



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

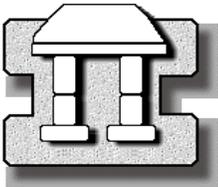
**EFFECTO DEL 8-OH-DPAT SOBRE LA CONDUCTA ALIMENTARIA Y  
EXPRESIÓN GENICA DE LOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> DEL NÚCLEO  
PARAVENTRICULAR HIPOTÁLAMICO DE RATA.**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
BIÓLOGA  
P R E S E N T A:  
MELISA RITO DOMINGO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN MANUEL MANCILLA DÍAZ**

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ  
CON APOYO DE PAPIIT DGAPA IN304405 y IN304406**

***LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO 2007***





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología de la Alimentación de la UNAM, FES Iztacala, bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Mancilla Díaz con el apoyo de:

Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez y M. en C. Verónica Elsa López Alonso

Bajo la revisión de:

Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero

M. en C. Arturo Calderón Vega

M. en C. Ángel Duran Díaz

M. en C. Ramón Víctor Moreno Torres

Proyecto financiado por: **PAPIIT DGAPA IN304405 y IN304406**

## ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN.....	5
I- INTRODUCCIÓN.....	6
II- ANTECEDENTES.....	8
a) Alimentación y conducta alimentaria.....	8
b) La serotonina .....	10
c) Distribución de las neuronas serotoninérgicas en el hipotálamo.....	11
d) Serotonina y conducta alimentaría.....	14
e) Biosíntesis de la serotonina.....	15
f) Receptores serotoninérgicos.....	17
g) Relación de la conducta alimentaría y los receptores 5-HT.....	18
h) Receptores 5-HT <sub>1A</sub> .....	19
i) 8-OH-DPAT.....	22
III- JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	24
IV- OBJETIVO GENERAL.....	25
V- OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
VI- MATERIAL Y METODOS.....	26
a) Sujetos.....	26
b) Dieta.....	26
c) Fármaco.....	26
d) Procedimiento experimental.....	27
e) Selección de los sujetos experimentales.....	27
f) Cirugía.....	27
g) Diseño experimental.....	28
1.1 Grupos control.....	28
1.2 Grupos experimentales.....	28
h) Histología y preservación de tejido.....	28
g) Extracción de RNA.....	29
h) Transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	29
i) Primers.....	30
j) Electroforesis.....	30
k) Parámetros conductuales.....	30
l) Análisis de datos.....	31

VI- RESULTADOS.....	33
a) Ingesta grupos control.....	33
b) Secuencia de saciedad conductual (SSC).....	34
c) Área bajo la curva (ABC).....	40
1.1 Ingesta.....	40
1.2 Descanso.....	41
1.3 Actividad.....	42
d) Tasa local de alimentación.....	44
e) Extracción de RNA.....	45
f) Electroforesis.....	46
VII DISCUSIÓN.....	48
a) Ingesta.....	48
b) Secuencia de saciedad conductual.....	49
c) Área bajo la curva y tasa local de alimentación.....	51
d) Extracción de RNA y electroforesis.....	51
VIII CONCLUSIONES.....	54
IX PERSPECTIVAS.....	56
X REFERENCIAS.....	58
Anexo 1.....	68
Anexo 2.....	69
Anexo 3.....	72

## RESUMEN

La serotonina (5-HT) cuenta con una de las principales señales neuroquímicas de la saciedad postprandial, particularmente se ha asociado a esta señal con la activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub>. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto subcrónico del (±)-8-Hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin (8-OH-DPAT) sobre la secuencia de saciedad conductual (SSC). Usando ratas macho Wistar de 200 a 220 g, adaptadas a una dieta de cafetería con fuentes separadas de nutrimentos (carbohidratos, proteínas y grasas). Mediante cirugía estereotáxica, en el Núcleo Paraventricular Hipotalámico (NPV), se administraron dosis de 8-OH-DPAT (0.328, 0.525, 2.1 y 4.2 µg). Se realizó el análisis de 60 min., donde se observaron cuatro categorías conductuales, mutuamente excluyentes (alimentación, descanso, beber y actividad). También se evaluó la presencia de RNA mediante espectrofotometría, posteriormente, se amplificó el segmento del receptor por medio de RT-PCR para la posterior electroforesis. El análisis de la SSC mostró que la administración de todas las dosis de 8-OH-DPAT produce un incremento en la duración de la actividad y la disminución del tiempo de consumo de alimento. Sin embargo, dado que en la cantidad de alimento ingerido no se observaron diferencias, el efecto del 8-OH-DPAT puede traducirse en un incremento del consumo de alimento por unidad de tiempo. Se determinó que el segmento del receptor 5-HT<sub>1A</sub> no fue amplificado pese a ser extraída una cantidad consistente de RNA. Los resultados del presente estudio sugieren que la activación aguda de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> del NPV, pudiera modificar significativamente la ingesta de alimento por unidad de tiempo y no el consumo neto. Por lo que la participación de estos receptores se relaciona más con la regulación de los aspectos temporales de la conducta alimentaria.

**Palabras clave:** Conducta Alimentaria, Núcleo Paraventricular Hipotalámico (NPV), 8-OH-DPAT, receptores 5-HT<sub>1A</sub>, RNA, RT-PCR.

## INTRODUCCIÓN

La alimentación es un proceso biológico que realizan los seres vivos para tolerar la continua demanda de energía por parte del organismo. Este evento es considerado el inicio del metabolismo de los nutrientes y es regulada mediante mecanismos localizados en el sistema nervioso (Bowman y Russell, 2003). En la actualidad no solo se debe conocer la sintomatología de las patologías más comunes en el ámbito alimentario como la bulimia, la anorexia y la obesidad, se debe de entender los mecanismos de acción de éstas, para prevenirlas y tratarlas de formas confiables y eficientes. La unión de diferentes áreas de la ciencia, ha permitido brindar explicaciones conjuntas para entender como es que se integra y regula la conducta de la alimentación.

Los neurotransmisores han fungido como una pieza clave al intentar entender la influencia del sistema nervioso en esta actividad, las investigaciones han detectado que la serotonina cuenta con una gran influencia en la ingesta de alimento y que algunos núcleos hipotalámicos, como el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) con una concentración alta de receptores serotoninérgicos afectan de forma importante los estados de saciedad (Leibowitz y Alexander, 1998)

La necesidad de entender como es que un sistema como el serotoninérgico funciona para dar paso no solo a esta función fisiológica sino a muchas otras, como la regulación de la temperatura, el ritmo circadiano (Morien, *et al.*, 1995), deriva en la búsqueda de los diferentes subtipos de receptores que han logrado ser clasificados por las especificidad de unión a la molécula de serotonina (5-HT). Así se dio paso a una clasificación donde se encuentran 14 diferentes tipos de receptores con características y funciones muy particulares, siendo los receptores 5-HT<sub>1</sub> los más específicos al ligando. No es de sorprender que la acción del receptor 5-HT<sub>1A</sub> esté involucrado en la alimentación, que es considerada una de las de las necesidades primarias para los organismos (Hoyer, *et al.*, 2002).

Dada la importancia los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, el uso de herramientas farmacológicas no se ha hecho esperar al producir agonistas y antagonistas para la manipulación de sus efectos.

Conocido como el agonista más específico aún en la actualidad, el 8-OH-DPAT ha sido usado para la caracterización y localización de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, en diferentes áreas; ya sea para detectar la presencia del receptor o para conocer el efecto del receptor en distintas regiones cerebrales (Assié y Koek, 2000).

Como la mayoría de los fármacos, este agonista cuenta con ventajas y desventajas al usarse, descartando su potencial uso terapéutico pese a saber de la influencia con la que cuenta en la alimentación.

El desarrollo de estrategias que contribuyan al uso terapéutico de estos fármacos como modelos, así como aprovechando los beneficios para tratar a nivel celular trastornos como los del comportamiento alimentario (anorexia y bulimia) o patologías como la obesidad, son en conjunto técnicas actualmente usadas para obtener resultados favorables a largo plazo (Ishii, *et al.*, 2003).

Por lo que el propósito de este trabajo es evaluar los efectos de la administración subcrónica del 8-OH-DPAT sobre la conducta alimentaria y la expresión génica del receptor 5-HT<sub>1A</sub> del NPV de ratas.

## ANTECEDENTES

### **Alimentación y Conducta Alimentaria**

La alimentación es una actividad mediada por la cantidad de energía que requiere el organismo. Para la Organización Mundial de la Salud (OMS), los requerimientos energéticos son cubiertos a través de “la ingesta de energía, necesaria para equilibrar el gasto energético, que permite mantener la actividad física necesaria”; mediante la demanda calórica se cubre la tasa metabólica, adquirida a partir del alimento disponible (Bowman y Russell, 2003).

El consumo de energía y el gasto energético son equilibrados, mediante mecanismos biológicamente sensibles y comprende procesos complejos, superpuestos en el orden bioquímico, endocrinológico, fisiológico nervioso y del comportamiento, que son funcionalmente interdependientes.

Las observaciones en los niveles más básicos han permitido desglosar el funcionamiento de la conducta, la farmacología y la neurotransmisión celular, descifrando cómo es que la interacción de estos niveles, interactúa en la alimentación.

La farmacología de la alimentación ha permitido esclarecer el mecanismo, mediante el cual, el metabolismo afecta en el consumo de alimento.

Las investigaciones que relacionan a los neurotransmisores y la conducta alimentaria han demandado técnicas que permitan monitorear y medir la conducta, permitiendo mostrar la congruencia de los efectos farmacológicos (Blundel, 1984).

Entre las observaciones que se deben llevar a cabo, está “el flujo conductual”, el cual incluye las características cualitativas de la conducta de alimentarse, como la duración y la frecuencia de conductas particulares (López, *et al.*, 2002).

Al describir las conductas que preceden y ocurren durante el periodo de observación, es posible detectar la influencia de los fármacos al interrumpir por más de una reacción, la fase de alimentación. Para determinar y delimitar la percepción de estos efectos, es importante tener presente la diferenciación entre hambre y apetito. La primera hace referencia a la estimulación de la alimentación; mientras que el apetito es el proceso por el cual se dirige y guía el comer, iniciando la alimentación. La saciación por otra parte, se refiere al proceso mediante el cual la alimentación cesa y sólo es estimulada cuando el cese de la alimentación ocurre como consecuencia de la ingesta de alimentos; mientras que la saciedad es el estado de inhibición de una próxima alimentación (Mancilla y Pérez, 1992).

Distintos investigadores han descrito la transición ordenada de comer, acicalarse y descansar posterior a la ingesta de alimento, como una secuencia de conductas estereotipadas que llevan por nombre secuencia de saciedad conductual (SSC).

La SSC refleja a la fisiología (medio interno) del organismo, fundamentalmente expresando la saciedad ya que los eventos son excluyentes (Blundell, 1984).

Mediante esta secuencia, es posible discriminar entre el efecto de los fármacos y la conducta normal del sujeto, reproduciendo el efecto en la ingesta de alimento expresado en gramos (Hewitt, *et al.*, 2002).

La continua observación puede ser usada para determinar, si la reducción en la ingesta de comida es causada por náuseas, ataxia, dolor, sedación, hiperactividad o alteración en la palatabilidad de la comida, ya que se sabe hasta el momento, que existen una gran cantidad de drogas que interrumpen, preservan o demoran la SSC. De esta manera, el efecto de una droga se puede observar en el proceso de saciación (Ishii, *et al.*, 2003).

Ejemplo de las consideraciones anteriores es la hipofagia, estado que se caracteriza por la disminución en la ingesta, que muchas veces es causado por un efecto de aversión a la comida producido por inhibición en la

palatabilidad o náuseas; esto se refleja al no producirse una SSC natural (Halford, *et al.*, 1998).

La naturaleza interconectada de la alimentación con el sistema nervioso central (SNC), sugiere que los neurotransmisores y hormonas cerebrales son importantes en el curso natural de la conducta, la regulación de la ingesta alimentaria y el gasto energético.

## **La Serotonina**

La indolalquilamina 5-hidroxitriptamina (5-HT, nombre químico 3-(2-aminoethyl)-1H-indol-5-ol de la serotonina), es un neurotransmisor inicialmente identificado por el interés en sus efectos cardiovasculares. A principios del siglo XX, las plaquetas fueron reconocidas como la fuente de esta sustancia, a finales de la década de los 40's, Rapport y sus colaboradores, aislaron y caracterizaron esta sustancia tónica del suero (serum; de ahí su nombre, serotonina) (Raymond, *et al.*, 1999). Entre las funciones fisiológicas de la serotonina destaca la inhibición de la secreción gástrica, la estimulación de la musculatura lisa y la secreción de [hormonas](#) por parte de la [hipófisis](#) (Carew, *et al.*, 2000).

Mediante trabajos experimentales se determinó la influencia de la serotonina con diferentes funciones desarrolladas en el cerebro como sueño, función cognoscitiva, percepción sensorial, actividad motora, regulación de la temperatura, nocicepción, apetito, conducta sexual y secreción de hormonas (Klink, *et al.*, 2002; Lu y Vetea, 2002), como regulador de la función del músculo liso en los aparatos cardiovascular y digestivo; así como regulador de la función plaquetaria.

Cambios en las concentraciones de serotonina cerebral se asocian con desequilibrios mentales como la esquizofrenia o el autismo infantil, así como trastornos obsesivos-compulsivos (Hedlund y Sutcliffe, 2007), por lo que se ha sugerido que la serotonina se encuentra extensamente implicada en funciones fisiológicas y del comportamiento, incluyendo el control de la

conducta alimentaria, el peso corporal y las preferencias dietarias (Luo, *et al.*, 1990 a, b; Leibowitz y Alexander, 1998; Vickers, *et al.*, 2000).

### **Distribución de las Neuronas Serotoninérgicas en el Hipotálamo**

El balance energético de los animales es controlado por el hipotálamo, mediante su papel en la regulación de la frecuencia y magnitud de la ingesta (Schwartz, *et al.*, 2000; Kim, *et al.*, 2006).

El hipotálamo pertenece al sistema límbico, en la parte baja del tálamo dentro del diencefalo, correspondiéndole del 0.3% al 0.5% del volumen del encéfalo, las estructuras que lo constituyen son responsables de la motivación y manejo de conductas para satisfacer necesidades básicas, por lo que se considera un sistema antiguo trascendental para cubrir los instintos básicos de supervivencia. Ejemplos que incluyen estados como hambre y sed que motivan conductas de ingesta (alimentación) son localizados en esta zona (Roland, 1993; Romanota, *et al.*, 2004).

La parte supraquiasmática del hipotálamo, contiene al núcleo NPV (Figura 1), localizado por encima del tracto óptico, con conexiones extrínsecas aferentes y eferentes por medio de las que responden a los estímulos (Morien, *et al.*, 1995; Pickard, *et al.*, 1997), siendo el principal mediador de la conducta alimentaria, catalogándolo como el centro de saciedad (Leibowitz y Alexander, 1998).

Las conexiones celulares superiores que llegan al NPV provienen principalmente del núcleo del rafe.

La ubicación de células serotoninérgicas; así como la presencia de este neurotransmisor, ha sido confirmada en el NPV por medio de técnicas inmunológicas e histoquímica. Estas poblaciones de neuronas serotoninérgicas lo comunican al NPV con el sistema gástrico, donde reciben información nociceptiva visceral (Dong, *et al.*, 1997; Curie, *et al.*, 2002; Smith, *et al.*, 1999).



Cuadro 1 Conexiones aferentes extrínsecas e intrínsecas del hipotálamo (Afifi y Bergmani, 1998).

Vía	Tipo	Origen	Terminación
Tracto hipotálamohipofisario	Eferente	Núcleo supraóptico y paraventricular	Neurohipófisis
Haz medial del cerebro anterior	Aferente  Eferente	Porción basal del cerebro anterior, amígdala, corteza frontal premotora, formación reticular del tallo cerebral (núcleos del rafe), medula espinal Hipotálamo lateral	Hipotálamo lateral
Fibras autonómicas descendentes	Eferente	Núcleo paraventricular, área hipotalámica lateral, hipotálamo posterior	Núcleos autonómicos de nervios craneales y medula espinal

El sistema nervioso autónomo transmite hacia el cerebro las señales aferentes somatosensoriales, provenientes de la vista, el olfato y la degustación inicial de comida. Estas señales inician la vía cefálica de la digestión, que aumenta la producción de saliva y de ácido gástrico, la motilidad gástrica y la secreción de insulina. Dicha fase cefálica prepara al organismo para recibir el alimento y puede incluir, además, un aumento en la sensación de hambre porque el incremento de la insulina circulante, provoca la caída temporal de la glucosa sanguínea; fenómeno vinculado a la creciente percepción de hambre (Leibowitz y Alexander, 1998; Wurtman y Wurtman, 1998).

A medida que la comida ingresa al estómago, distintos quimiorreceptores y mecanorreceptores de la pared intestinal y sus aferentes nerviosos, revelan información hacia el cerebro y proporcionan las primeras señales de saciedad. El procesamiento gastrointestinal y la finalización de la ingesta pueden ser mediada por hormonas y por los nutrientes circulantes, dada la importancia que tienen para generar señales de saciedad después de la ingesta de comida, como la de hambre en el periodo postabsortivo (Campfield, *et al.*, 1997).

La participación activa de la serotonina ha sido conocida a través de los años, confirmando su influencia al estimular el consumo de carbohidratos, ya que su metabolismo origina el aminoácido precursor de la 5-HT el triptófano.

