

03086

3
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DEL POSGRADO DEL C.C.H.

“ESTUDIO CRONOBIOLOGICO DE LOS SISTEMAS
DOPAMINERGICOS INVOLUCRADOS EN LA
ESQUIZOFRENIA”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
PRESENTA EL M. en C. Q.
CARLOS ALEJANDRO TORNER AGUILAR

TUTOR: DR. RAUL AGUILAR ROBLEDO

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR. MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

274239



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.

Tesis: "Estudio cronobiológico de los sistemas dopaminérgicos involucrados en la esquizofrenia".

Comité Tutorial:

Dr. Raúl Aguilar Roblero
Dr. Carlos Valverde Rodríguez
Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera.

Sinodales:

Dr. Raúl A. Aguilar Roblero
Dra. María Magdalena Giordano
Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Dr. Roberto Prado Alcalá
Dr. José Segovia
Dr. Marco Antonio Sánchez

El trabajo experimental de la tesis fue realizado en el Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., en el laboratorio del Dr. Raúl Aguilar Roblero, quien fungió como Tutor de la misma.

La Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) hizo posible la realización de este proyecto mediante una Beca para Estudios de Posgrado a Carlos A. Torner Aguilar, y mediante el financiamiento IN206697 a RAR.

Otra fuente importante de financiamiento fue el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con el apoyo 400346-5-L0024N asignado a RAR.

Reconocimientos:

Esta tesis contó con la participación de varios amigos. En primer lugar, debo mencionar al Dr. Raúl Aguilar Roblero. Me precio de su amistad desde las remotas épocas en las que llegamos al entonces Centro de Investigaciones en Fisiología Celular. Su sólida formación científica en el área de la cronobiología permitió interpretar una serie de observaciones de las investigaciones clínicas que realizamos en el Hospital Psiquiátrico "Fray Bernardino Alvarez", las cuales forman parte de los antecedentes clínicos de este trabajo. Su entusiasmo -además, ciertamente, de una extraña vocación paleontológica- le llevó a invitarme a trabajar en su laboratorio para caracterizar las diferencias temporales de los sistemas dopaminérgicos de la rata, lo que se formalizó con mi ingreso al programa de Doctorado en Ciencias Fisiológicas del Centro de Neurobiología de la UNAM. Su decidido apoyo como Tutor y Director del proyecto de tesis ha sido fundamental para el avance de este proyecto.

Debo reconocer la importante participación de los miembros del Comité Tutorial: los Dres. Gonzalo Martínez de la Escalera y Carlos Valverde. Ellos modularon y estimularon el trabajo de esta tesis. Sus exigencias y sugerencias al proyecto han sido fundamentales. En el enlace con los requerimientos académicos, debo mencionar a la Dra. Sofía Díaz, quien brindó su generoso apoyo siempre que fue necesario.

El Dr. Mauricio Díaz Muñoz con su experiencia y apoyo facilitó el montaje de la técnica radioligando-receptor. Como colaborador inicial en la parte experimental, participó el Biólogo José Luis Chávez. En los experimentos de catalepsia colaboraron dos estudiantes de Medicina: Luis A. Sánchez Hurtado y Alejandro Martínez. La Dra. Luz Navarro fue importante en el análisis estadístico y en no pocas discusiones, y el Dr. Rolando Hernández varias veces dispuso desinteresadamente los medios para no detener los experimentos; también el Dr. Fernández Guasti, mediante un generoso préstamo de ketanserina impidió que se detuviese el trabajo en un momento crítico.

Como reconocimiento especial, debo mencionar a la Dra. Carolina Escobar, quien desde su llegada al laboratorio fomentó con su experiencia y entusiasmo la parte de los experimentos conductuales. La Dra. Escobar además, ha participado en la revisión de varios manuscritos, enriqueciéndolos substancialmente.

