2 puede expresarse en las neuronas de este núcleo. La activación del receptor D2 puede disminuir la expresión del ARNm del NPY en el núcleo ARC (Li & Pelletier, 1986), lo cual es consistente con una posible disminución de los niveles de NPY en el NPH mediado por la activación de los receptores D2 como lo hace en el ARC. Además, se tiene conocimiento

de que el incremento de la dopamina producido por anfetamina se relaciona con la disminución del NPY en el NPH (Hsieh, et al., 2005).

Por otro lado, se ha observado que la restricción crónica de alimento puede disminuir la expresión del DAT en la superficie de sinaptosomas del estriado, donde la dopamina muestra una afinidad normal hacia el DAT (Zhen, Reith, & Carr, 2006), sin embargo en estos estudios el protocolo de restricción crónica de alimento se realiza en un tiempo de 15-20 días hasta que el peso corporal de los sujetos de estudio disminuye al 80 %; esta restricción puede conducir a adaptaciones a nivel postsináptico de los receptores D1 y D2, lo que llevaría a un incremento en la señalización de estos receptores a dopamina (Carr, Tsimberg, Berman, & Yamamoto, 2003). En el presente estudio, el programa de alimentación restringida los sujetos alcanzan el 86 % del peso corporal inicial en el momento de las observaciones. A pesar de que se ha observado que una privación modesta (10 gramos de alimento por día para ratas con peso de 250-350 gramos) puede reducir el aclaramiento de dopamina y la sensibilidad a fármacos que activen los receptores dopaminérgicos en el estriado (Sevak, et al., 2008), actualmente no se han realizado estudios sobre los efectos que puedan tener una privación de alimento crónica o moderada sobre la sensibilidad del DAT y de los mismos receptores a dopamina en el NPH, aunque no se descarta la posibilidad de que se lleven a cabo cambios debido a la alimentación restringida, por lo que sería necesario realizar estudios en donde se evalúe la afinidad de los receptores de la familia D2-like (D2, D3 y D4) y el DAT en el programa de alimentación restringida.

En conclusión, los resultados del presente estudio indican que la activación de los receptores D2/D3 del NPH juegan un papel inhibitorio de la alimentación y de la tasa local de alimentación (consumo de alimento por unidad de tiempo) en la primer hora de registro, además de que la expresión de la saciedad postprandial se retrasa en ambos grupos en donde se activaron los receptores D2/D3 durante las observaciones de la segunda hora de registro, lo que sugiere que la disminución en la tasa local de alimentación en la primer hora podría estar relacionada con el retraso de la aparición de la saciedad postprandial en la segunda hora de registro. A partir de estos resultados, se propone realizar estudios donde se active a los receptores D2 y D3 de manera independiente para dilucidar el efecto que dicha activación tiene sobre la ingesta de alimento estándar, igualmente sería importante evaluar el efecto tiene la activación de los receptores D2, D3 y D4 de manera independiente, sobre la ingesta de alimento palatable.

Referencias

- Bai, F. L., Yamano, M., Shiotani, Y., Emson, P. C., Smith, A. D., Powell, J. F., et al. (1985). An Arcuato-Paraventricular and Arcuato-Dorsomedial Hypothalamic Neuropeptide Y-Containing System Which Lacks Noradrenaline in the Rat. *Brain Research*, 331(1), 172-175.

- Blouet, C., & Schwartz, G. J. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behavioural Brain Research*, 209(1), 1-12.
- Blundell, J. E., Rogers, P. J., & Hill, A. J. (1985). Behavioural structure and mechanisms of anorexia: calibration of natural and abnormal inhibition of eating. *Brain Research Bulletin*, 15(4), 371-376.
- Bray, G. A., & Greenway, F. L. (1999). Current and potential drugs for treatment of obesity. *Endocrine Reviews*, 20(6), 805-875.
- BurrIDGE, S. L., & Blundell, J. E. (1979). Amphetamine anorexia: antagonism by typical but not atypical neuroleptics. *Neuropharmacology*, 18(5), 453-457.
- Carr, K. D., Tsimberg, Y., Berman, Y., & Yamamoto, N. (2003). Evidence of increased dopamine receptor signaling in food-restricted rats. *Neuroscience*, 119(4), 1157-1167.
- Cole, S. O. (1973). Hypothalamic feeding mechanisms and amphetamine anorexia. *Psychol Bull*, 79(1), 13-20.
- Cooper, S. J., & Al-Naser, H. A. (2006). Dopaminergic control of food choice: contrasting effects of SKF 38393 and quinpirole on high-palatability food preference in the rat. *Neuropharmacology*, 50(8), 953-963.
- 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 [H-3]D-aspartate autoradiography. *Neuroscience*, 101(3), 637-655.
- Davis, L. M., Michaelides, M., Cheskin, L. J., Moran, T. H., Aja, S., Watkins, P. A., et al. (2009). Bromocriptine Administration Reduces Hyperphagia and Adiposity and Differentially Affects Dopamine D2 Receptor and Transporter Binding in Leptin-Receptor-Deficient Zucker Rats and Rats with Diet-Induced Obesity. *Neuroendocrinology*, 89(2), 152-162.
- Decavel, C., & Vandenpol, A. N. (1990). Gaba - a Dominant Neurotransmitter in the Hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 302(4), 1019-1037.
- Grandison, L., & Guidotti, A. (1977). Stimulation of Food-Intake by Muscimol and Beta-Endorphin. *Neuropharmacology*, 16(7-8), 533-536.
- Halford, J. C. G., Wanninayake, S. C. D., & Blundell, J. E. (1998). Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 61(2), 159-168.
- Horvath, T. L., Bechmann, I., Naftolin, F., Kalra, S. P., & Leranth, C. (1997). Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Research*, 756(1-2), 283-286.
- Hsieh, Y. S., Yang, S. F., & Kuo, D. Y. (2005). Amphetamine, an appetite suppressant, decreases neuropeptide Y immunoreactivity in rat hypothalamic paraventriculum. *Regulatory Peptides*, 127(1-3), 169-176.
- Ishii, Y., Blundell, J. E., Halford, J. C., & Rodgers, R. J. (2003). Effects of systematic variation in presatiation and fasting on the behavioural satiety sequence in