La acción de la insulina es indirecta; ya que su presencia provoca que los aminoácidos neutros largos (LNAA) sean capturados por el músculo esquelético, reduciendo rápidamente sus niveles circulantes, no así los del triptófano que se ven incrementados, facilitando el transporte de este aminoácido al disminuir la competencia para este aminoácido. La entrada de mayores concentraciones de triptófano, por la barrera hematoencefalica, se traduce en una mayor cantidad de aminoácido convertido en el neurotransmisor, para su posterior liberación (Wurtman y Wurtman 1979 a, b).

## **Biosíntesis de la Serotonina**

La 5-Hidroxitriptamina, es una monoamina del grupo de las indolaminas; es hidrofílica y esto no le permite atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que usa como sustrato el aminoácido triptófano, que se encuentra en plasma. La síntesis se lleva a cabo en las neuronas serotoninérgicas que cuentan con toda la infraestructura enzimática para hacerlo. Una vez en estas células, el triptófano sufre una hidroxilación en su C5 para formar 5-hidroxitriptófano, gracias a la triptófano hidroxilasa (triptófano 5-monooxigenasa). El 5-hidroxitriptófano se descarboxila en una reacción catalizada por la L-aminoácido aromático descarboxilasa (Dihidroxifenilalanina descarboxilasa), formando serotonina (Voet, 1992; Herrera, 1986). Una vez sintetizada, se almacena en vesículas previo a ser llevada al espacio intersináptico. La inactivación sináptica tiene lugar, asimismo, por captación específica o por degradación de la monoamino oxidasa descarboxilasa MAO 5-hidroxiindolacético a 5-hidroxiindolacetaldehído, el cual puede transformarse en 5-hidroxiindolacético, siendo este el producto final en el cerebro (McGilvery, 1998; Mathews y Holde, 2000). Las reacciones de esta biosíntesis se encuentran esquematizadas en la Figura 2.

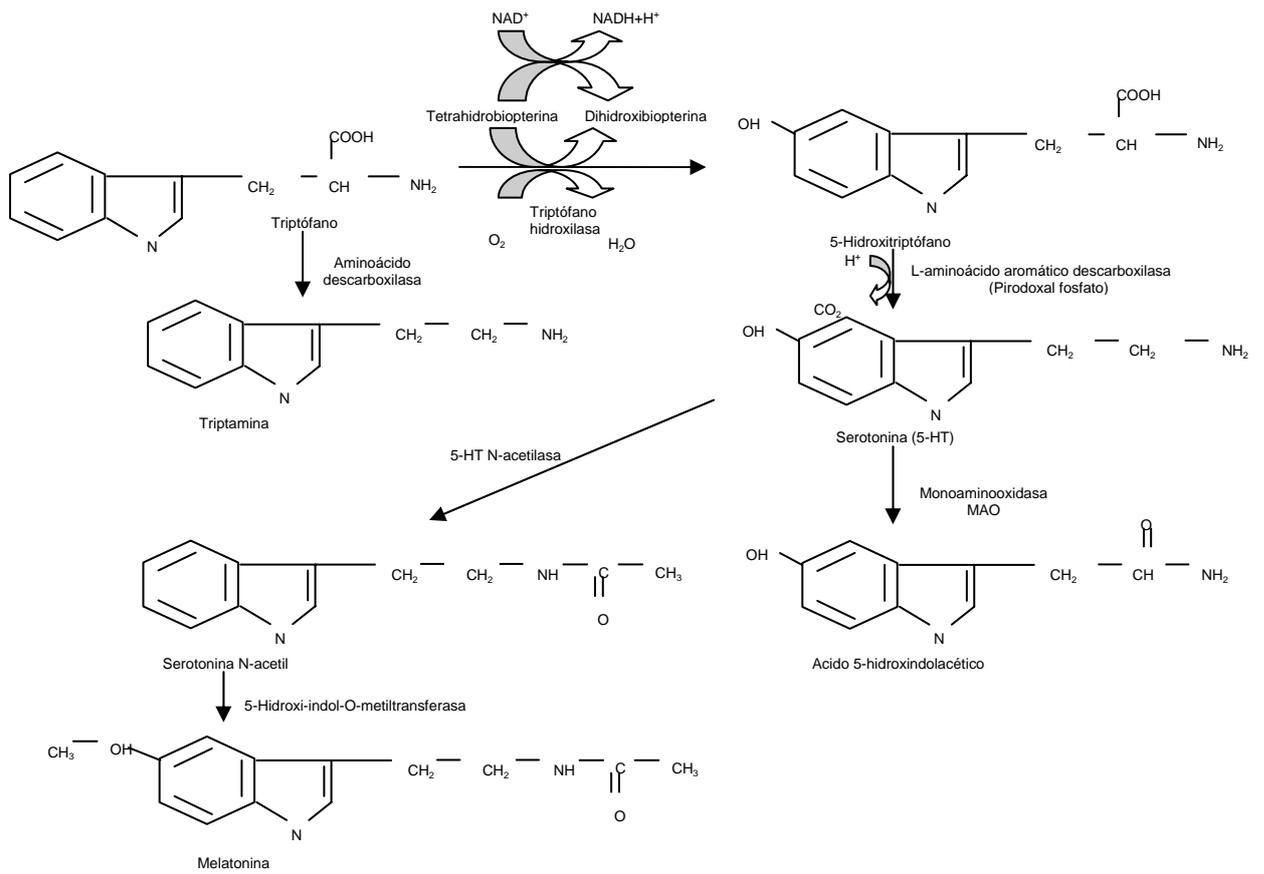


Figura 2. Vías metabólicas para la síntesis y metabolismo de la serotonina modificado de Cooper, *et al.*, 1996 y Alberts, *et al.*, 1994

## Receptores Serotoninérgicos

Los efectos producidos por la serotonina son mediados por sus receptores, que se encuentran en el sistema nervioso central, periférico, en el sistema cardiovascular y la sangre; la diversidad con la que cuentan sus receptores es gracias a la preservación en el sistema (Hoyer, *et al.*, 2002).

La superfamilia de receptores 5-HT la constituyen catorce miembros que han sido clasificados con base a su estructura molecular, ubicación, organización genética, secuencia de aminoácidos y señalización intracelular. Mediante la clonación molecular se ha explicado el porque de esta diversidad de subtipos de receptores, al demostrar que cada receptor es codificado por un gen distinto. Los receptores 5-HT se encuentran divididos en 7 subfamilias (5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>), debido también a la afinidad con la que cuentan respecto al neurotransmisor (Pauwels, 2000). Se pueden dividir en 2 grupos, principalmente ionotrópicos; donde los receptores que se encuentran en la familia 5HT<sub>3</sub> forman un receptor canal y los metabotrópicos, donde se localizan el resto de los receptores. La característica por la cual se denominan metabotrópicos es su asociación a proteínas G (Figura 3), esta asociación les permite modular y tener una amplificación en la señal (Raymond, *et al.*, 1999).

Estos receptores son integralmente proteínas membranales con 7 dominios transmembranales hidrofóbicos, conectados por tres asas intracelulares y tres asas extracelulares. La parte aminoterminal es orientada hacia el espacio extracelular; mientras que la carboxilterminal es orientada hacia el citoplasma. El dominio intracelular posee sitios para la interacción con las proteínas G y otras proteínas reguladoras (Raymond, *et al.*, 2001).

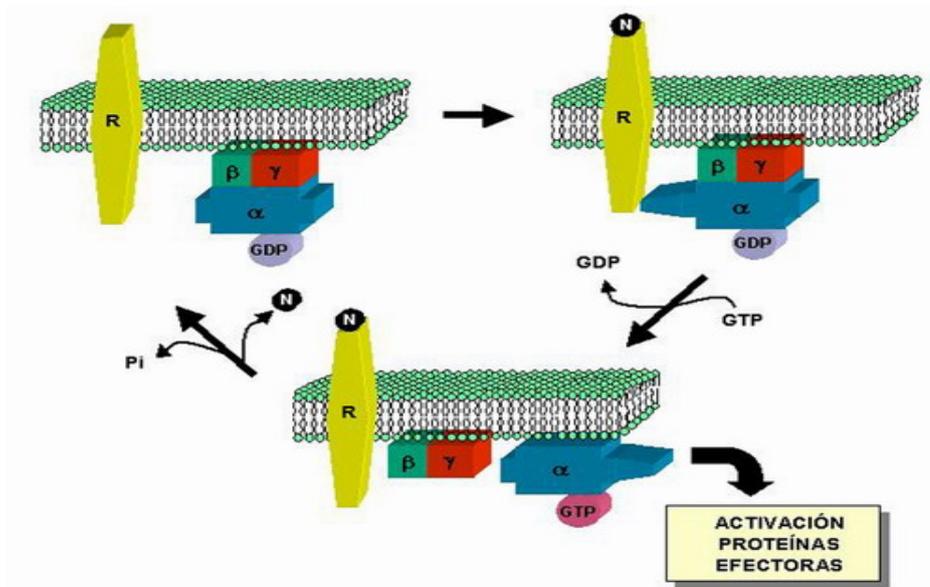


Figura 3. Proceso de interacción de las proteínas G con los receptores hasta las activación de las proteínas efectoras.

### Relación de la Conducta Alimentaria y los Receptores 5-HT

Al hablar de estos receptores, es imposible dejar de lado su participación en la alimentación. Experimentalmente se ha reportado que con distintos fármacos como la fenfluramina —usada en un inicio para el tratamiento contra la depresión por permitir el aumento del neurotransmisor, al inhibir la recaptura—, se ha mostrado su acción en el hipotálamo, teniendo como efecto la disminución de la ingesta de alimento, aumentando la ingesta calórica y estimulando la saciedad por lo que se le considera un droga anorexigénica (Currie, *et al.*, 1998).

También la dexfenfluramina (D-fenfluramina), forma dextro de la fenfluramina; cuya acción es la misma por el efecto agonista hacia los receptores 5-HT<sub>1B/2C</sub>, aunado a su efecto somnífero, reduce la conducta consumatoria de la alimentación y esto le confiere el carácter de la forma más activa en la supresión del apetito (Foltin, 2005).

El agonista Ro 60-0175 cuenta con el mismo efecto hipofágico que la D-fenfluramina; ya que al evaluar su efecto sobre la microestructura de la

conducta alimentaria, se observó una disminución de la ingesta de alimento, por medio de los receptores 5-HT<sub>2C</sub> (Vickers, *et al.*, 2000).

La fluoxetina (Prozac) fue desarrollada para el tratamiento de la depresión y la ansiedad, al bloquear la recaptura de serotonina, pero su efecto ha mostrado una significativa pérdida de peso y disminución en la ingestión de alimento, su uso ha sido sugerido para tratar trastornos alimentarios. Algunos estudios reportan que puede llevar a cambios en el acople de las proteínas G asociadas al receptor 5-HT<sub>1A</sub> a nivel pre y postsináptico (Castro *et al.*, 2003), además de la desensibilización que produce en los autoreceptores 5-HT<sub>1A/1B</sub> con la administración crónica en el núcleo del rafe (Hervás, *et al.*, 2001), la corteza y en el hipotálamo (Newman, *et al.*, 2004).

Los efectos indeseables; así como la poca confianza a largo plazo de su uso han provocado que la FDA (Food and Drugs Administration) no acepte su indicación para la pérdida de peso. La fluoxetina parece ser una droga segura, aceptable para el uso a largo plazo en el manejo de la obesidad, aunque estaría contraindicada en pacientes con síndrome maníaco depresivo.

### **Receptores 5-HT<sub>1A</sub>**

Dentro de la clasificación de los receptores, el primer grupo a considerar es el grupo 5-HT<sub>1</sub>; el cual cuenta con 5 miembros que conforman esta familia de receptores (5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>1B</sub>, 5HT<sub>1D</sub>, 5HT<sub>1E</sub> y 5HT<sub>1F</sub>), excluyendo al 5-HT<sub>1C</sub> en base a su similitud con los receptores 5-HT<sub>2</sub> a nivel estructural y sistema de señalización. En general, es el grupo más específico para esta monoamina y se acopla de forma primaria a través de las proteínas G i/o para la inhibición de la adenilato ciclasa (Hoyer, *et al.*, 2002).

La participación del subtipo 5-HT<sub>1A</sub> en la alimentación, ha sido uno de los receptores más ampliamente estudiado y caracterizado; siendo a nivel anatómico mapeado con ligandos y descrito su localización cromosómica en humanos cDNA; así como sus genes mediante el uso de herramientas farmacológicas (Figura 4).

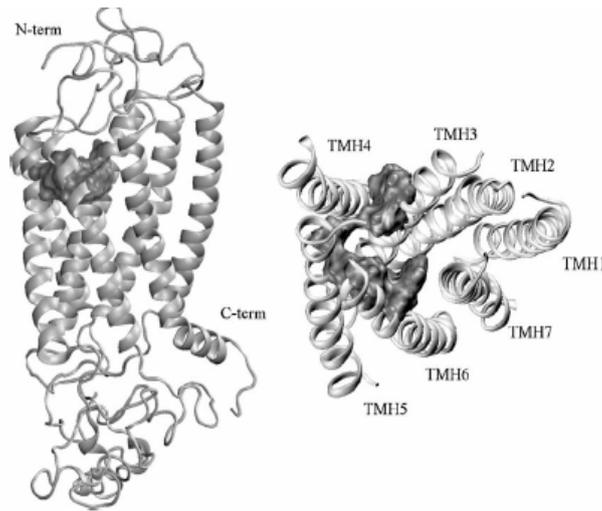


Figura 4. Estructura molecular del receptor 5-HT<sub>1A</sub> tomado de Dabrowska, *et al.*, 2006.

Se considera que el receptor 5-HT<sub>1A</sub> tiene una amplia distribución a través del sistema nervioso central y sobre estructuras del sistema límbico (Barnes y Sharp, 1999). Además se ha revelado una amplia gama de investigaciones que cuenta con actividad en numerosos eventos fisiológicos y conductuales; así como en funciones neuroendocrinas (Bradbury, *et al.*, 2003), en la termorregulación (Wozniak, *et al.*, 1991), en el comportamiento sexual (Maciag, *et al.*, 2006), la memoria (Meneses y Hong, 1995; Meneses y Perez-García, 2007), la función inmune (Stefulj, *et al.*, 2000), la agresividad (Popota, *et al.*, 1998), la ansiedad (Avgustinovich, *et al.*, 2001), el desorden bipolar (López, *et al.*, 2004), la depresión (Hanoun, *et al.*, 2004; Blier, *et al.*, 2003), la ingesta y conducta alimentaria (Raymond, *et al.*, 2001, De Vry, *et al.*, 2000).

Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> son encontrados en la región somatodendrítica de las neuronas que contienen 5-HT, en el núcleo del rafe medial y dorsal. Se considera que estos receptores controlan el disparo celular somatodendrítico a través de sus autoreceptores, por lo que están considerados como moduladores de disparo (Gur, *et al.*, 2001).

La alta incidencia de célula serotoninérgicas permite considerar distintos tipos de receptores, incluyendo una variedad poco común que son los

autoreceptores, la ubicación también varía teniendo presinápticos y postsinápticos.

La señal transmembranal que presenta el receptor 5-HT<sub>1A</sub> es mediada por proteínas G de tipo inhibitorias (abreviatura de las proteínas de unión al guanosin trifosfato), a su vez estas pertenecen al grupo acopladas a G<sub>αz</sub> descritas para los receptores del NPV (Carrasco, *et al.*, 2004; Serres, *et al.*, 2000). La activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> causa la hiperpolarización neuronal, un efecto mediado por estas proteínas G<sub>αz</sub> y los canales de K<sup>+</sup> acoplados (Hoyer, *et al.*, 2002).

La acción de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, en presencia de fenfluramina (inhibidor de la recaptura de serotonina), genera un efecto hiperfágico; en el caso de la dexfenfluramina, el RU24969 y la fluoxetina muestran una inminente anorexia al ser administrados; ya que suprimen la ingesta de alimento, en particular de los carbohidratos al administrarse de forma crónica vía intraperitoneal (Luo, *et al.*, 1990).

Se sabe que algunos agonistas de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> pueden inhibir la conducta alimentaria por medio de un condicionamiento aversivo al sabor (De Vry, *et al.*, 2000).

El receptor 5HT<sub>1A</sub> cuenta con un antagonista selectivo que es la WAY100635 y con un agonista selectivo que es el 8-OH-DPAT ya que actúan de forma total en el receptor, también encontramos que tiene una alta afinidad única por la segunda generación de agentes ansiolíticos arilpiperazina como son: la buspirona, la gepirona y la ipsapirona; entre otros ligandos como el MDL 72832 como agonistas parciales. La D-fenfluramina, un inhibidor de la recaptura de serotonina, genera un efecto hipofágico mediado por los receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Se sabe que largos tratamientos, con fármacos que actúan selectivamente en la recaptura, producen desensibilización de los autoreceptores somatodendríticos 5HT<sub>1A</sub> del rafe (Le Poul, *et al.*, 2000); así como la desensibilización heteróloga del mismo receptor, en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Zhang, *et al.*, 2004).

## 8-OH-DPAT

Es un agonista prototípico al receptor 5-HT<sub>1A</sub> usado ampliamente los últimos 25 años en estudios farmacológicos, induciendo los efectos bioquímicos de la activación del receptor 5HT<sub>1A</sub>, como son el decremento de la síntesis, reorganización y liberación de 5-HT, en diferentes regiones del cerebro de animales.

La actividad que presenta este agonista en los receptores 5HT<sub>1A</sub> es de alta afinidad, por lo que se considera como un agonista total; la constante de disociación con la que cuenta es de KD 3.7  $\pm$  0.28 nM (Assié y Koek, 2000), pKi= 8.4 determinada en el núcleo de rafé y en el hipocampo de rata (Zhang, *et al.*, 2004).