Otros amigos presentes de una forma o de otra en este trabajo, han sido los miembros del laboratorio: Ivette, Alberto, Daniel, Tania, Patricia, y Fabiola. A Ricardo y a Jorge, amigos insuperables en el albur y discusiones filosóficas. También debo agradecer por su colaboración a Mario y a Lino, quienes además de tener listo el material, hicieron del laboratorio un lugar agradable. Los imprescindibles ingenieros, Arturo y Javier, fueron fundamentales en nuestro eterno pleito con las veleidosas máquinas de cómputo.

En el arranque de este proyecto en el Hospital "Fray Bernardino Alvarez" participaron la Psic. Martha Rosas y el Dr. Miguel Herrera. Existe también el afortunado ejemplo del Dr. Benito Antón, conquistador español de las Californias, amigo de muchos años, y Debo agradecer a Lourdes, Luis Medrano, Marcela, Anabel, Montserrat, "los manitos", "los psiquiatras", etc., por su generosa amistad. Finalmente, el Dr. Javier Velázquez Moctezuma brindó su apoyo para la elaboración del manuscrito en su versión final, en el Departamento de Biología de la Reproducción de la UAM-I.

La motivación para emprender la empresa que significó este trabajo la trajo Tanis. Ella también trajo al Ulises, quien catalizó el deseo. Ambos se han dedicado a recargar amorosamente mi espíritu.

En los afectos, debo reconocer agradeciendo la influencia de mis Padres en este esfuerzo.

Una persona importante por su desinteresada crítica y su ejemplo, es Luz María Torner. Ella ha sido todo lo que se espera de una hermana más que generosa. Coral también ha sido fundamental. Sin embargo, ellas me han hecho odiar las distancias.

INDICE

Indice	i
Abreviaturas	3
Fármacos	4
Glosario	4
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Organización vs. orden temporal	9
Ritmos biológicos	10
Ritmos Circadianos	11
Mecanismos de oscilación o relojes biológicos	13
Estructuras temporales	14
Implicaciones en fisiología	15
Implicaciones en medicina	17
Implicaciones en psiquiatría	20
Ritmos circadianos en la neurotransmisión	21
Dopamina en el sistema nervioso	22
Catecolaminas	22
Dopamina	22
Relaciones anatómicas dopaminérgicas	24
Fisiología de los sistemas dopaminérgicos	26
Receptores dopaminérgicos	28
Nomenclatura de los receptores dopaminérgicos	28
Mecanismos de acción conocidos	30
Distribución de los receptores D1 y D2 dopaminérgicos en vías específicas	30
Ritmicidad en receptores dopaminérgicos	33
Catalepsia y síndrome extrapiramidal	35
Medición de catalepsia	36
Estudios de variaciones diurnas dopaminérgicas en humanos	37
Estudios clínicos preliminares	38
Planteamiento del problema	45

Hipótesis	46
Objetivos	46
Metas	47
Material y Métodos	48
Animales	48
Experimentos de unión ligando-receptor	48
Experimentos de conducta	50
Diseño experimental y análisis estadístico	53
Resultados	55
Ensayo de unión ligando-receptor	55
1) Validación de la técnica	55
2) Estudios de ritmos en receptores	58
2,1) Variaciones diurnas	58
2,2) Cinética de los receptores D2 dopaminérgicos	62
Estudios de conducta	65
1) Catalepsia	65
2) Conductas locomotora y de exploración vertical ("rearing")	70
Discusión	73
a) Validación metodológica	73
b) Variaciones diurnas en receptores	75
c) Conducta	81
d) Discusión general	86
Conclusiones	88
Referencias Bibliográficas	89
Anexos	101

ABREVIATURAS

g .- gravedad. Medida de aceleración centrífuga.

cm .- centímetros.

min. .- minutos.

s .- segundo (s).

h .- hora (s).

° C .- grados centígrados.

mg .- miligramos.

µg .- microgramos.

mM .- Concentración milimolar = milimoles / litro.

µM .- Concentración micromolar = micromoles / litro.

nM .- Concentración nanomolar = nanomoles / litro.

fM .- concentración femtomolar = femtomoles / litro.

fmol/mg prot. .- femtomoles por miligramo de proteína.