- male rats. *Physiology & Behavior*, 79(2), 227-238.
- J.G. Tejas-Juárez, A. M. C.-M., N. M. Cendejas-Trejo, F. J. Paz-Bermúdez, J. M. Mancilla-Díaz, B. Florán-Garduño, R. E. Escartín-Pérez. (2009 oct). Role of dopamine D4 receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus on satiety and food intake regulation. *39Th Annual Meeting Neuroscience 2009*.
- Kahlig, K. M., & Galli, A. (2003). Regulation of dopamine transporter function and plasma membrane expression by dopamine, amphetamine, and cocaine. *European Journal of Pharmacology*, 479(1-3), 153-158.
- Kelly, J., Alheid, G. F., Newberg, A., & Grossman, S. P. (1977). GABA stimulation and blockade in the hypothalamus and midbrain: effects on feeding and locomotor activity. *Pharmacological Biochemical Behavioural*, 7(6), 537-541.
- Kitchener, S. J., & Dourish, C. T. (1994). An examination of the behavioural specificity of hypophagia induced by 5-HT1B, 5-HT1C and 5-HT2 receptor agonists using the post-prandial satiety sequence in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 113(3-4), 369-377.
- Leibowitz, S. F. (1975). Amphetamine: possible site and mode of action for producing anorexia in the rat. *Brain Research*, 84(1), 160-167.
- Li, S., & Pelletier, G. (1986). The role of dopamine in the control of neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroscience Letters*, 69(1), 74-77.
- Mansour, A., Meador-Woodruff, J. H., Bunzow, J. R., Civelli, O., Akil, H., & Watson, S. J. (1990). Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *Journal of Neuroscience*, 10(8), 2587-2600.
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443(7109), 289-295.
- Norton, S. (1973). Amphetamine as a Model for Hyperactivity in Rat. *Physiology & Behavior*, 11(2), 181-186.
- Paxinos, G., Watson, C., Pennisi, M., & Topple, A. (1985). Bregma, Lambda and the Interaural Midpoint in Stereotaxic Surgery with Rats of Different Sex, Strain and Weight. *Journal of Neuroscience Methods*, 13(2), 139-143.
- Pu, S. Y., Jain, M. R., Horvath, T. L., Diano, S., Kalra, P. S., & Kalra, S. P. (1999). Interactions between neuropeptide Y and gamma-aminobutyric acid in stimulation of feeding: A morphological and pharmacological analysis. *Endocrinology*, 140(2), 933-940.
- Roeling, T. A., van Erp, A. M., Meelis, W., Kruk, M. R., & Veening, J. G. (1991). Behavioural effects of NMDA injected into the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Research*, 550(2), 220-224.
- Rusk, I. N., & Cooper, S. J. (1989). Microstructural Analysis of the Anorectic Effect of N-0437, a Highly Selective Dopamine-D2 Agonist. *Brain Research*, 494(2), 350-358.
- Sevak, R. J., Koek, W., Owens, W. A., Galli, A., Daws, L. C., & France, C. P. (2008).

- Feeding conditions differentially affect the neurochemical and behavioral effects of dopaminergic drugs in male rats. *European Journal of Pharmacology*, 592(1-3), 109-115.
- Simansky, K. J., & Vaidya, A. H. (1990). Behavioral Mechanisms for the Anorectic Action of the Serotonin (5-Ht) Uptake Inhibitor Sertraline in Rats - Comparison with Directly Acting 5-Ht Agonists. *Brain Research Bulletin*, 25(6), 953-960.
- Stanley, B. G., Willett, V. L., Donias, H. W., Dee, M. G., & Duva, M. A. (1996). Lateral hypothalamic NMDA receptors and glutamate as physiological mediators of eating and weight control. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 39(2), R443-R449.
- van den Pol, A. N., Wuarin, J. P., & Dudek, F. E. (1990). Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science*, 250(4985), 1276-1278.
- Vucetic, Z., Totoki, K., Schoch, H., Whitaker, K. W., Hill-Smith, T., Lucki, I., et al. (2010). Early life protein restriction alters dopamine circuitry. *Neuroscience*, 168(2), 359-370.
- Zhen, J., Reith, M. E., & Carr, K. D. (2006). Chronic food restriction and dopamine transporter function in rat striatum. *Brain Research*, 1082(1), 98-101.
- Zhou, Q. Y., & Palmiter, R. D. (1995). Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell*, 83(7), 1197-1209.