La administración periférica de este agonista produce una reducción en la ingesta en ratas privadas de alimento, cuando se administran dosis altas (i.e. 125-500 $\mu$ g) y dosis bajas (i.e. 15.625-62.5 $\mu$ g). Sin embargo, se presenta una conducta estereotipada que puede interferir en la ingesta normal con la dosis mayor, no así en la menor (Ebenezer, *et al.*, 2001).

La administración del agonista 8-OH-DPAT tiene, en la conducta alimentaria, consecuencias tanto hipofágicas como hiperfágicas, mediadas por la localización del receptor activado; ya sea a nivel presináptico o postsináptico (Coscina, *et al.*, 2000). Es una droga que inhibe la neurotransmisión del sistema serotoninérgico y estimula la ingesta de alimento.

Se sabe, que la acción de este agonista reduce la actividad de las neuronas 5-HT, vía autoreceptores somatodendríticos localizados en el núcleo del rafé, provocando reducción en la síntesis y liberación del neurotransmisor, en la región terminal (Fletcher, *et al.*, 1993). También se conoce que la actividad de los agonistas genera fallas en la liberación de serotonina, provocando una menor cantidad de potenciales de acción en estas células, este efecto cuenta con la participación de autoreceptores en el rafé.

En el caso del 8-OH-DPAT, se inhibe la captura de 5-HT *in vivo* e *in vitro* (Gogos, *et al.*, 2005). La administración directa de este agonista, en el núcleo del rafe, disminuye el disparo celular de 5-HT en esta área y disminuye en el núcleo de acumbens los niveles de 5-HT extracelular.

Como la 5-HT, el 8-OH-DPAT neutraliza el efecto estimulador de la despolarización inducida por  $K^+$  en la síntesis de 5-HT de triptófano en la región cortical (Hamon, *et al.*, 1984).

La afinidad de este fármaco no se reduce a los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, también actúa en los receptores 5-HT<sub>7</sub> aunque con menor afinidad  $pK_i = 7.73$ . (Zhang, *et al.*, 2001)

## JUSTIFICACIÓN E HÍPOTESIS

La variedad de formas para entender la regulación de los mecanismos que se conjugan para dar paso a la conducta alimentaria son diversas, desde la vida cotidiana actual, hasta la regulación metabólica a diferentes niveles.

El estudio de los neurotransmisores es un área del conocimiento que potencialmente contribuye al esclarecimiento del efecto de la 5-HT sobre la conducta alimentaria. La maquinaria serotoninérgica involucrada es una de las más importantes, diversos estudios han demostrado la participación de este neurotransmisor en la conducta alimentaria, mediante el uso de herramientas farmacológicas, inmunológicas y de biología molecular. Se ha observado un efecto hipofágico o hiperfágico al estimular la gran gama de receptores con los que cuenta.

Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> han sido blanco de una gran variedad de estudios, además de la ayuda farmacológica que ha brindado el descubrimiento de un agonista de alta selectividad como es el 8-OH-DPAT; ubicándolo como una de los receptores con mayor participación en la regulación de la alimentación.

Es importante subrayar la complejidad de estos receptores, puesto que la respuesta a los estímulos localizados; ya sea en la región presináptica por medio de sus autoreceptores (núcleo del rafé) o en la región postsináptica, es lo que determina el tipo de acción a seguir por parte del organismo.

La contribución de este estudio será, que si al observar la presencia de mRNA, se determina a su vez la presencia de la proteína codificante para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> en el NPV, se confirma que el efecto conductual reportado, estaría mediado por este subtipo de receptores a nivel postsináptico; posibilitando así, opciones para el tratamiento de los trastornos de la alimentación, usando como modelo los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y su agonista.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar los efectos de la administración subcrónica del 8-OH-DPAT sobre la conducta alimentaria y la expresión génica del receptor 5-HT<sub>1A</sub> del NPV de ratas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- a) Determinar el efecto de la administración subcrónica de 8-OH-DPAT sobre la estructura de la Secuencia de Siedad Conductual.
- b) Determinar la concentración de RNA presente en las muestras del núcleo paraventricular hipotalámico.
- c) Identificar la presencia del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, por medio de la amplificación de su cDNA.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Sujetos

Se utilizaron 62 ratas machos de la cepa Wistar, cuyo peso osciló entre los 200 a 230 g, los cuales fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. El trato de los animales fue bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-1999.

### Dietas

Las dietas utilizadas constaron de: hidratos de carbono (harina de maíz Maseca, maíz nixtamalizado, Molinos Azteca de Chalco S.A. de C.V., Planta Teotihuacan), proteínas (proteína aislada de soya 91.5% marca supro 500E, distribuido por Protein Technologies Internacional S.A de C.V. Checkerboard Square, St Louis MO), grasas (manteca vegetal Inca, elaborada por Anderson Clayton y Co. S.A. de C.V., Tultitlán, Estado de México). El agua fue enriquecida con Vitater suplemento vitamínico (Laboratorios Maver), la dosis aplicada fue de 0.15 g /lt.

### Fármaco

El fármaco usado fue ( $\pm$ )-8-Hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin, ( $\pm$ )-8-OH-DPAT. Formula molecular  $C_{16}H_{25}NO$  HBr, agonista selectivo del receptor 5HT<sub>1A</sub>, adquirido con Sigma Chemical Co. St Louis MO. Diluido en solución salina fisiológica, se infundió a una velocidad de 0.5  $\mu$ l/ 3 min. en el NPV. Para asegurar una difusión completa de las sustancias, el microinyector permaneció un minuto adicional dentro de la cánula guía para ser retirado posteriormente. La administración del fármaco fue por medio de una jeringa digital para fluidos de alta precisión (Hamilton Co., Reno, NV.).

Las concentraciones del fármaco fueron basadas en Currie, *et al.*, (1993) para contar con una nueva propuesta de curva dosis respuesta (Tabla 1).

Concentraciones de la Curva Patrón	
G1	0.328 $\mu$ g
G2	0.525 $\mu$ g
G3	2.1 $\mu$ g
G4	4.2 $\mu$ g

Tabla 1 Concentraciones usadas en la curva dosis respuesta (Currie, *et al.*, 1993)

Se contó también con tres grupos controles para descartar efectos de la cirugía en la ingesta de alimento.

### **Procedimiento Experimental**

Se colocaron a las unidades experimentales (n= 46) de manera aleatoria en cajas habitación individuales, con tres comederos y en un ciclo invertido luz / oscuridad de 12x12 hr. que fue controlado por un dispositivo de encendido y apagado automático (timer), con libre acceso a comida y agua. Los animales se pesaron una hora antes de iniciar el ciclo de oscuridad (8:00 hrs.). El acceso de los sujetos a una dieta de fuentes separadas para proteínas carbohidratos y grasas fue un factor determinante para conocer la preferencia dietaría. Cada nutrimento se cambio de lugar de acuerdo a un orden preestablecido para evitar “preferencia de lugar”. Una semana fue el lapso de tiempo bajo estas condiciones.

### **Selección de los Sujetos Experimentales**

En el periodo de adaptación, se peso la ingesta de nutrientes; así como a los animales cada 24 hrs por 3 días, para verificar que la ingesta de alimento y crecimiento de animales fueran adecuados; así como la adaptación a la dieta experimental. Los animales que consumieron menos del 15% o más del 50% del total de su dieta, fueron excluidos del estudio, ya que esto no asegura la adaptación de los animales a las condiciones experimentales.

### **Cirugía**

Después del periodo de ambientación y selección de los sujetos experimentales, las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral (1.5 mg/kg, i.p.) y fijadas a un aparato estereotáxico, con la finalidad de implantar una cánula (1.5 cm. de longitud) 2 mm por arriba del NPV del lado derecho, las coordenadas fueron corregidas previamente por ensayo y error en un grupo de ratas que no fueron consideradas para el análisis de resultados. Se consideraron las coordenadas sugeridas en el Atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1986): Posterior a bregma -1.40; lateral a la línea media 0.3 y de profundidad a partir de la dura madre -7.7. Con el objetivo de fijar al cráneo la cánula, se colocó un tornillo y acrílico dental. Finalmente se aplicaron 300,000 U/kg v.i.m. de penicilina benzatílica para la

prevenir infecciones. Posteriormente se permitieron cuatro días de recuperación post- quirúrgica, antes de iniciar las observaciones.

## **Diseño Experimental**

### **Grupos experimentales**

Bajo el procedimiento experimental ya descrito, los animales fueron asignados a los grupos siguientes: Grupo 1, Dosis 0.328 ug (n=8), grupo 2, dosis 0.525 ug (n=8), grupo 3, dosis 2.1ug (n=8) y grupo 4, dosis 4.2 ug (n=8); las dosis antes mencionadas corresponden al agonista 8-OH-DPAT. Después de la inyección, las ratas fueron colocadas en cajas habitación con acceso libre a alimento y agua. Los animales fueron filmados a través de una cámara de circuito cerrado para bajas intensidades de luz, para cuantificar el tiempo de duración para cada categoría de la Secuencia de Sociedad Conductual, todo se realizó desde un cuarto contiguo para no interferir con la conducta de los sujetos experimentales. Se realizaron registros de duración continua por 60 min. el primer y el tercer día de la administración, al finalizar, se pesaron los comederos (recolectando con cuidado lo que cayó fuera).

### **Histología y Preservación de tejido**

Los animales se sacrificaron, para la posterior remoción del cerebro en hielo, la corteza frontal y el cerebelo se diseccionaron y se realizaron cortes histológicos de 500  $\mu\text{m}$  hasta llegar al NPV, el criterio para obtener este tejido dependió de la posición en la que se encontrara la cánula implantada; ya que la correcta posición de ésta en el NPV, aseguro la difusión del fármaco. Esta muestra se congeló en nitrógeno líquido para conservar el tejido a  $-70^{\circ}\text{C}$  mientras se hiciera la extracción de RNA.

### **Extracción de RNA**

El tejido diseccionado fue utilizado para la extracción de RNA, con el kit comercial High Pure RNA Tissue kit (Roche, Penzberg), con el cual se obtuvo RNA genómico de alta pureza. Este kit incluye un buffer de lisis (Lysis Binding Buffer) que permitió romper la membrana celular y el contenido. El RNA fue aislado por medio de una unión a fibras de vidrio contenidas en los tubos filtros del kit. El DNA residual fue digerido con

Dnasa 1, eliminando la posibilidad de falsos positivos; pues la secuencia de DNA cuenta con similitud en los nucleótidos que conforman la estructura. Por medio de lavados posteriores se eliminaron de sales, proteínas y otras impurezas de la muestra. Al finalizar se midió la concentración de RNA en un espectrofotómetro.

### **Trascricción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)**

A partir del RNA puro, obtenido del tejido, se realizó la técnica de RT-PCR, usando el procedimiento de Kulikov *et al.*, (2005) con el kit Access RT-PCR System, Promega (Wi, USA); el cual consiste en dos reacciones. Primero, la trascricción reversa en la que se usa el RNA como molde para formar cDNA, se desnaturalizó a 94 °C por 5 min durante 1 ciclo y un alineado a 41 °C por 15 min durante 1 ciclo. La segunda reacción consiste en la copia del cDNA a mayor escala a partir de la primera copia entre los reactivos; cuenta con una solución madre la cual contiene los primers, buffers *Taq* polimeraza, encargada de aparear los nucleótidos complementarios al segmento de cDNA. Una vez lista la solución se añade el RNA extraído y se colocan las muestras en un termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400) para continuar con el PCR, a partir de las siguientes condiciones 5 minutos a 94 °C durante 1 ciclo, 40s a 94 °C durante 1 ciclo, 40s a 64 °C para alinear, 40 s a 72 °C durante 20-32 ciclos, terminando con 4 minutos a 72 °C. (Anexo 2)

### **Primers**

Se utilizó la secuencia para el receptor 5 HT<sub>1A</sub> (SIGMA, genosys, TX,USA)

Forward 5´ -ccccccaagaagagcctgaa- 3´

Reverse 5´ ggcagccagcagaggatgaa- 3´

### **Electroforesis**

Las muestras se congelaron para realizar posteriormente la amplificación del segmento de 336pb que corresponde al receptor 5-HT<sub>1A</sub>, mediante un gel de agarosa al 2% (Sigma Genosys, TX, USA) Anexo 3, en solución amortiguadora Tris Borato EDTA (TBE), a una concentración de 0.89 M:

0.89 M: 0.025 M respectivamente, ajustando su pH a 8.2 u 8.3. En caso de ser necesario, la concentración final fue de 0.5 X y se agregaron 5 µl de bromuro de etidio. El gel líquido (50 °C) sobre el molde y se colocaron dos peines con 20 carriles y el segundo, con 15 carriles para formar los pozos donde las muestras fueron depositadas, dejando solidificar por 10 minutos a temperatura ambiente y 10 min. más en el refrigerador. Se montó dentro una cámara submarina ya solidificado, con amortiguados TBE 0.5X en cantidad suficiente para cubrir el gel 5 mm sobre la superficie (Anexo 3).

A las muestras de cDNA y a los marcadores moleculares Promega (Wi, USA), se les agregó colorante (Sigma, Tx, USA) al ponerlos dentro de los pozos. La cámara submarina se conectó a la fuente de poder aplicando 45 voltios, la carga de corriente eléctrica se detuvo hasta que la marca del colorante alcanzó un 75% del gel. Los gels se revelaron con una cámara de luz ultravioleta (Cole-Parmer, III, USA). El registro fotográfico se realizó con una cámara Polaroid MP4, se utilizó un filtro anaranjado Wratten 23 A y un filtro Wratten 2 UV, y película instantánea Polaroid 665. La exposición con apertura del lente a 4.5 f. fue de 30 seg.

### **Parámetros conductuales**

Para realizar el análisis de la SSC, los 60 minutos de registro continuo, posteriores a la inyección del fármaco y el vehículo, fueron divididos en 12 segmentos de 5 minutos cada uno (Figura 5), y se analizaron considerando las siguientes categorías conductuales: beber, definida como el tiempo en segundos que el animal dedica a tomar agua; alimentarse, definida como el tiempo en segundos que dedican las ratas para alimentarse; descansar, tiempo en segundos en el que las ratas permanecen inactivas, con la cabeza sobre el piso y actividad, tiempo en segundos que dedican para desplazarse, rascarse, levantarse sobre las patas traseras etc. dentro de la caja-habitación.

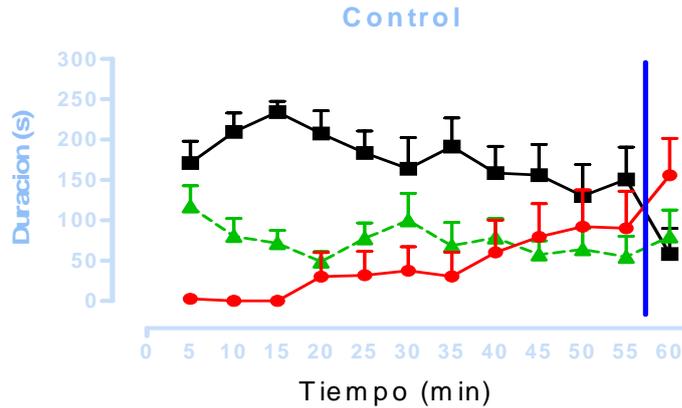


Figura 5 Muestra de la secuencia de saciedad conductual cada periodo corresponde a 5 minutos del tiempo grabado post inyección.

Además de los parámetros de la SSC, se calculó la cantidad de alimento ingerido por las ratas para cada uno de los nutrientes, ingesta de proteínas, de carbohidratos, de grasas y el total ingerido, en gramos (g).

### **Análisis de datos**

El análisis estadístico para determinar diferencias entre los grupos, fue un análisis de varianza de una entrada (ANOVA); comparando la ingestión (g) de proteínas, carbohidratos y grasas de manera separada. Los datos están expresados en medias  $\pm$  desviación estándar.

La tasa local de alimentación (g/s) y el área bajo la curva de los parámetros de la secuencia de saciedad conductual (ingesta, descanso y actividad), fueron analizadas por medio de un ANOVA de una entrada. Para las comparaciones por pares se utilizó la prueba de Tukey.

Las concentraciones de RNA obtenidas mediante espectrofotometría en  $\mu\text{g}$  se analizaron por medio de un ANOVA de una entrada.

Por último, los fragmentos de RNA amplificados por RT-PCR, se analizaron en 3 geles de agarosa, al observar la presencia o ausencia del segmento para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> con un peso molecular de 336 pb, comparándolos con el marcador molecular de 1, 605 pb que cuenta con 2 marcas de 350 pb y 222 pb, entre las que se evaluó la presencia del receptor 5-HT<sub>1A</sub>.

## RESULTADOS

El siguiente apartado muestra los resultados obtenidos de la ingesta de alimento (g) de los grupos control, la concentración de RNA extraído, la secuencia de saciedad conductual, el área bajo la curva de la ingesta, la Tasa local de alimentación y la electroforesis realizada al cDNA del receptor.

### Ingesta Grupos Control y Experimentales

El análisis de los datos sobre la ingesta de alimento (proteínas, carbohidratos y grasas) de los grupos controles, no mostró efectos estadísticamente significativos. Lo anterior permitió el uso del grupo control con vehículo (Vh) para nuestro siguiente análisis de la ingesta vs los grupos experimentales. En este análisis no se observan diferencias significativas (Figuras 6 y 7).