[³H]- .- Tiliado; presencia del isótopo radiactivo tritio formando parte de una molécula.

D₂ .- Receptores dopaminérgicos de la familia D2 (D2, D3 y D4).

5HT .- Receptores serotoninérgicos.

ACTH .- hormona adrenocorticotropina.

K_d .- Constante de disociación.

B_{max} .- Unión máxima del ligando a su receptor.

(+) .- estereoisómero dextro-rotatorio de la luz polarizada.

(-) .- .- estereoisómero levo-rotatorio de la luz polarizada.

Fármacos

Haloperidol .- Antipsicótico de la familia de las butirofenonas.

Espiroperidol .- Antipsicótico de la familia de las butirofenonas.

Butaclamol .- Antipsicótico del que existen dos enantiómeros (con estereoisomería óptica).

Ketanserina .- Antagonista serotoninérgico, bloquea los receptores 5HT₂.

Imipramina .- Antidepresivo, bloqueador de la recaptura de aminas biológicas, particularmente noradrenalina y serotonina.

Perfenazina .- Antipsicótico de la familia de las fenotiacinas.

GLOSARIO

Antipsicótico - (generalmente se acepta como sinónimo de neuroléptico) droga que produce una disminución de los síntomas psicóticos en un mediano plazo (2 a 6 semanas). Se acepta que son efectivos para mejorar los síntomas positivos de la esquizofrenia como: alucinaciones e ideación delirantes; sin embargo, son poco efectivos para los síntomas negativos como: el retraimiento y el aplanamiento afectivo.

Acatisia - signo neurológico en el cual los sujetos muestran movimiento constantemente, con dificultad para dejar de moverse voluntariamente. Puede ser producido por fármacos antipsicóticos.

Acinesia .- sin motilidad.

Afinidad - facilidad para el reconocimiento de una molécula por otra. La mayor afinidad en la interacción ligando - receptor, se observa en el reconocimiento (interacción) de una molécula a concentraciones muy bajas de esta, y compitiendo con otras moléculas semejantes.

Agonista - molécula que al unirse al receptor celular, lo activa.

Antagonista - molécula que al unirse con un receptor, impide su activación.

Bimodal - perfil de variaciones diurnas que presenta dos picos de actividad máxima.

Catalepsia - incapacidad de un sujeto experimental para corregir una postura impuesta. En clínica, es una posición (generalmente anormal) mantenida por el sujeto durante tiempos relativamente largos.

Ciclo - cada uno de los intervalos de tiempo que se suceden unos a otros y que tienen las mismas características.

Circadiano .- (circa - cercano a; día - 24 horas) Término acuñado por Halberg (1959) para definir los fenómenos que ocurren con un período cercano a las 24 horas, originados en forma endógena.

Constante de disociación .- medida de la afinidad de un receptor por un ligando o grupo de ligandos.

Cronostasia - regulación de las variaciones en el tiempo de los procesos fisiológicos.

Discinesia .- dificultad para la realización de movimientos voluntarios.

Diurno .- fenómeno que se repite con una periodicidad cercana a 24 horas; en donde no está demostrada claramente una causas endógena. En el caso de demostrarse una causa endógena para las variaciones diurnas el ritmo se denomina circadiano.

Endógeno - evento o fenómeno que ocurre sin causas externas; presupone que estaría siendo generado por uno o varios elementos dentro del sistema.

Esquizofrenia .- psicosis posiblemente multi-causal, de aparición temprana en la vida (pubertad), altamente incapacitante. Se reconocen 5 subtipos: paranoide, catatónica, hebefrénica, desorganizada e indiferenciada.

Fase - momento en el tiempo seleccionado arbitrariamente para comparar una secuencia temporal con ella misma o con otra. Generalmente se toma el momento de mayor actividad de la variable en estudio, definiéndose como acrofase.

Frecuencia - número de oscilaciones de un movimiento vibratorio en la unidad de tiempo.

Jet-lag - trastorno del ritmo circadiano producido por los viajes transmeridionales.