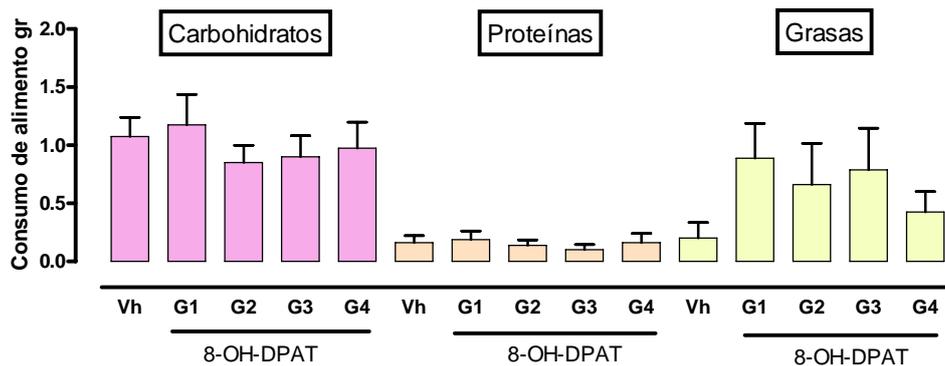


Figura 6 Efecto de la inyección de Vh y las diferentes [ ] de 8-OH-DPAT [G1 (0.328  $\mu$ g), G2 (0.525  $\mu$ g), G3 (2.1  $\mu$ g), G4 (4.2  $\mu$ g)] en la ingesta de carbohidratos, proteínas y grasas, en el primer día de tratamiento. Datos expresados en Medias  $\pm$  ESM.

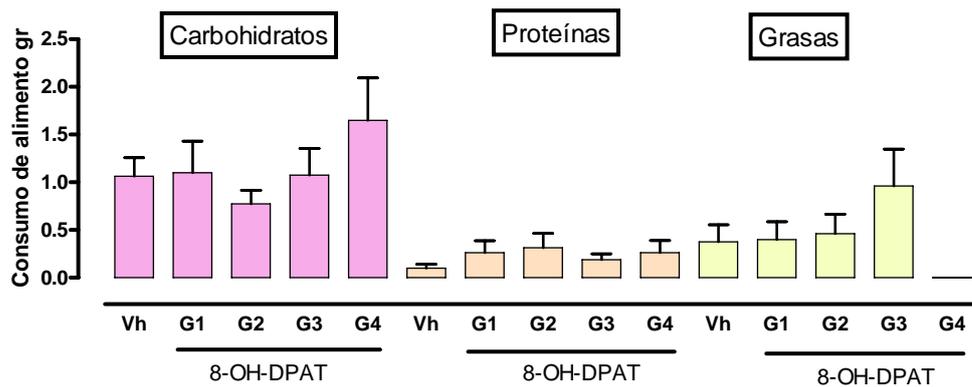


Figura 7 Efecto de la inyección de Vh y las diferentes [ ] de 8-OH-DPAT [G1 (0.328  $\mu$ g), G2 (0.525  $\mu$ g), G3 (2.1  $\mu$ g), G4 (4.2  $\mu$ g)] en la ingesta de carbohidratos, proteínas y grasas, en el tercer día de tratamiento. Datos expresados en Medias  $\pm$  ESM.

### Secuencia de Sociedad Conductual (SSC)

Los resultados que se presentan a continuación son descritos para la SSC, el primer día de tratamiento.

El análisis de la figura 8 (grupo control con vehículo), presenta el desarrollo de manera ordenada de los eventos que integran este patrón conductual, dado que el tiempo dedicado a comer fue prioritario, seguido por la conducta de actividad, desarrollando posteriormente el aumento paulatino de la conducta de descanso. La transición entre la conducta de alimentarse y la conducta de descansar (línea vertical) fue observada a los 40 minutos de la inyección del Vh (Figura 8).

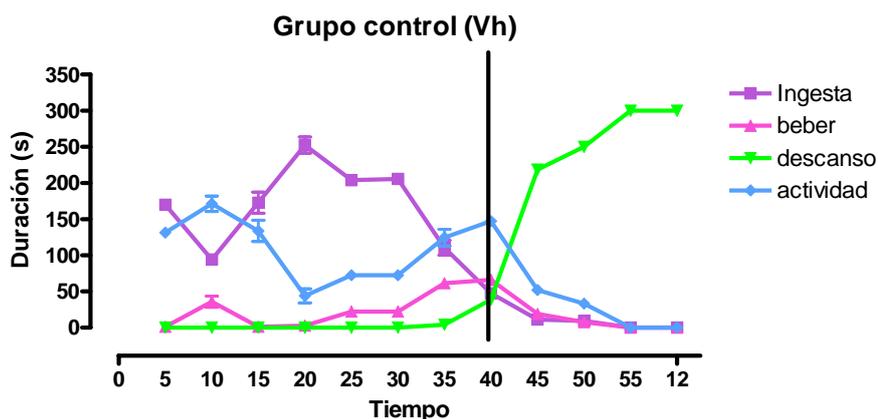


Figura 8 Efecto de la inyección intrahipotalámica de vehículo (Vh) sobre la SSC en el día 1. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La línea vertical indica el momento donde ocurre la transición entre las conductas de alimentarse y descansar.

En el grupo experimental G1 (0.328  $\mu$ g) presentó la interrupción de la SSC entre el periodo 8-9, observándose un ligero retraso al compararlo con el

grupo control (Figura 9), predomino en este caso la actividad de los sujetos desplazando a la ingesta y el descanso.

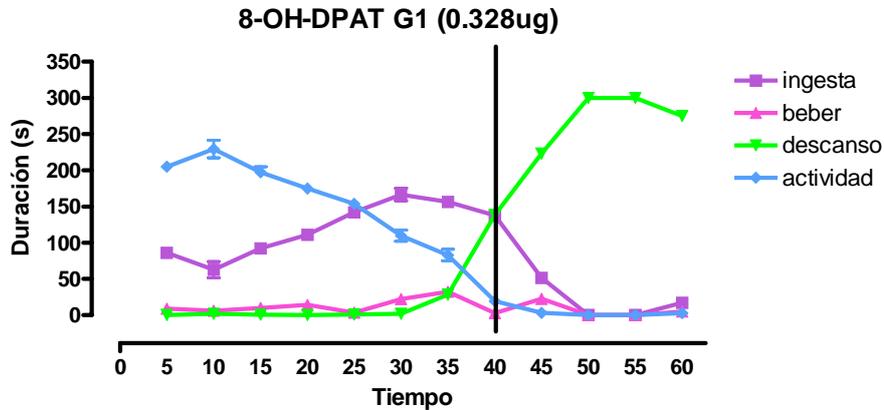


Figura 9 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT G1 (0.328 $\mu$ g) sobre la SSC en el día 1. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La línea vertical indica el momento donde ocurre la transición entre las conductas de alimentarse y descansar.

Para el grupo experimental G2 (0.525  $\mu$ g), la interrupción de la SSC, se presentó a los 30 minutos después de la inyección del agonista, mostrando una aparición temprana en contraste con el grupo control con vehículo (Figura 10).

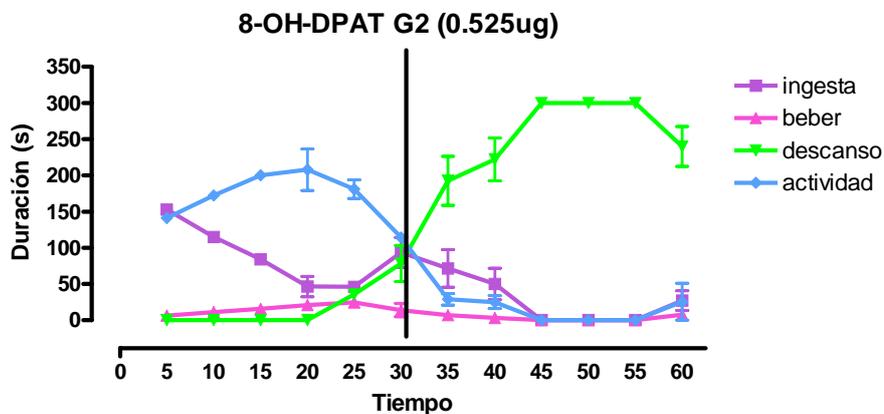


Figura 10 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT G2 (0.525 $\mu$ g) sobre la SSC en el día 1. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La línea vertical indica el momento donde ocurre la transición entre las conductas de alimentarse y descansar.

La aparición de la interrupción de la SSC, en el caso del grupo experimental G3 (2.1 $\mu$ g), se expresó a los 35 minutos de administrado el fármaco (Figura 11). Observándose un adelanto en su aparición al ser contrastada con la que presento el grupo control.

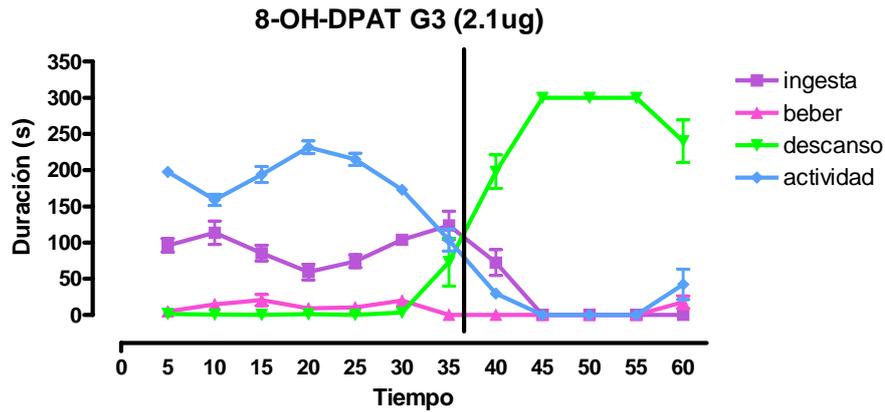


Figura 11 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT G3 (2.1 $\mu$ g) sobre la SSC en el día 1. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La línea vertical indica el momento donde ocurre la transición entre las conductas de alimentarse y descansar.

La dosis de 4.2  $\mu$ g de 8-OH-DPAT perteneciente al grupo experimental 4 (Figura 12), presenta la misma interrupción de los eventos estereotipados de la SSC en el minuto 55; mostrando una demora en su aparición, en comparación con el grupo control. Cabe destacar en esta dosis que la interrupción se debió principalmente al aumento de las conductas agrupadas en actividad.

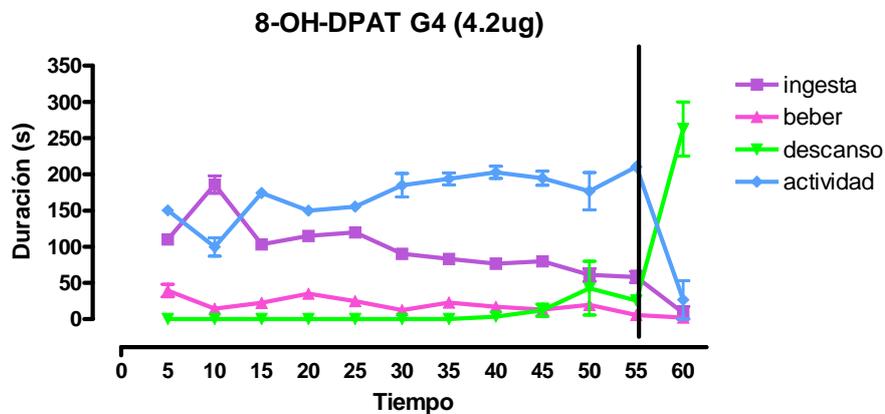


Figura 12 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT G4 (4.2  $\mu$ g) sobre la SSC en el día 1. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La línea vertical indica el momento donde ocurre la transición entre las conductas de alimentarse y descansar.

El tercer día se realizó la misma evaluación conductual de los eventos estereotipados para la secuencia de saciedad conductual. El grupo control presento una vez más, el desarrollo de las actividades de forma normal acorde con los parámetros preestablecidos alcanzando la saciedad, 30 minutos después de la inyección del agonista (Figura 13).

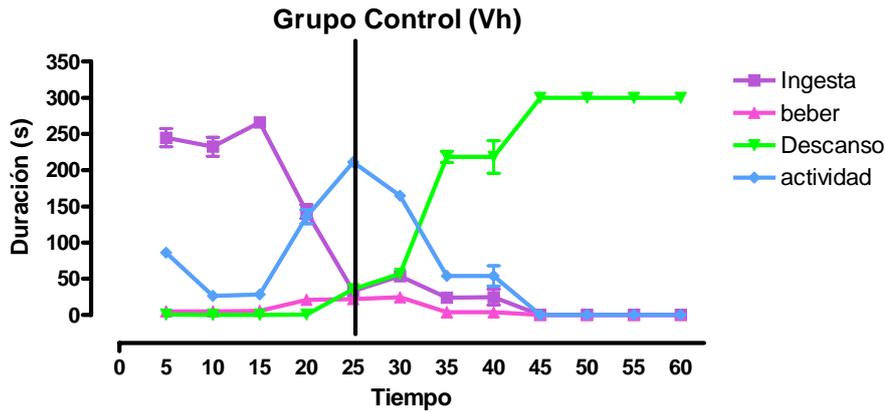


Figura 13 Efecto de la inyección intrahipotalámica de vehículo (Vh) sobre la SSC en el día 3. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La línea vertical indica el momento donde ocurre la transición entre las conductas de alimentarse y descansar.

En el tercer día, el grupo G1 (0.328  $\mu$ g), la SSC se presentó entre el minuto 35 y 40 (Figura 14). Observándose, también una ligera demora en comparación con el grupo control. Sin embargo, debe señalarse que al igual que el primer día de experimentación, se observó la interrupción de la SSC por el aumento de la conducta de actividad.

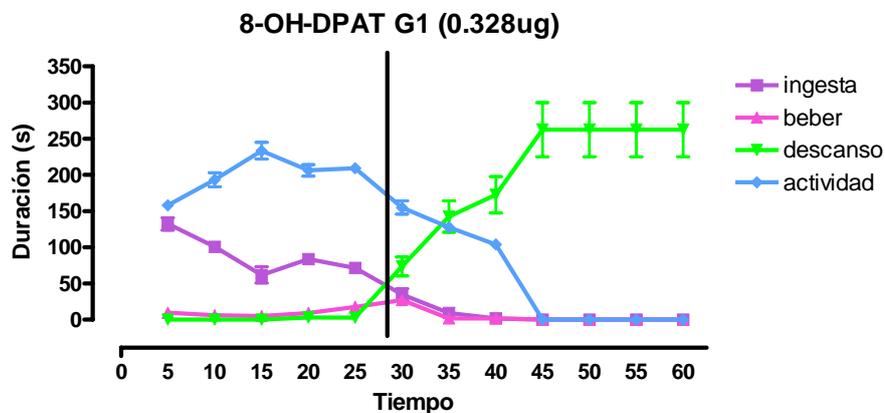


Figura 14 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT G1 (0.328 $\mu$ g) sobre la SSC en el día 3. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La línea vertical indica el momento donde ocurre la transición entre las conductas de alimentarse y descansar.

El efecto de la dosis 0.525  $\mu$ g G2 (Figura 15), sobre la SSC fue similar a la del grupo control. Sin embargo, también se observó que tanto en el día 1 como en el 3, el desarrollo natural de la SSC fue interrumpido principalmente por el aumento de la conducta de actividad.

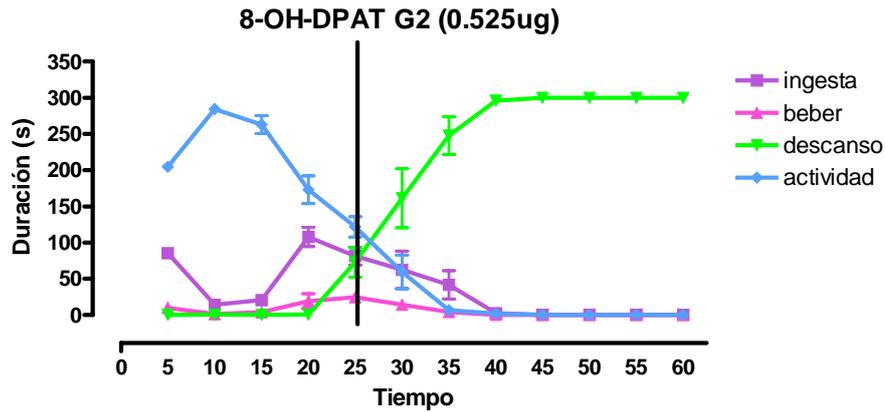


Figura 15 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT G2 (0.525 $\mu$ g) sobre la SSC en el día 3. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La línea vertical indica el momento donde ocurre la transición entre las conductas de alimentarse y descansar.

La SSC observada con el G3 (2.1  $\mu$ g), muestra que el efecto del agonista, produce interrupción de la secuencia entre los minutos 35 y 40, por medio del incremento en la conducta de actividad, similar a lo ocurrido en el primer día con esta misma dosis. También debe señalarse que para ambos días (1 y 3), el desarrollo natural de la SSC no se llevo a cabo por el aumento de la conducta de actividad (Figura 16).

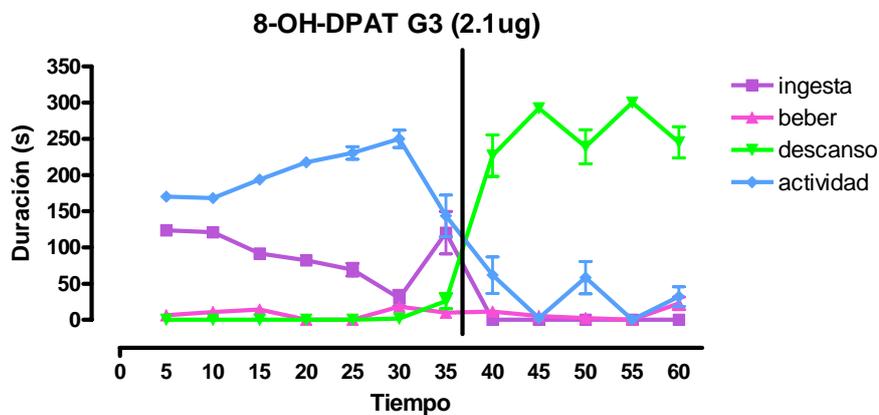


Figura 16 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT G3 (2.1 $\mu$ g) sobre la SSC en el día 3. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La línea vertical indica el momento donde ocurre la transición entre las conductas de alimentarse y descansar.

La SSC para el G4 (4.2  $\mu$ g, Figura 17), presentó la interrupción de los eventos estereotipados, entre los minutos 50 y 55. Observándose una demora en su expresión, al compararla con el grupo control. La transición entre la ingesta y la conducta de descansar se altero por el gran incremento de las conductas de actividad.

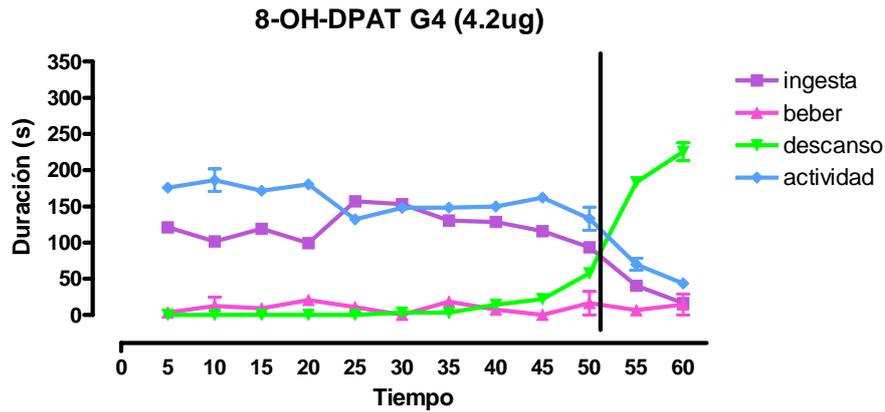


Figura 17 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT G4 (4.2  $\mu$ g) sobre la SSC en el día 3. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La línea vertical indica el momento donde ocurre la transición entre las conductas de alimentarse y descansar.

## Área Bajo la Curva (ABC)

### Ingesta

El análisis del área bajo la curva sobre la ingesta de alimento, determinado a partir de la secuencia de saciedad (tiempo [seg.] dedicado comer), mostró diferencias significativas entre el grupo control con vehículo y los grupos experimentales [ $F_{(4, 35)} = 54.1$   $p < 0.0001$ ]. En la comparación por pares, se observó que los grupos experimentales G1, G2, G3, G4 cuentan con una disminución significativa en el tiempo dedicado a la ingesta, en comparación con el grupo control. Los grupos G2 y G3, muestran una disminución marcada en comparación a los grupos G3 y G4. El grupo experimental G2 muestra una marcada disminución del tiempo invertido en esta actividad (Figura 18).

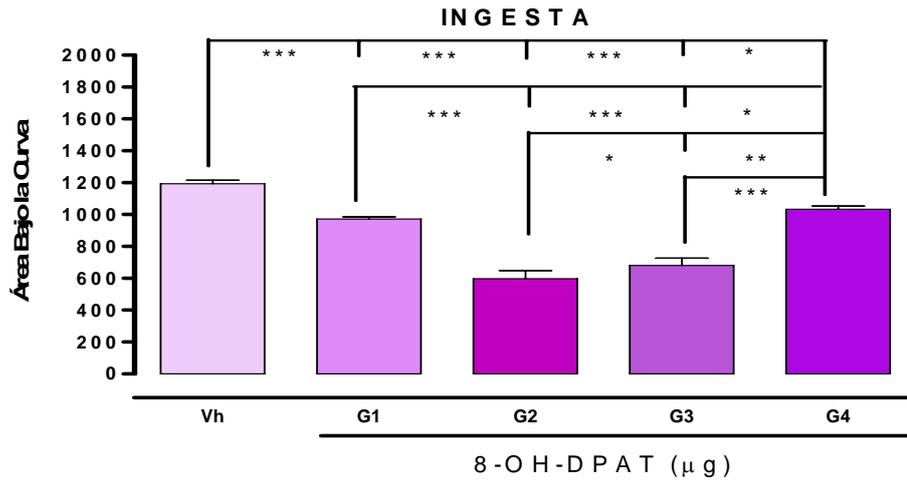


Figura 18 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT [G1 (0.328 µg), G2 (0.525 µg), G3 (2.1 µg), G4 (4.2 µg)] sobre la inversión de tiempo de ingesta en el día 1. Los datos son expresados en Medias ± ESM. La significancia de las diferencias entre grupos fue determinada por la prueba post hoc de Tukey. \*\*\* p< 0.0001, \*\*p<0.001, \* p<0.05.

En el tercer día se observaron también diferencias significativas entre los grupos [F (4, 35)= 96.92 p< 0.0001], en la comparación por pares se observó una disminución significativa del tiempo dedicado a la ingesta por parte de los grupos G1, G2 y G3; mientras que el G4 mostró un aumento en el tiempo dedicado a esta actividad, comparado con el grupo control (Figura 19).

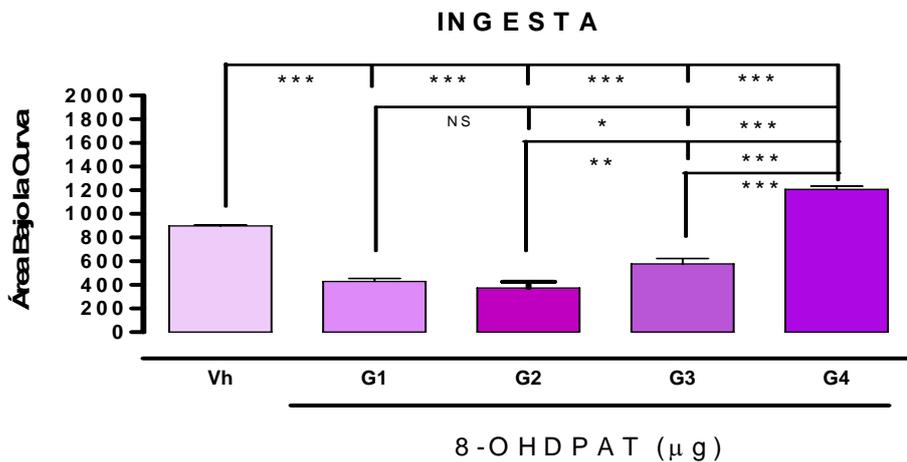


Figura 19 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT [G1 (0.328 µg), G2 (0.525 µg), G3 (2.1 µg), G4 (4.2 µg)] sobre la inversión de tiempo de ingesta en el día 3. Los datos son expresados en Medias ± ESM. La significancia de las diferencias entre grupos fue determinada por la prueba post hoc de Tukey. \*\*\*p< 0.0001, \*\*p<0.001, \*p<0.05.

## Descanso

En el análisis del área bajo la curva para el descanso (tiempo [seg.] dedicado a descansar), se observaron significativas entre los grupos [ $F_{(4, 35)} = 254.1$   $p < 0.0001$ ]. La comparación por pares determinó diferencias significativas del grupo control vs los grupos G1 y G3, mientras que el G4 muestra una disminución considerable en el tiempo para descanso, el primer día de tratamiento (Figura 20).

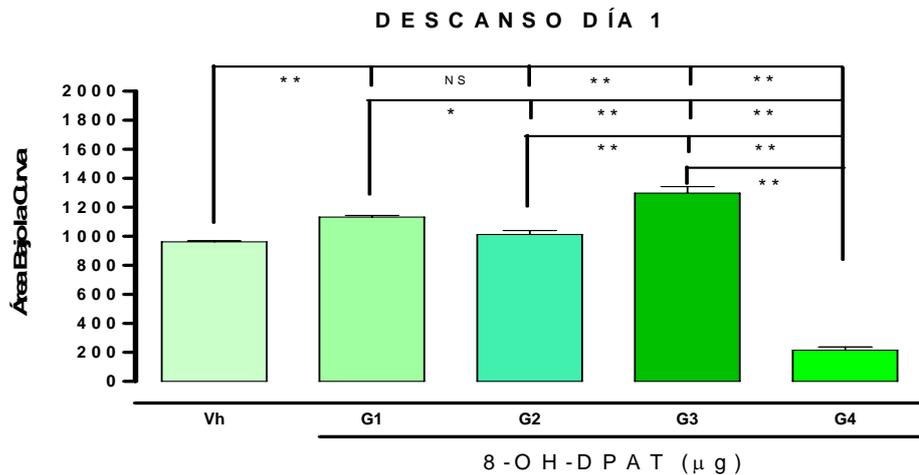


Figura 20 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT [G1 (0.328  $\mu$ g), G2 (0.525  $\mu$ g), G3 (2.1  $\mu$ g), G4 (4.2  $\mu$ g)] sobre la inversión de tiempo de descanso en el día 1. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La significancia de las diferencias entre grupos fue determinada por la prueba post hoc de Tukey. \*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$ .

En el tercer día también se observaron diferencias entre los grupos [ $F_{(4, 35)} = 33.05$   $p < 0.0001$ ], Los grupos experimentales, al ser comparados con el control, presentaron un aumento en el tiempo dedicado al descanso, la excepción fue el G4 que disminuyó de forma significativa, el tiempo invertido en la actividad antes mencionada (Figura 21).

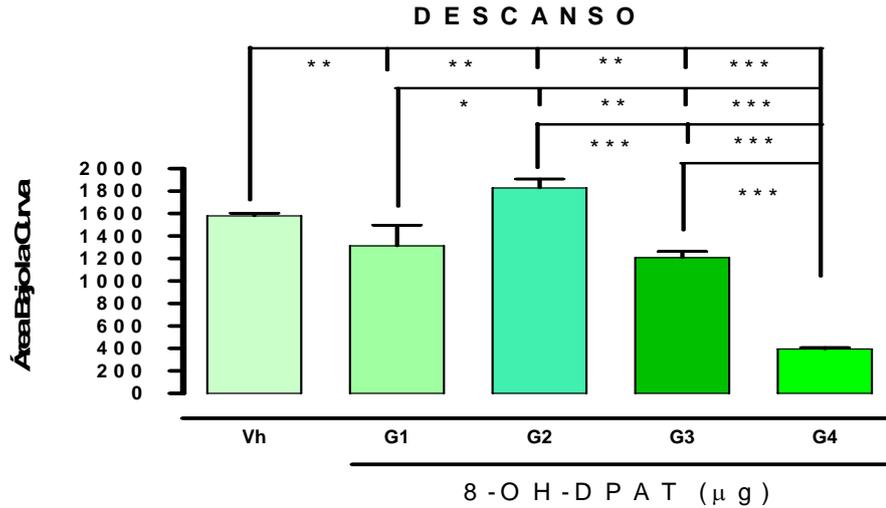


Figura 21 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT [G1 (0.328 µg), G2 (0.525 µg), G3 (2.1 µg), G4 (4.2 µg)] sobre la inversión de tiempo de descanso en el día 3. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La significancia de las diferencias entre grupos fue determinada por la prueba post hoc de Tukey. \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ .

### Actividad

Por otro lado, en la conducta de actividad del primer día se observaron diferencias significativas entre los grupos [F (4, 35)= 171.2  $p < 0.0001$ ]. La comparación entre el grupo control y los grupos experimentales determino que con el G1, G3 y G4 aumenta el tiempo de la conducta de actividad (Figura 22).

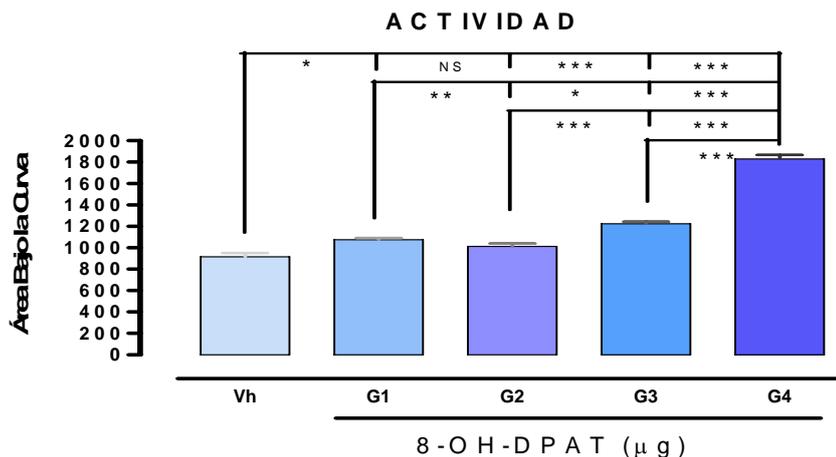


Figura 22 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT [G1 (0.328 µg), G2 (0.525 µg), G3 (2.1 µg), G4 (4.2 µg)] sobre la inversión de tiempo de actividad en el día 1. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La significancia de las diferencias entre grupos fue determinada por la prueba post hoc de Tukey. \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ .

En el tercer día, también se observaron diferencias significativas entre los grupos [F (4, 35)= 53.64 p< 0.0001], En la comparación por pares, la diferencia fue entre el grupo control vs los grupos experimentales; los cuales mostraron un aumento en el tiempo dedicado a la conducta de actividad (Figura 23).

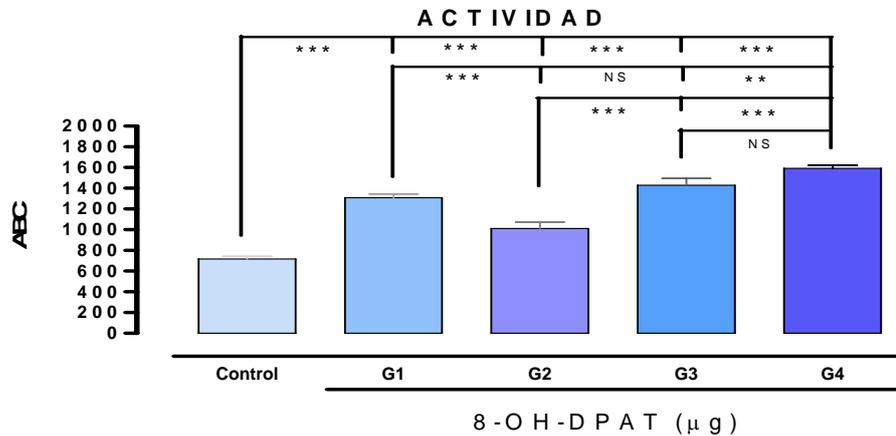


Figura 23 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT [G1 (0.328 μg), G2 (0.525 μg), G3 (2.1 μg), G4 (4.2 μg)] sobre la inversión de tiempo de actividad en el día 3. Los datos son expresados en Medias ± ESM. La significancia de las diferencias entre grupos fue determinada por la prueba post hoc de Tukey. \*\*\*p< 0.0001, \*\*p<0.001, \* p<0.05.

### Tasa local de alimentación

El análisis sobre la cantidad de alimento consumido por unidad de tiempo (g/s) del primer día, a los 60 min, no reveló diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo si se observa que el G2 (0.525) tiende a desarrollar un incremento en el tiempo en el cual consume la misma cantidad de alimento que el grupo control (Figura 24).

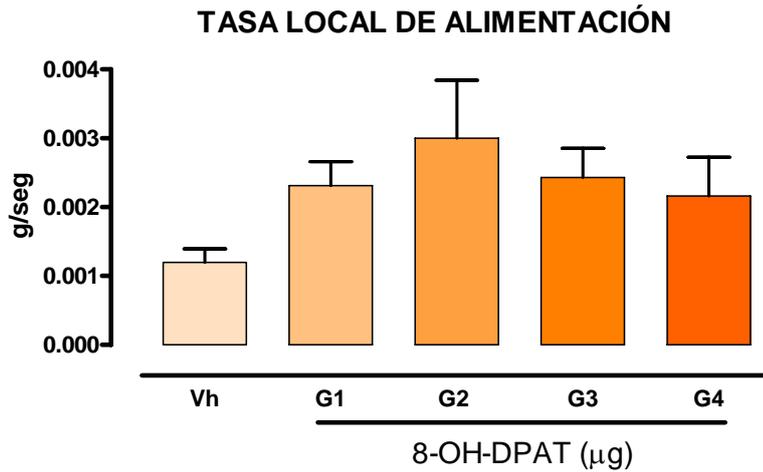


Figura 24 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT [G1 (0.328 µg), G2 (0.525 µg), G3 (2.1 µg), G4 (4.2 µg)] sobre la tasa local de alimentación a los 60 min en el día 1. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM.

El tercer día de tratamiento, el grupo G2 mostró diferencias significativas, al ser comparado con el grupo control, incrementando la tasa local de alimentación. El G3 por otra parte muestra una diferencia marginal al mismo incremento. (Figura 25)

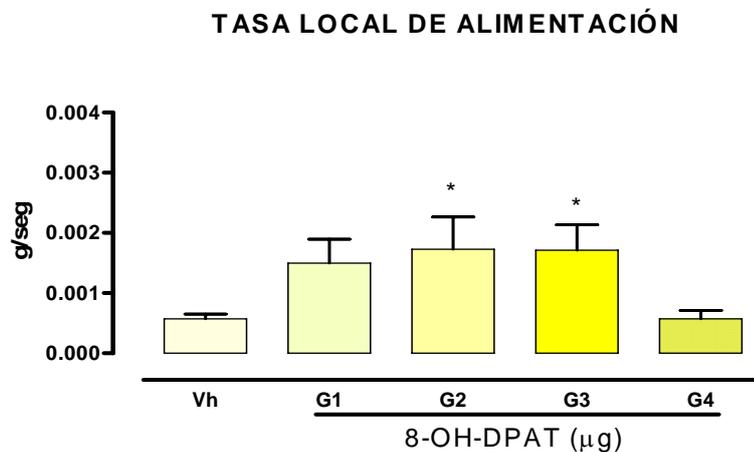


Figura 25 Efecto de la inyección intrahipotalámica del 8-OH-DPAT [G1 (0.328 µg), G2 (0.525 µg), G3 (2.1 µg), G4 (4.2 µg)] sobre la tasa local de alimentación a los 60 min en el día 3. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM. La significancia de las diferencias entre grupos fue determinada por la prueba post hoc de Dunnett \*  $p < 0.048$ , =  $p = 0.051$ .