Infradiano - variaciones diurnas que ocurren con una período mayor de 26 horas. Las variaciones se presentan en lapsos de tiempo mayores a un día.

Interacción ligando-receptor (en inglés: binding) - pegado de una molécula (ligando) a una proteína de membrana, mediante un fenómeno de reconocimiento selectivo que puede ocurrir a bajas concentraciones de la molécula (alta afinidad).

Homeostasia .- estado de equilibrio de las funciones y la composición química de los fluidos y tejidos corporales. 2) El proceso mediante el cual se mantiene el equilibrio corporal.

Ligando - molécula que interacciona con un receptor en concentraciones muy bajas, lo que obliga a que haya un reconocimiento "espacial" por parte del receptor hacia el ligando.

Neuroléptico - (se toma como sinónimo de antipsicótico) Droga generalmente utilizada en el tratamiento de los síntomas psicóticos, y que produce trastornos del movimiento; generalmente un síndrome extrapiramidal semejante a la enfermedad de Parkinson.

Neurotransmisor - molécula liberada por las terminales sinápticas para comunicar una célula con la siguiente dentro de un circuito neural.

Nictameral .- evento que ocurre en el día y la noche.

Oscilador .- elemento que presenta variaciones en el tiempo y cuya función participa de alguna manera en la regulación temporal de un sistema.

Orden .- disposición regular de los elementos de un sistema.

Organización .- disposición ordenada en tiempo y espacio de los órganos de la vida.

Parkinsonismo .- síntomas semejantes a los de la enfermedad de Parkinson, producidos por fármacos antipsicóticos.

Periodo - tiempo que tarda un evento en repetirse - lapso de tiempo en el que se completa un ciclo.

Psicoestimulantes - drogas que estimulan la actividad, como el metilfenidato o las amfetaminas. Su mecanismo de acción es la liberación de catecolaminas en el sistema nervioso.

Radioligando .- molécula que interacciona con un receptor biológico, a la que se le adiciona un trazador radiactivo para medir la interacción ligando - receptor.

Receptor - proteína con la propiedad de reconocimiento molecular específico, que además produce un efecto en la célula "receptora", como consecuencia de la interacción con la molécula que reconoce.

Ritmo .- orden en el que se articulan los elementos o fenómenos periódicos. Relacionado con la frecuencia y orden de repetición de un evento en el tiempo.

Sedación .- acción farmacológica conseguida por los sedantes, que consiste en tranquilizar o disminuir la excitación nerviosa.

Selectividad .- preferencia de interacción entre dos cuerpos o moléculas.

Síntomas extrapiramidales - síntomas relacionados con la disfunción de los ganglios basales del sistema nervioso de mamíferos. Consisten en temblor, discinesia, acatisia, signo de la rueda dentada, rigidez muscular, hiperreflexia, y distonía.

Teleológico .- fenómeno del cual se infiere un propósito.

Trastorno bipolar - enfermedad de tipo psiquiátrico en la cual un sujeto presenta episodios de depresión y episodios de manía alternadamente. Se conoce también como psicosis maniaco-depresiva.

Ultradiano - variaciones diurnas que ocurren con un periodo menor de 22 horas. Las variaciones se presentan en lapsos de tiempo menores a un día.

Unimodal - perfil de variaciones diurnas o circadianas en las que se observa un solo pico de actividad máxima.

Variaciones diurnas - similar a variaciones nictamerales. Cambios producidos en el transcurso de un día. Se denominan variaciones diurnas a las variaciones que no han sido caracterizadas completamente como circadianas.

RESUMEN

En el sistema nervioso central se han descrito variaciones diurnas en la mayoría de los sistemas de neurotransmisión. Para la dopamina, se habían encontrado variaciones diurnas en la concentración, así como la liberación, y la densidad de los receptores D₂ dopaminérgicos. Sin embargo, estas variaciones habían sido determinadas solamente en el estriado, y se desconocía la existencia de variaciones diurnas en otros sistemas dopaminérgicos. Por este motivo, en este estudio se determinaron las variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos D₂ de la corteza frontal, del estriado, del complejo amigdalino, y del cerebelo de la rata, mediante el pegado de [³H]-espiroperidol. Salvo el cerebelo que se utilizó como estructura control, en estas regiones encontramos una relación lineal entre el aumento de la cantidad de tejido en los experimentos y el incremento en el pegado específico de [³H]-espiroperidol, lo que es indicativo de la presencia de estos receptores.