### Extracción de RNA

Las concentraciones de RNA extraído del tejido del NPV se analizaron por medio de un ANOVA de una entrada y reveló que no existen diferencias

significativas entre los grupos (Figura 26). Mostrando con este análisis, que las concentraciones extraídas fueron equivalentes

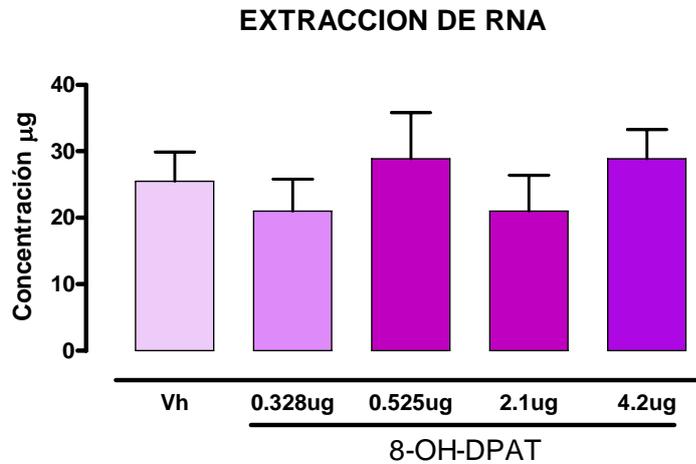


Figura 26 Concentración de RNA del núcleo paraventricular hipotalámico. Los datos son expresados en Medias  $\pm$  ESM.

### Electroforésis

Las electroforésis realizadas de las muestras sometidas a RT-PCR, no presentaron cDNA correspondiente a los pares de bases del receptor, excepto una cantidad apenas perceptible en algunos sujetos del Grupo Control (Sujetos 5, 6 y 7) y del G1 (0.328µg) (Sujetos 1, 2, 4 y 5). La fotografía de los geles se muestra a continuación.

### Electrofóresis

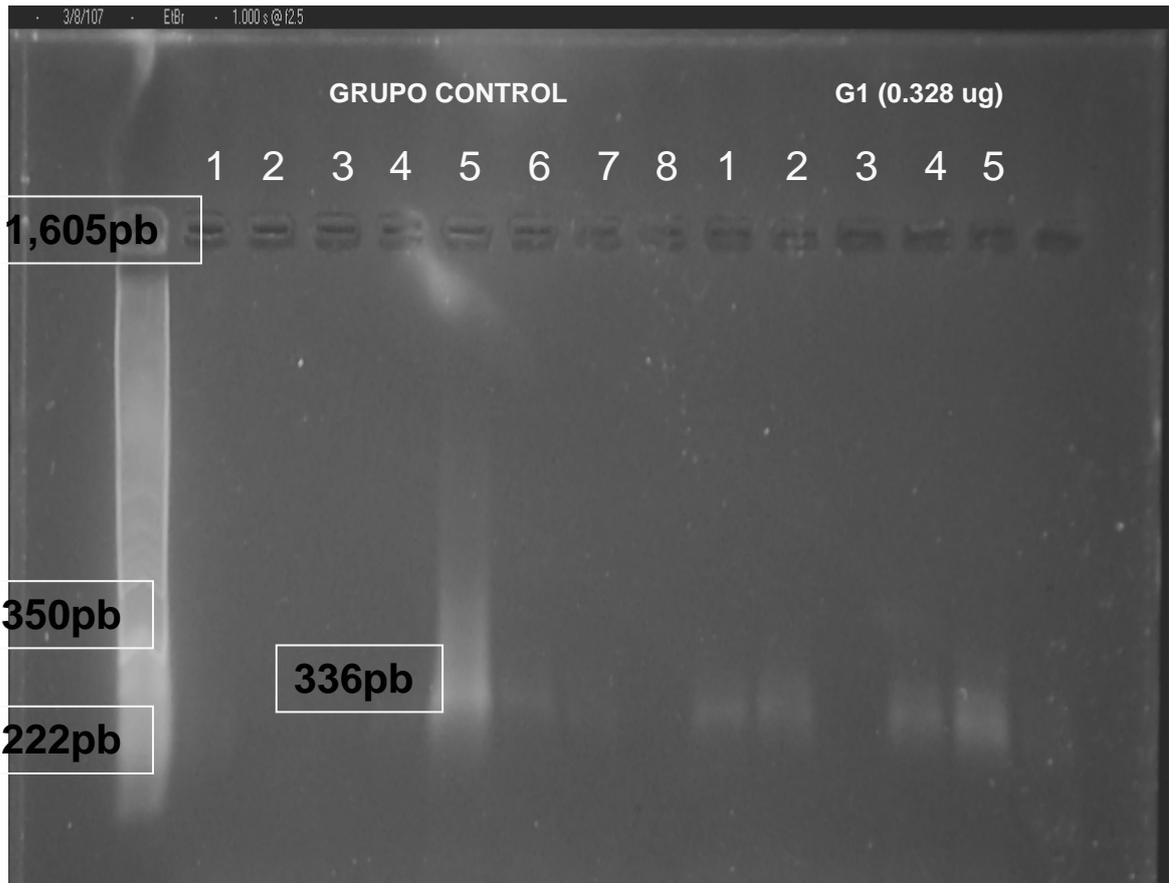


Figura 27 Gel de agarosa al 2% con las muestras de los grupos control y G1 (0.328 $\mu$ g)

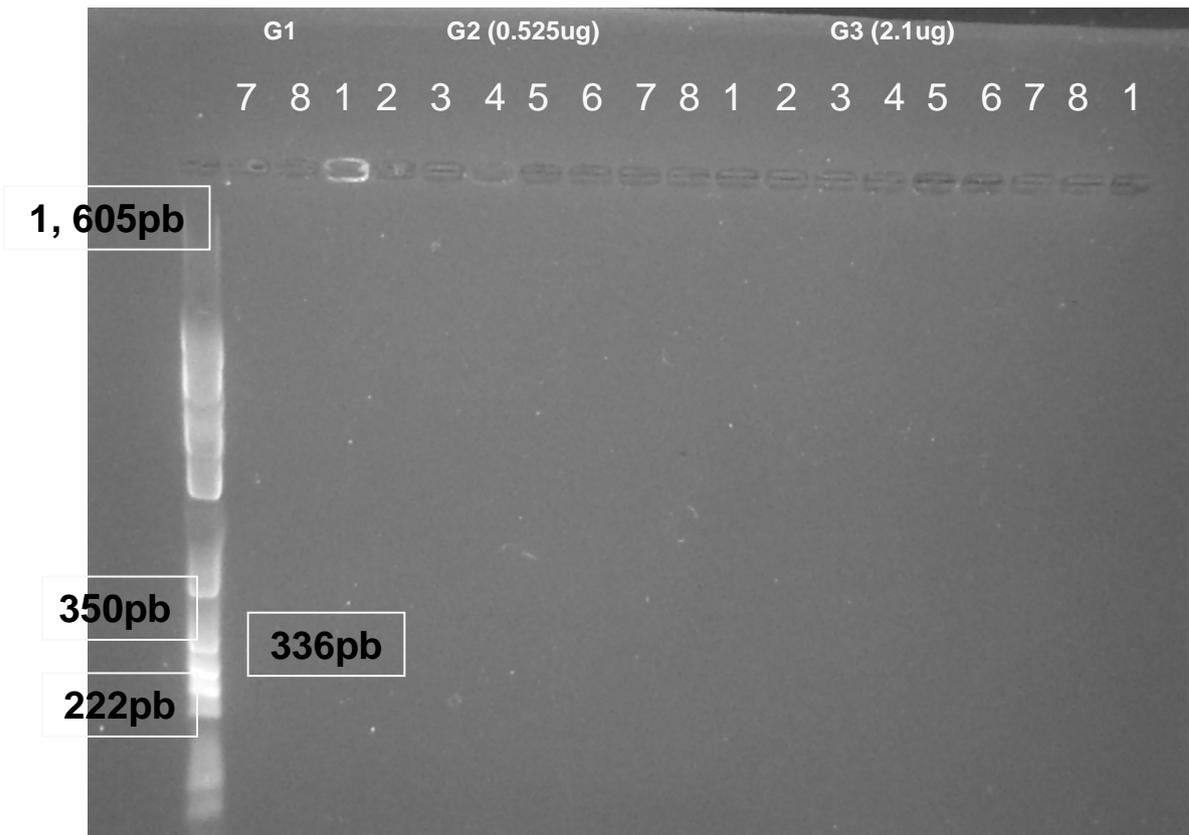


Figura 28 Gel de agarosa al 2% con las muestras de los G1 (0.328 $\mu$ g) muestras 7 y 8 , G2 (0.525 $\mu$ g) y G3 (2.1 $\mu$ g).

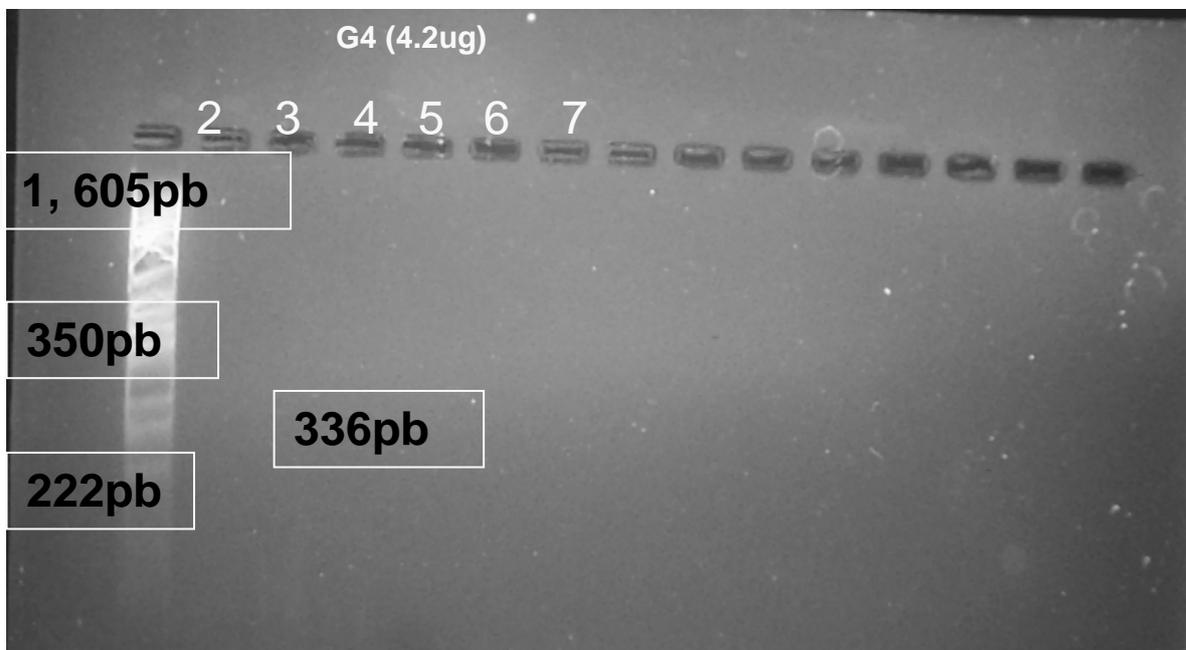


Figura 29 Gel de agarosa al 2% con las muestras del grupo G4 (4.2  $\mu$ g)

## DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal, determinar como el agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, el 8-OH-DPAT, afecta la conducta alimentaria y la expresión del mRNA del receptor en el NPV, mediante la administración intracerebral del agonista, evaluando la ingesta expresada en gramos de alimento consumido (proteínas, carbohidratos y grasas), la Secuencia de Sacidad Conductual y la presencia de cDNA del receptor mediante electroforesis.

### **Ingesta**

Conociendo la influencia del NPV en la actividad serotoninérgica y en la conducta alimentaria, señalada por investigadores como Blundell (1992), investigaciones como estas cuentan con un precedente para determinar las rutas que este neurotransmisor usa para comunicarse, mediante los diferentes receptores a su disposición, entre los cuales se ha descrito la influencia en la alimentación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

La experimentación con diversos agonistas, ha determinado que la mayoría produce un decremento en la ingesta de comida, como lo señala Blundell (1984), como ejemplo de ello también están las investigaciones de Dourish *et al.*, (1985,1986a, b), donde se describe el uso del agonista para este receptor.

El 8-OH-DPAT usando diferentes dosis vía periférica; se estimula mediante dosis bajas a los receptores presinápticos (autoreceptores), inhibiéndolos de esta forma disminuye el metabolismo serotoninérgico, incrementando a su vez la ingesta.

Por otro lado, las dosis altas cuentan con efectos a nivel postsináptico, evidente al presentar el síndrome serotoninérgico, caracterizado por la hiperlocomoción lo que genera una competencia con otras conductas principalmente en la alimentación; ya que los sujetos interrumpen la alimentación y muestran periodos cortos de alimentación como se muestra en esta investigación.

Por su parte Hutson *et al.*, (1988) reportan que el 8-OH-DPAT causa hiperfagia por una acción de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados en los cuerpos celulares en la región del rafe.

Los resultados de Fletcher y Coscina (1993) sugieren que la liberación de 5-HT dentro del NPV puede suprimir la alimentación, aunque no indican

cuales son los mecanismos que interfieren para que se interrumpa; lo cual concuerda con los resultados antes señalados.

Los resultados obtenidos en la presente investigación no mostraron que el consumo de nutrimentos se viera afectado por el fármaco, descartando los efectos que se mencionan en algunos artículos como es la hipofagia o la hiperfagia. Cabe mencionar que se observa una tendencia a disminuir la ingesta en el G2 (0.525ug), por lo que se hace importante resaltar uno de los puntos clave en algunas investigaciones como las realizadas por Dourish *et al.*, (1985), puesto que el uso de una línea base de consumo alta; permite ver la diferencia en el consumo de los animales y por tanto determinar el efecto hiperfágico mencionado. Los experimentos muestran que el 8-OH-DPAT puede incrementar o disminuir la ingesta en ratas dependiendo del nivel de la línea base de ingesta.

### **Secuencia de Saciedad Conductual (SSC)**

Otras investigaciones como la de Bendotti y Samanin (1987), al igual que Voight *et al.*, (2000), confirman el efecto postsináptico en ratas hambrientas, a las que se les aplicó el agonista, resultando en un fuerte síndrome serotoninérgico, que posiblemente interfirió con la conducta alimentaria presentándose principalmente actividad locomotora excesiva. En el caso de este estudio, esto se ve reflejado en el tiempo que los animales invirtieron en otras actividades desplazando a la de alimentarse y descansar.

El síndrome serotoninérgico (SS) es una condición asociada con el uso de medicamentos agonistas de la serotonina. Se presenta por una excesiva estimulación de los receptores centrales y periféricos de serotonina, produciendo cambios en el sistema neuromuscular.

Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> son de los más importantes en la fisiopatología del SS, como lo menciona Cervo y Samanin (1995), su localización principalmente a nivel presináptico, desde donde regula la liberación de serotonina mediante su acción; en la cual incluye a los autorexceptores y a nivel postsináptico, ejercen una función inhibitoria. Este SS es el resultado de la estimulación excesiva de los receptores postsinápticos 5-HT<sub>1A</sub>. Las gráficas de la secuencia de saciedad conductual, demuestran que la activación de los receptores produce un incremento en la actividad, sobre

todo destaca la dosis mayor 4.2  $\mu\text{g}$ , ya que en presencia de ésta, el tiempo se alarga desplazando a la saciedad, permitiendo la estimulación no solo en la presinapsis, también en la postsinapsis.

La importancia en la estimulación de los autoreceptores presinápticos radica en la concentración de 5-HT que se encuentra disponible para los receptores postsinápticos; debido a que la estimulación del receptor, mediante el agonista, disminuye la síntesis y la liberación del neurotransmisor.

Entre los trastornos musculares mencionados por Muñoz y Vargas (2004) se encuentra la mioclonus con un 58%, la hiperflexia con un 52% y la rigidez muscular en los miembros inferiores.

Las secuencias de saciedad conductual muestran un efecto claro del agonista en todos los grupos experimentales, ya que se alteran con respecto al grupo control, siendo el extremo el G4 (4.2  $\mu\text{g}$ ), retardando expresión de la saciedad, sin embargo se presenta una interrupción que no puede ser considerada por la hiperactividad presente.

Mediante el área bajo la curva se determinó que las diferencias significativas entre los grupos control y experimental, con respecto a la actividad, fueron significativas; demostrando el incremento observado en la SSC, la alimentación al igual que el descanso, obtuvieron también diferencias significativas que demuestran como se vio afectado el desarrollo de la conducta. En el caso del grupo experimental, con la concentración más alta, se demostró que tuvo una mayor actividad con respecto al grupo con menor concentración de agonista aplicado.