El pegado de [³H]-espiroperidol a los receptores D₂ dopaminérgicos mostró variaciones a lo largo del día, dependiendo de la región que se estuviera estudiando. Los receptores D₂ del estriado tuvieron un ritmo unimodal, con un máximo a las 00:00 horas. La corteza frontal tuvo un ritmo bimodal, con picos a las 00:00 y las 12:00 horas. El complejo amigdalino también mostró un ritmo bimodal, con picos a las 18:00 y las 06:00 horas. Estas variaciones estuvieron relacionadas con cambios en la densidad de los receptores (B_{max}), más que con cambios en su afinidad (K_d). La constante de afinidad presentó poca variación, mientras que la densidad de los receptores en horas de pico y valle respectivamente, varió de 355 a 245 fmol/mg prot. en el estriado (31 %), 40.5 a 22 fmol/mg prot. en la corteza frontal (45 %), y 37 a 17 fmol/mg prot. en el complejo amigdalino (54 %). La diferencia en el perfil de las variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos D₂ en las regiones descritas, permite suponer que estos receptores están regulados por mecanismos independientes entre una región y otra.

Por otra parte, la catalepsia ha sido uno de los modelos clásicos para estudiar al sistema dopaminérgico nigro-estriado. Nosotros estudiamos el perfil de variaciones diurnas de catalepsia en un diseño experimental similar al que utilizamos para caracterizar las variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos D₂ (experimentos con diferentes grupos de animales cada 3 horas, a partir de las 00:00 horas). Con este procedimiento encontramos que las variaciones diurnas de catalepsia producida por haloperidol (0.13 mg/kg), tuvieron un perfil de variaciones semejante al que mostraron los receptores dopaminérgicos D₂ del estriado de la rata. Utilizando dosis mayores de haloperidol para la producción de catalepsia (1.2 mg/kg de peso), encontramos que las variaciones temporales tuvieron un pico a las 15:00 horas, siendo diferente del perfil de variaciones de los receptores dopaminérgicos D₂, por lo que es posible que el haloperidol a dosis altas active mecanismos diferentes a los dopaminérgicos para la producción de la catalepsia.

Los resultados obtenidos indican que los receptores dopaminérgicos D₂ tienen variaciones diurnas con un perfil temporal propio de cada región cerebral, que pueden manifestarse en la conducta en la que estos receptores estén involucrados.

ABSTRACT

Diurnal variations have been described for most neurotransmitter systems. A diurnal rhythm for dopamine concentration, transmitter release, and dopaminergic receptors density has been characterized in the dopaminergic synapses of central nervous system of the rat. However, these dopaminergic variations have been only determined in the striatum, while other dopaminergic systems remaining unexplored. For this reason, we studied by [³H]-spiroperidol binding whether diurnal variations exist in dopaminergic D₂ synapses from the frontal cortex, striatum, amygdaline complex, and cerebellum. With exception to the cerebellum, which was used as a control structure, we found that in these regions there is a lineal relationship between the increase in the amount of tissue in the experiments and the increase in the specific [³H]-spiroperidol binding, thus indicating the presence of D₂ dopaminergic receptors.

[³H]-spiroperidol binding to D₂ dopaminergic receptors showed variations along the day, depending upon the region being studied. Striatal D₂ dopaminergic receptors showed an unimodal rhythm with a peak at 00:00 h. The frontal cortex receptors showed a bimodal rhythm with peaks at 00:00 and 12:00 h. The amygdaline complex also showed a bimodal rhythm with peaks at 18:00 and 06:00 h. These variations were caused by changes in the receptor density (Bmax) rather than receptor affinity (Kd). The affinity constant showed only minor variations among peak and trough values in all studied structures, whereas receptor densities in peak and trough values respectively varied from 355 to 245 fmol/mg of protein in the striatum (31%), from 40.5 to 22 fmol/mg protein in the frontal cortex (45%), and from 37 to 17 fmol/mg protein in the amygdaline complex (54%). The difference in the profile of diurnal variations among all the regions described, allows to assume that these receptors are regulated by independent mechanisms.

On the other hand, catalepsy has been one of the classic models for studying the nigro-striatal dopaminergic system. We characterized the diurnal variation profile of haloperidol-induced catalepsy using a similar experimental design to the one we used to characterize the diurnal variations of the D₂ dopaminergic receptors. We ran experiments using the four-corck test with different groups of rats every 3 hours, starting at 00:00 h. With this procedure, we found diurnal variations in the haloperidol-induced catalepsy (0.13 mg/kg b.w.) with a similar profile to that of striatal D₂ dopaminergic receptors. However, when we used higher doses of haloperidol to induce catalepsy (1.2 mg/kg b.w.), we found an unimodal profile of diurnal variation with a peak at 15:00 h, which turns out to be different from the rhythm of the D₂ dopaminergic receptors. These different rhythms suggest that at higher doses, haloperidol could activate different mechanisms than at low dose in order to induce catalepsy.

Finally, results indicate that D₂ dopaminergic receptors have diurnal variations with an independent temporal variation for each cerebral region, which could influence their behavioral function.

*1. 1. En (el) principio creó Dios los cielos y la tierra.
2. Ahora bien, la tierra resultó sin forma y desierta y había
oscuridad sobre la superficie de (la) profundidad acuosa; y la
fuerza activa de Dios estaba moviéndose de un lado a otro sobre la
superficie de las aguas. 3. Y procedió Dios a decir: "Llegue a
haber luz". Entonces llegó a haber luz. 4. Después de eso vio Dios
que la luz era buena, y efectuó Dios una división entre la luz y la
oscuridad. 5. Y empezó Dios a llamar la luz día, pero a la
oscuridad la llamó noche. Y llegó a haber tarde y llegó a haber
mañana, un día primero.
GÉNESIS 1, 1-5.*

INTRODUCCION

Organización vs. orden temporal

La mecánica de los cuerpos celestes le impone un orden temporal a la superficie de la tierra. Los movimientos de traslación y rotación del planeta producen variaciones cíclicas en las condiciones de luz y temperatura ambientales. El origen y desarrollo de la vida en un ambiente que presenta cambios cíclicos con un orden definido, ha condicionado la organización temporal de los mecanismos de subsistencia mediante el proceso de selección natural. Pittendrigh (1993) sugirió que la repetición ordenada y -por lo mismo- predecible de los ciclos ambientales, ha sido aprovechada por la materia viva mediante la creación de programas temporales innatos que sincronizan las actividades metabólicas, fisiológicas o conductuales, adecuadas para anticiparse al cambio ambiental que van a enfrentar. De este modo, el orden de las variaciones ambientales fomenta una organización temporal en la materia viva. Es importante destacar la diferencia entre orden y organización que Pittendrigh (1993) le atribuye a von Neumann: "*La organización tiene un propósito, el orden no*". En un planteamiento teleológico, el propósito primario de la organización biológica sería la perpetuación de la vida misma mediante mecanismos de auto-replicación.

La organización temporal es una característica fundamental de la materia viva (Pittendrigh 1993), manifestándose en los cambios cíclicos que se han encontrado en casi todas las variables fisiológicas estudiadas hasta la fecha (Bunning, 1935; 1963). Las variaciones cíclicas de los parámetros fisiológicos o conductuales de los seres vivos, fueron