### **Área Bajo la Curva y Tasa local de alimentación**

La interacción con la que cuenta la ingesta, la conducta de actividad y el descanso, permiten determinar la influencia de estos dos últimos parámetros en la cantidad de alimento consumido, ya que estas dos actividades desplazan de forma determinante el tiempo que invierten los sujetos en la ingesta. Los resultados permitieron determinar, mediante la tasa local de alimentación, que todos los grupos al tercer día de tratamiento disminuían el tiempo dedicado a esta actividad, pero la cantidad de alimento era la misma que la del grupo control. La ingesta de los sujetos fue igual en todos los casos (control con vehículo y experimentales), no así el

tiempo que invirtieron en esta actividad; lo cual indica, que al aplicar las diferentes dosis del agonista, los animales consumieron la misma cantidad de alimento en menor tiempo.

### **Extracción de RNA y Electroforésis**

La presencia del receptor 5-HT<sub>1A</sub> fue confirmado por Colin, *et al.*, (2002) mediante inmunoreactividad en el soma de algunas células en el NPV, ocasionalmente en algunas dendritas, pero nunca fue visto en fibras o en terminales nerviosas.

Las investigaciones moleculares del mRNA realizadas por Alberts, *et al.*, (1990) han permitido localizarlo en diversa estructuras del cerebro, determinando 4 especies de mRNA (3.9, 3.6, 3.3 y 2.0 kb). En el sistema límbico, el mRNA más abundante fue el de 2.0 kb; dentro de este experimento se consideraron estructuras como el *septum*, el tálamo, la amígdala, el bulbo olfatorio y el hipotálamo.

Esto ha permitido que se realicen diferentes búsquedas de mRNA en otras estructuras, usando diferentes primers; tal es el caso de Shi, *et al.*, (2003), Ullmer, *et al.*, (1995) y Li, *et al.*, (2000).

La amplia gama de segmentos usados permitió tomar una decisión restringida para el *primer* a utilizar; la cual se basó en investigaciones, donde se ha utilizado en otras estructuras, cercanas al NPV como el córtex frontal y el hipocampo (Charest, *et al.*, 1993; Kulikov, *et al.*, 2005).

Se comprobó por medio de espectrofotometría, la extracción de cantidades consistentes de RNA entre los grupos (control y experimentales). Mostrando en el caso de los controles, que el agonista no interfiere con la cantidad de RNA total, descartando la falla de este primer paso, al no demostrar contaminación o degradación de RNA como un factor para no presentar una amplificación por medio del RT-PCR, en el cual no se amplificó el segmento del receptor, como se muestra en las electroforesis realizadas de las muestras. Si bien en algunos casos se puede observar una ligera banda, esta no es determinante para asegurar la presencia del receptor.

Por otra parte, la evidencia encontrada por Rasan et al. (1997); en la cual se caracterizó el efecto del 8-OH-DPAT en la expresión del receptor, reveló que algunas dosis que estimulaban al receptor *in vivo* y producían SS,

estimulando receptores postsinápticos, permitían incrementaba mRNA del receptor en el núcleo del rafe dorsal por 30 min.; después de ser inyectado el agonista y al pasar este tiempo, provocar que el mRNA regresara a los niveles control. En el núcleo medial del rafe el efecto opuesto se observó, a los 30 minutos después de la inyección, el mRNA del receptor disminuía. Este decremento era seguido por un aumento en las siguientes 8 hrs., indicando una regulación bifásica. Estas diferencias en la regulación del mRNA también fue resultado de la actividad de regulación de las neuronas; ya que los cambios en el mRNA son resultado de la función que desempeña el receptor

Los resultados obtenidos de la presente investigación descartan la presencia de mRNA del receptor en las muestras obtenidas del NPV, pese a contar con investigaciones como la de Colin *et al.*, (2002), donde se reporta la presencia del receptor y la concentración mayor del receptor es presináptico (somas en el área del rafe); por lo que en la postsinapsis, ésta debe ser menor, siendo un factor para encontrar una menor síntesis de mRNA.

Otro punto a resaltar son las condiciones para la amplificación; ya que el estudio de Kulikov, *et al.*, (2005) muestra una variedad de ciclos, a partir de los cuales apreciaron la expresión del receptor en dos áreas distintas (el córtex frontal y el hipocampo), siendo diferentes las condiciones para expresar los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en estas zonas. La posibilidad de que también el NPV cuente con condiciones muy específicas de amplificación es muy alta; por lo que se sugiere en posteriores estudios, incrementar el número de ciclos.

Aunque la afinidad es menor, la estimulación de este agonista puede estar influyendo no sólo receptores serotoninérgicos del tipo 1A, también a receptores 5-HT<sub>7</sub> y receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, que se encuentran involucrados en la alimentación; aunque aún no se sabe los efectos específicos, ni el potencial del efecto en conjunto.

De forma adicional, pero importante, este agonista cuenta con afinidad a receptores adrenérgicos  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2, así como a receptores dopaminérgicos D2; cuya afinidad es inferior a la de los receptores serotoninérgicos, pero

que cuenta con una presencia de 36% en el rafe y un 5% en el hipocampo (Assié y Koek, 2000).

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo han permitido conocer más acerca del papel del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la conducta alimentaria. Además permite destacar las posibles vías de acción del receptor, para generar nuevas investigaciones y contribuir a una evolución en los tratamientos de los trastornos de la alimentación.

\*El agonista 8-OH-DPAT no mostró los efectos marcados, mencionados en otras investigaciones; como son la hipofagia o hiperfagia, puesto que se presentó un consumo similar en todos los grupos. La tendencia a la disminución en el consumo de carbohidratos, se muestra como una influencia parcial.

\*La secuencia de saciedad conductual confirma el incremento en la conducta de actividad, provocada por el agonista y la disminución en el tiempo de ingesta.

\*La taza local de alimentación reveló que la ingesta era la misma en los sujetos tratados, pero el tiempo de consumo era menor, además el tiempo invertido en esta actividad; así como en el descanso fue menor en comparación con los grupos tratados con las dosis mayores.

\*El RNA total extraído, no se vio afectado por los tratamientos al comprobar que las concentraciones eran similares en todos los grupos.

\*Los resultados indicaron que la secuencia de nuestro interés no se encontraba presente, bajo las condiciones en las que se hizo el RT-PCR en la zona amplificada, lo que permite sugerir el uso de otra secuencia más amplia y variar los ciclos usados generando un nuevo parámetro de expresión para esta área.

\*Otro factor a considerar, en futuras investigaciones, es el tiempo para llevar a cabo la extracción de las muestras; sugiriendo diferentes tiempos para tener mayor control en la actividad de síntesis de mRNA.

## PERSPECTIVAS

En la actualidad los trastornos de la conducta alimentaria (TCA) cuentan con apoyo farmacológico para el tratamiento y recuperación, sobre todo del peso, mediante herramientas desarrolladas a partir del conocimiento de los neurotransmisores.

Durante las últimas décadas se han utilizado neurolépticos, benzodiazepinas, antidepresivos y antagonistas serotoninérgicos como un mecanismo secundario para la recuperación de anorexia y bulimia. En algunos casos, la unión de varios inhibidores de la recaptura de serotonina (fluoxetina) y agonistas serotoninérgicos, han sido usados en conjunto (Kaye, *et al.*, 1998).

El lapso en el cual estos tratamientos se mantienen es dudoso; ya que no actúa como antidepresivo, aumentan la ingesta y suprimen los síntomas de la BN.

Los estudios de tomografía en humanos, han detectado actividades anormales de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> en pacientes con estos trastornos (Kaye, *et al.*, a, b, 2005), por ello la finalidad del presente trabajo.

No obstante lo anterior, los datos encontrados, nos llevan a plantear diversos caminos a seguir para las investigaciones relacionadas con la conducta alimentaria y su regulación a través de los neurotransmisores.

Por ello se proponen

- 1- Determinar la participación en conjunto del receptor 5-HT<sub>1A</sub> y otros subtipos de receptores 5-HT en la conducta alimentaria.
- 2- Determinar la interacción del sistema serotoninérgico con otros neurotransmisores que cuenten con efectos en la conducta alimentaria.
- 3- Evaluar los cambios moleculares que puedan presentar las células al aplicarse diferentes fármacos, así como las manifestaciones conductuales.
- 4- A partir de estos estudios, proponer modelos de tratamiento para los TCA que cuenten con menores riesgos en la salud del paciente.

5- Proponer estrategias de farmacogénia que permitan adaptar a largo plazo los fármacos usados, disminuyendo el riesgo de efectos secundarios.

## Anexo 1

### Extracción de RNA

La extracción se realizó a partir del High Pure RNA Tissue kit (Roche, Penzberg, Germany)

1. Se homogeneizó el tejido obtenido previamente además de romper las células por medio de sonicador.
2. A un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml libre de nucleasas con la cantidad de tejido pulverizado y lisado se añadió 400  $\mu$ l de Lisis/Binding Buffer.
3. Centrifugar el lisado por 2 min. A máxima velocidad en una microcentrifuga y utilizar solo el sobrenadante recolectando para los pasos siguientes (algunas veces pequeñas cantidades de material insoluble pueden estar presentes haciendo este pellet invisible).
4. Se añadieron 200  $\mu$ l (0.5 volúmenes) de etanol absoluto al sobrenadante del lisado y mezclar bien (Si algo del lisado se perdió durante la homogenización, se redujo el volumen de etanol de acuerdo a la cantidad).
5. Combinar el filtro *High Pure* con el tubo de colección y se pipeteo toda la muestra en el contenedor superior (volumen máximo 700  $\mu$ l)
6. Centrifugar por 30s a máxima velocidad (13 000 x g) en una microcentrifuga estándar de mesa.
7. Se desechó el líquido filtrado y re-ensambló el tubo filtro y el tubo colector usados.
8. Para cada aislado se pipeteo 90  $\mu$ l de DNAasa Incubation Buffer en tubos El kit contiene solventes que 1) degradan la pared celular, 2) se genera la precipitación de organelos, 3) se precipitan las proteínas de baja densidad, 4) se libera el DNA y 5) Se condensa el DNA ya que al liberarlo se encuentra laxo.

## Anexo 2

### **Trascricpción Reversa de la Polimerasa (RT-PCR)**

La RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa), permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas blanco de RNA (tanto mRNA como RNA total) con gran especificidad, mediante la trascricpción reversa del RNA a cDNA, que es posteriormente amplificado. De esta forma, se puede medir la expresión génica (O'Connell, 2002). La RT-PCR es más sensible que otras técnicas y requiere menos RNA. Hay dos partes diferenciadas en cualquier RT-PCR: (Dieffenbach y Dveksler, 2003).

- 1- Trascricpción reversa: la RT genera una cadena de DNA simple, complementaria a los RNAs presentes en la muestra.
- 2- PCR: el uso de iniciadores específicos que amplifican por PCR un fragmento a partir del DNA de cadena simple anterior.

En el campo de la neurociencias esta es una técnica que sirve de apoyo para la detección de mRNA de los receptores.

Para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> su uso ha permitido verificar la presencia de este mRNA en el región límbica del cerebro en neuronas, piramidales del cortex e hipocampo y a su vez asociar la interacción con la que cuenta este receptor con diferentes conductas entre ellas se incluye la conducta alimentaría e intenta descubrir los mecanismos por lo que la presencia de esta molécula fluctúa (Palchadhuri y Flugge, 2005).

### **Primers**

La elección de los primers ha de ser cuidadosamente sopesada. Habitualmente, los primers utilizados en RT-PCR están a ambos lados de un intrón; es decir, en diferentes exones, de forma que se pueda diferenciar

fácilmente entre productos procedentes de mRNA y productos procedentes de DNA genómico contaminante. De esta forma, los productos originarios de un proceso de RT-PCR, a partir de mRNA, serán menores que los productos obtenidos a partir de PCR de DNA genómico contaminante. Este principio no es aplicable a organismos procariontas.

La selección del *primer* depende del tamaño del RNA molde. En la mayoría de los casos, se utilizan primers específicos de secuencia. Para análisis de mRNAs, pueden utilizarse primers oligo (dT), que se unen a las colas de poli(A) presentes en los mRNAs eucarióticos (Dieffenbach y Dveksler, 2003).

La concentración de los primers suele estar alrededor de 50 pmol / 50 µl volumen final reacción, aunque esta concentración puede variar y debe ser optimizada.

En diversos estudios se han utilizado diferentes primers para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> esto debido a la variabilidad que algunos autores le atribuyen a la existencia de en algunos casos dos tipos divididos en alta y baja afinidad (Abe *et al.*, 1999) y hasta cuatro tipos mRNA (Alberts *et al.*, 1990).

## RT-PCR

El RNA se amplifico mediante el kit Access RT-PCR System (Promega, Madison, WI, USA)

### Reacciones de Ensamble

- 1- Combine los reactivos en un tubo de reacción con paredes delgadas de 0.5ml en hielo.

Reactivos	Volumen	[ ] Final
Agua libre de nucleasas (para un volumen final de 50 l)	X $\mu$ l	
AMV/ <i>Tfl</i> 5X Buffer de Reacción	10 $\mu$ l	
dNTP Mix (10Mm cada dNTP)	1 $\mu$ l	
Forward Primer	50pmol	
Reward Primer	50pmol	
25 Mm MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu$ l	

- 2-Mezclar pipeteando. Agregar los componentes restantes.

AMV Reverse Transcriptasa  
(5u/l) *Tfl* DNA Polimeraza(5u/l)

1 $\mu$ l

1 $\mu$ l

2- Agitar con un gentil vortex. Iniciar la reacción agregando:  
RNA Templado  $Y\mu$ l

### Anexo 3

#### ELECTROFORESIS

Buffer TBE 10X para electroforesis (Tris borato EDTA)

Tris base                    53.9g/500 ml

Ac. Borico                    27.5g/500 ml

EDTA                         4.65g/500 ml

Para tener una concentración de 0.5X se disuelven 50 ml de Buffer TBE 10X en 950 ml de agua desionizada.

Gel de Agarosa Sigma (Biología Molecular) al 1.5%

Pesar 1.5g de agarosa Sigma (TX, USA) y se disuelven en un frasco con capacidad de 250 ml que contenga 100ml de agua desionizada. Esta mezcla se calienta hasta que se haya disuelto por completo, se verifica por lo tanto que no existan grumos, ni turbiedad, además de evitar que se queme.

Al alcanzar estas condiciones se deja a temperatura ambiente evitando la gelificación hasta alcanzar aproximadamente 50 C para agregar 5 l DE Bromuro de etidio (5 l/100ml de solución de TBE 0.5X) permitiendo así ser revelado el gel en la cámara de rayos UV.

Marcadores y muestras de RNA (Para amplificados)

Marcador 1, 605pb

1 ml de marcador

1 ml de colorante (mezclado con el marcador)

4 ml de agua desionizada

En un tubo ependorf de 1.5 ml se colocan el marcador, el colorante y el agua agitando vigorosamente con ayuda del vortex, durante 20 seg., para centrifugar por ultimo durante 10 seg. a máxima velocidad (short spin).

#### Muestras de RNA

Las muestras usadas para la electroforesis, se dejan a temperatura ambiente por 10 min. y son centrifugadas durante 10 segundos a máxima velocidad (short spin).

En un tubo ependorf de 1.5 ml se colocan:

2 ml de marcador gel loading (SIGMA, TX,USA)

8 ml de muestra

Nuevamente se agita con ayuda del vortex y se centrifuga (short spin).

## REFERENCIAS

- Abe, S., Hori, T., Suzuki, T., Baba, A., Shiraishi, H. y Yamamoto, T. 1999. Effects of chronic administration of interferon  $\alpha$  A/D on serotonergic receptors in rat brain. *Neurochemical Research*, 24(3): 359-363.
- Afifi, A. K. y Bergman, R. A. 1998. *functional Neuroanatomy Text and atlas*. E.U.A, McGraw Hill.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 1994. *Biología Molecular de la célula*. Barcelona, Ediciones Omega.
- Alberts, P. R., Zhou Q., Van Tol, H. H. M., Bunzow, J. R. y Civelli, O. 1990. Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-Hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(10): 5822-5832.
- Assié, M. y Koek, W. 2000. [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT binding in the rat brain raphe area: involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and non-5-HT<sub>1A</sub> receptors. *British Journal of Pharmacology*, 130: 1348 – 1352.
- Avgustinovich, D. F., Alekseyenko, O. V. y Tenditnik, M. V. 2001. fighting among C57BL/6J mice and its implications for [<sup>3</sup>H]-8-hidroxy- N, N-dipropil-2-aminotetralin binding in various brain regions. *Neuroscience Letters*, 305: 189-192.
- Barnes, N. M. y Sharp, T. 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38: 1083-1152.
- Blier, P. y Ward, N. M. 2003. Is the role for 5-HT<sub>1A</sub> agonist in the treatment of depression? *Biological Psychiatry*, 53: 193-203.
- Blundell, J. E. 1984. Serotonin and appetite. *Neuropharmacology*, 23(12B): 1537-1551.
- Blundell, J. E. 1992. Serotonin and the biology of feeding. *Am J Clin Nutr.*, 55:155S-9S.
- Bowman, B. A. y Russel, I. R. M. 2003. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. Washington: International Life Science Institute.
- Bradbury, M.J., Giracello, D.R., Chapman, D.F., Holtz, G., Schaffhauser, H., Rao, S.P., Varney, M.A. y Anderson, J.J. 2003 Metabotropic glutamate receptor 5 antagonist-induced stimulation of hypothalamic–pituitary–

- adrenal axis activity: interaction with serotonergic systems. *Neuropharmacology*, 44: 562–572
- Campfield, L. A. 1997. Metabolic and hormonal control of food intake: Highlights of the last 25 years-1972-1997. *Appetite*, 29: 135-152.
- Carew, T. J. 2000. Behavioral Neurobiology. Neuroscience. Sunderland. Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Carrasco, G. A., Barker, S. A., Zhang, Y., Damjanoska, K. J., Sullivan, N. R., García, F., D'Souza, D. N., Muma, N. A y Van De Kar, L. D. 2004. Estrogen treatment increases the levels of regulator of G protein signaling-z1 in the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in desensitization of 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors. *Neuroscience*, 127: 261–267.
- Castro, M. E., Diaz, A., Olmo, E. y Pazos, A. 2003. Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in rat brain. *Neuropharmacology*, 44: 93–101.
- Cevo, L. y Samanin, R. 1995. 5-HT<sub>1A</sub> receptor full and partial agonist and 5-HT<sub>2C</sub> (but not 5-HT<sub>3</sub>) receptor antagonists increase rates of punished responding in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 53(4): 671-676.
- Charest, A., Wainer, B. H. y Alberts, P. R. 1993. Cloning and Differentiation-Induced Expression of a Murine Serotonin, Receptor in a Septal Cell Line. *The Journal of Neuroscience*, 13(12): 5194-5171.
- Collin, M., Bäckberg, M., Önnestam, K., y Meister, B. 2002. 5-HT<sub>1A</sub> receptor immunoreactivity in hypothalamic neurons involved in body weight control. *Neuroreport.*, 13(7): 945-951.
- Coscina, D. V., Currie, P.J., Bishop, C., Parker, G. C., Rollins, B. L. y King, B. M 2000. Posterodorsal amygdala lesions reduce feeding stimulated by 8-OH-DPAT. *Brain Research*, 883: 243–249.
- Cooper, J. R., Bloom, F. E. y Roth, R. H. 1996. The biochemical basis of neuropharmacology. New York. Oxford University Press.
- Currie, P. J. y Coscina, D. V .1993. Paraventricular nucleus injections of idazoxan block feeding induced by paraventricular nucleus norepinephrine but not intra-raphe 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin. *Brain Research*, 627: 153-158.

- Currie, P. J., Coiro, C. D., Niyomchai, T., Lira, A. y Farahmand, F. 2002. Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine: Receptor-specific inhibition of NPY-stimulated eating and energy metabolism. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 71: 709–716.
- Currie, P.J., Coscina, D.V. y Fletcher, P.J. 1998. Reversal of Fenfluramine and Fluoxetine Anorexia by 8-OH-DPAT is Attenuated Following Raphe Injection of 5,7-dihydroxytryptamine. *Brain Research*, 800, 62-68.
- Dabrowska, J. y Brylinski, M. 2006. Stereoselectivity of 8-OH-DPAT toward the serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor: biochemical and molecular modelling study. *Biochemical Pharmacology*, 72: 498-511.
- De Vry, J., Eckel, G., Kuhl, E. y Schreiber, R. 2000. Effects of serotonin 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> Receptor Agonists in a Conditioned Taste Aversion Paradigm in the Rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66(4): 797–802.
- De Vry, J. y Schreiber, R. 2000. Effects of selected serotonin 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. *Neuroscience and Behavior Reviews*, 24: 341-353.
- Dieffenbach, C. W. y Dveksler. 2003. PCR Primer. A laboratory manual. Nueva York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Dong, X., Han, Z., Xiong, K. y Rao, Z. 1997. Fos expression in serotonergic midbrain neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus after noxious stimulation of the stomach: a triple labelling study in the rat. *Neuroscience Research*, 27: 155-160.
- Dourish, C. T., Hutson, P. H., Kennett, G. A. y Curzon, G. 1986 a. 8-OH-DPAT Induced hyperphagia: its neural basis and possible therapeutic relevance. En: N. Stilianos (Ed), Serotonergic system, feeding and body weight regulation., London: Academic Press.
- Dourish, C. T., Hutson, P. H. y Curzon, G. 1986 b. Parachlorophenylalanine prevents feeding induced by the serotonin agonist 8-hidroxy-2-(di-*n*-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT). *Psychopharmacology*, 89: 467-471.
- Dourish, C. T., Hutson, P. H. y Curzon, G. 1985. Characteristics of Feeding Induced by the Serotonin Agonist S-Hydroxy-2-(Di-*n*-Propylamino) Tetralin (8-OH-DPAT). *Brain Research Bulletin*, 15: 377-384.

- Ebenezer, I., Vellucci, S. y Parrott, R. 2001. The differential effects of intravenously administered 8-OH-DPAT on operant food intake in satiated and food-deprived pigs are mediated by central 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Physiology & Behavior*, 73: 223-227
- Fletcher, P. J. y Coscina, D. V. 1993. Injection 5-HT into the PVN does not prevent feeding induced by injection 8-OH-DPAT into the raphe. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 46: 487-491.
- Foltin, R. W. 2005. Effects of dietary and pharmacological manipulation on appetitive and consummatory aspects of feeding in non-human primates. *Appetite*, 45: 110-120.
- Gogos, A., Kusljic, S. y Buuse M. 2005. 8-OH-DPAT- induce effects on prepulse inhibition: pre- vs. post-synaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 81: 664-672.
- Gur, E., Dremencov, E., Lerer, B. y Newman, M. E. 2001. Functional effects of corticosterone on 5-HT and 5-HT receptor 1A 1B activity in rat brain: in vivo microdialysis studies. *European Journal of Pharmacology*, 411: 115–122.
- Halford, J. C. G., Wanninayake, S. C. D. y Blundell, J. E. 1998. Behavior satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 61(2): 159-168.
- Hamon, M., Bourgoin, S., Gozlan, H., Hall, D. M., Goetz, C., Artaud, F. y Horn, S. A. 1984. biochemical evidence for the 5-HT agonist properties of PAT (8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin) in the rat brain. *European Journal of Pharmacology*, 100: 263-276.
- Hanoun, N., Mocaër, E., Boyer, P., Hamon, M. y Lanfumey, L. 2004. Differential effects of novel antidepressant agomelatine (S 20098) versus fluoxetine on 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat brain. *Neuropharmacology*. 47: 515-526.
- Hedlund, P. B. y Sutcliffe, J. G. 2007. The 5-HT<sub>7</sub> receptor influences stereotypic behavior in a model of obsessive-compulsive disorder. *Neuroscience Letters*, 414: 247–251
- Herrera, E. 1986. Bioquímica. España, Interamericana.
- Hervás, I., Vilaró, T., Romero, L., Scorza, C., Mengod, G. y Artigas, F. 2001. Desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors by a low chronic fluoxetine

- dose effects of the current administration of WAY-100635. *Neuropsychopharmacology*, 24(1): 11-20.
- Hewitt, K. N., Lee, M. D., Dourish, C. T. y Clifton, P. G. 2002. Serotonin 2C receptor agonists and the behavioural satiety sequence in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71: 691-700.
- Hoyer, D., Hannon, J. P. y Martin, G. R. 2002. Molecular pharmacological and functional diversity of 5-HT receptor. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 71: 533-554.
- Hutson, P. H., Dourish, C. T. y Curzon, G. 1988. Evidence that the hyperphagic response to 8-OH-DPAT is mediated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *European Journal of Pharmacology*, 150: 361-366.
- Ishii, Y., Blundell, J. E., Halford, J. C. G. y Rodgers, R. J. 2003. Effects of systematic variation in presatiation and fasting on the behavioural satiety sequence in male rats. *Physiology & Behavior*, 79: 227– 238.
- Kaye, W. H., Bailer, U. F., Frank, G. K., Wagner, A. y Henry, S. E. 2005 a. Brain imaging of serotonin after recovery from anorexia and bulimia nervosa. *Physiology & Behavior*, 86: 15-17.
- Kaye, W. H., Frank, G. K., Bailer, U. F., Henry, S. E., Meltzer, C. C., Price, J. C., Mathis C. A., y Wagner A. 2005 b. Serotonin alterations in anorexia and bulimia nervosa: New insights from imaging studies. *Physiology & Behavior*, 85: 73-81.
- Kaye, W. H., Gendall, K. y Strober, M. 1998. Serotonin neuronal function and selective serotonin reuptake inhibitors treatment in anorexia and bulimia nervosa. *Society of Biological Psychiatry*, 44: 825-838.
- Kim, J. G., Nam-Goong, I. S., Yun, C. H., Jeong, J. K., Kim, E. S., Park, J. J., Lee, Y. C., Kim, Y. I. y Lee, B. J. 2006. TTF-1, a homeodomain-containing transcription factor, regulates feeding behavior in the rat hypothalamus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349: 969–975.
- Klink, R., Robichaud, M. y Debonnel, G. 2002. Gender and gonadal status modulation of dorsal raphe nucleus serotonergic neurons. Part II. Regulatory mechanisms. *Neuropharmacology*, 43: 1129-1138.
- Kulikov, A., Naumenko, V., Vova, I., Tikhanova, M. y Popova, N. 2005. Quantitative RT-PCR assay of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor

- mRNA using genomic DNA as an external standar. *Journal of Neuroscience\_Methods*, 141: 97-101
- Leibowitz, S. F. y Alexander, J. (1998). Hypothalamic serotonin in control of eating behavior meal size, and body weight. *Society of Biological Psychiatry*, 44, 851-864.
- Le Poul, E., Boni, C., Hanoun, N., Laporte A., Laaris, N., Chauveau, J., Hamon, M. y Lanfumey, L. 2000. Differential adaptation of brain 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology*, 39: 110-122.
- Li, Q., Wichems, C., Heils, A., Lesch, K. P. y Murphy, D. 2000. Reduction in the density and expression, but not G-protein coupling, of serotonin receptors (5-HT<sub>1A</sub>) in 5-HT transporter knock-out mice: gender and brain region differences. *The Journal of Neuroscience*, 20(21): 7888-7895.
- López, A. V. E., Mancilla, D. J. M. y Escartín, P. R. E. 2002. Secuencia de saciedad conductual un análisis de la conducta de alimentación. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 28(2): 131-144.
- López, F. A., Norton, C. S., López, F. M., Armellini, D. D., Burcke, S., Akil, H., López, J. F. y Watson, S. J. 2004. Serotonin 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA expresión in subjects with major depresión, bipolar Disorder, and schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 55: 225-233.
- Lu, N. Z. y Vetea, C. 2002. Ovarian steroid regulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding and G protein activation in femail monkeys. *Neuropsychopharmacology*, 22(1): 12-24.
- Luo, S. y Li E. T. 1990 a. Effects of repeated administration of serotonergic agonists on diet selection and body weight in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 38: 495-500.
- Luo, S., Ransom, T. y Li, E. T. S. 1990. Selective increase in carbohydrate intake by rats treated with 8-hidroxy-2-(di-n-propilamino)-tetraline y buspirone. *Life Science*, 46: 1643-1648.
- Maciag, D., Coppinger, D. y Paul, I. A. 2006. Evidence that the deficit in sexual behavior in adult rats neonatally exposed to citalopram is a

- consequence of 5-HT<sub>1</sub> receptor stimulation during development. *Brain Research*, 1125: 171 – 175.
- Mancilla, J. M. y Pérez, B. E. 1992. Serotonina – Conducta alimenticia. *Revista Mexicana de Psicología*, 29(2), 143-150
- Mathews, C. K. y Holde, K. E. 2000. Bioquímica. España. McGraw-Hill/Interamericana.
- McGiverty, R. W. 1998. Bioquímica Aplicaciones Clínicas. España, Interamericana.
- Meneses, A. y Hong, E. 1995. Effects of fluoxetine on learning and memory involves multiple 5-HT systems. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52(2): 341-346.
- Meneses A. y Perez-Garcia G. 2007. 5-HT<sub>1A</sub> receptors and memory *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31( 5): 705-727.
- Morien, A., Wellman, P. J. y Fojt, J. 1995. Diurnal rhythms of paraventricular hypothalamic norepinephrine and food intake in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52 (1): 169-174.
- Muñoz, H. y Vargas, A. 2004. Síndrome serotoninérgico. *Med UNAB*, 7(20): 144-150.
- Newman, M. E., Shaloma, G., Rana, A., Gur, E. y Van de Kar, L. D. 2004. Chronic fluoxetine-induced desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> autoreceptors: regional differences and effects of WAY-100635. *European Journal of Pharmacology*, 486: 25– 30.
- O'Connell, J. 2002. RT-PCR Protocols. Totowa, Human Press Inc.
- Pauwels, P. L. (2000). Diverse signalling by 5-Hydroxytryptamine (5-HT) receptors. *Biochemical Pharmacology*, 60, 1743-1750.
- Paxinos, G. y Watson Ch. 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
- Pickard, E. G. y Reblc, A. M.1997. Serotonergic innervation of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and photic regulation of circadian rhythms. *Biology of the Cell*, 89: 513-523.
- Popova. N., Avgustinovich, D. F., Kolpakov V. G. y Plyusnina, I. Z. 1998. Specific [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT binding in brain regions of rats genetically predisposed to various defense behavior strategies. *Pharmacology Biochemistry and behavior*, 59(4): 793-797.

- Raymond, J. R., Mukhin, Y., Gettys, T. y Garnovskaya, M., 1999. The recombinant 5-HT<sub>1A</sub> receptor: G protein coupling and signalling pathways. *British Journal of Pharmacology*, 127: 1751-1764.
- Raymond, J. R., Mukhin, Y. V., Gelasco, A., Turner, J., Collinsworth, G., Gettys, T. W., Grewal, S. J. y Garnovskaya, M. N. 2001. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacology & Therapeutics*, 92: 179-212.
- Razani, H., Hedlund, P., Hansson, A., Fuxe, K. y Ogren, O. 1997. 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation: short-term effects on the mRNA expression of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor and galanin in the raphe nuclei. *Neuroreport*, 8: 3565-3570.
- Roland, P. E. 1993. Brain Activation. Nueva York. Wiley-Liss.
- Romanova, I. V., Ramos, E. J., Xu, Y., Quinn, R., Chen, C., George, Z. M., Inui, A., Das, U. y Meguid, M. M. 2004. Associated with Weight Loss after Gastric Bypass. Neurobiologic Changes in the Hypothalamus. *Journal of American College of Surgeons*, 199(6): 887-895
- Schwartz, M., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. y Baskin D. G. 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 406: 661-671
- Serres, F., Li, Q., García, F., Raap, D. K., Battaglia, G., Muma, N. y Van de Kar, L. 2000. Evidence that G<sub>Z</sub>-proteins couple to hypothalamic 5-HT<sub>1A</sub> receptors *in vivo*. *The Journal of Neuroscience*, 20(9): 3095-3103.
- Shi, F., Visser, W. H., Jong, N. M. J., Liem, R. S. B., Ronken, E. y Hoekstra, D. 2003. Antisense oligonucleotides reach mRNA target via the RNA matrix: downregulation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *Experimental Cell Research*, 291: 313-325.
- Smith, B. K., York, D. A. y Bray, G. A. 1999. Activation of hypothalamic serotonin receptors reduce intake of dietary fat and protein but not carbohydrate. *American Physiological Society*, R802-R811.
- Stefulj, J., Jernej, B., Cicin-Sain, L., Rinner, I., y Schauenstein, K. 2000. mRNA Expression of Serotonin Receptors in Cells of the Immune Tissues of the Rat. *Brain, Behavior, and Immunity*, 14: 219-224
- Ullmer, C., Schmuck, K., Kalkman, H. O. y Lubbert H. (1995). Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *Federation of European Biochemical Societies*, 370, 215 - 221

- Vickers, S. P., Benwell, K. R., Porter, R. H., Bickerdike, M. J., Kennett, A. G. y Dourish, C. T. 2000. Comparative effects of continuous infusion of MCPP, Ro 60-0175 and d-fenfluramine on food intake, water intake, body weight and locomotor activity in rats. *British Journal of Pharmacology*, 130: 1305-1314.
- Voigt, J. P., Kienzle, F., Sohr, R., Rex, A. y Fink, H. 2000. Feeding and 8-OH-DPAT-Related release of serotonin in the rat lateral hypothalamus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65(1): 183-189.
- Voet, D. & Voet, J. 2004. *Biochemistry*. United States of America, John Wiley & Sons, Inc.
- Wozniak, K., Durcan, M. y Linnoila, M. 1991. Is NAN-190 an effective antagonist of the hypothermia and hyperglycemia induced by the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT?. *European Journal of Pharmacology*, 193: 253-256.
- Wurtman, J. J. y Wurtman, R. 1979 a. Drugs that enhance central serotonergic transmission diminish elective carbohydrate consumption by rats. *Life Science*, 24: 895 - 904.
- Wurtman, J. J. y Wurtman, R. 1979 b. Fenfluramine and other serotonergic drugs depress food intake and carbohydrate consumption while sparing protein consumption. *Current Medical Research And Opinion*, 6: 28 – 33.
- Wurtman, R. J. y Wurtman, J. 1998. Serotonergic mechanisms and obesity. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 9: 511 – 515.
- Zhang, Y., D'Souza, D., Raap, D. K., Garcia, F., Battaglia, G., Muma, N. A., y Van de Kar, L. D., 2001. Characterization of the Functional Heterologous Desensitization of Hypothalamic 5-HT<sub>1A</sub> Receptors after 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Activation. *The Journal of Neuroscience*, 21(20):7919–7927.
- Zhang, Y., Gray, T. S., D'Souza, D. N., Carrasco, G. A., Damjanoska, K. J., Dudas, B., García, F., Zainelli, G. M., Sullivan N. R., Hanley, S., Battaglia, G., Muma, N. A. y Van de Kar, L. 2004. Desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors by 5-HT<sub>2A</sub> receptors in neuroendocrine neurons *in vivo*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(1): 59-66.