consideradas durante mucho tiempo como respuestas pasivas a la influencia de los cambios ambientales. No fue sino hasta el siglo XVIII, cuando de Mairan (1729) estudiando los cambios en la posición de los apéndices de los heliotropos, encontró que las variaciones siguen presentándose aún en ausencia del estímulo solar externo (en oscuridad continua). Estos resultados fueron confirmados por Pfeffer (1875, 1915), quien además encontró que el ritmo de las variaciones no es exactamente de 24 horas cuando se estudia a los organismos en condiciones constantes; desde entonces, se ha venido demostrado que los organismos vivos presentan variaciones periódicas de naturaleza endógena en la mayoría de las “constantes” reguladas fisiológicamente, lo cual implica que alguna parte del individuo viviente tenga un sistema oscilador que de alguna manera cuantifique el tiempo (Friesen y Block, 1984), lo que Pittendrigh denominó: reloj biológico (Pittendrigh 1993). Este oscilador endógeno con funciones de reloj interno es un sistema activo característico de los organismos vivos, del que depende su organización temporal.

Ritmos biológicos

De acuerdo a Aschoff (1981), *“la recurrencia de cualquier evento en un sistema biológico con intervalos más o menos regulares, puede ser considerada un ritmo biológico”*. Sin embargo, la noción de “ritmo” es demasiado vaga para ser útil en la clasificación de una serie de fenómenos recurrentes que tienen diferentes mecanismos subyacentes, por lo que requiere de ciertas restricciones. Según Aschoff (1981) los ritmos pueden ser distinguidos de acuerdo a: 1) sus características tales como la frecuencia; 2) el sistema biológico en el que el ritmo es observado; 3) el tipo de procesos que generan el ritmo; o 4) las funciones que este ritmo tiene.

Los ritmos biológicos pueden tener un rango muy amplio de unidades de frecuencia, desde un ciclo por milisegundo hasta un ciclo cada varios años. Pueden ser observados desde organelos intracelulares, hasta órganos, tejidos, individuos, y poblaciones completas. Los ritmos biológicos pueden ser la respuesta a un estímulo periódico ambiental, denominándose ritmos exógenos; estos ritmos son análogos a las oscilaciones forzadas de sistemas pasivos, en los que el sistema oscila bajo la influencia de perturbaciones periódicas externas, pero la oscilación cesa al suspenderse las perturbaciones. Algunos

ritmos biológicos pueden ser originados dentro del organismo, por lo que se denominan ritmos endógenos. Los ritmos endógenos son análogos a las oscilaciones autosostenidas de los sistemas activos, en los que las oscilaciones continúan aunque la fuente de energía externa se vuelva constante (Aschoff, 1981).

Los ritmos biológicos pueden tener alta variabilidad interindividual, o interespecie, sin embargo, los ritmos que se encuentran ligados a los ciclos geofísicos, como el día y la noche, las mareas, el ciclo lunar, y las estaciones del año, han sido los de mayor relevancia para la biología. Generalmente es posible encontrar especímenes que mantengan ritmos biológicos semejantes a los geofísicos, aún a pesar de ser aislados del ciclo ambiental específico y ser mantenidos en condiciones artificiales constantes (Aréchiga 1975; Aschoff 1981), aunque en estas condiciones, el periodo del ritmo generalmente se desvía un poco del ciclo al que se encuentra normalmente sincronizado, y presenta un **corrimiento libre** hacia su frecuencia natural. Si este ritmo en corrimiento libre persiste durante varios períodos sin atenuación, se considera que el ritmo es capaz de mantener oscilaciones autosostenidas. Esto es lo que se considera un ritmo endógeno.

Ritmos Circadianos

Debido a que el periodo endógeno de un ritmo en corrimiento libre sólo se aproxima al ciclo ambiental que refleja, el prefijo "*circa*" fue introducido por Halberg (1959) para caracterizar los ritmos diurnos como **circadianos** (*circa*: cerca; y *diano*: día); para poder considerarse como circadianas, las oscilaciones podrían variar entre 22 y 26 horas solamente. La extensión de esta terminología definiría los demás ciclos biológicos como circamareales, circalunares, y circanuales. Sin embargo, esto podría conducir a designaciones tales como "circasecundarias" para el ritmo de las contracciones cardíacas. Por lo mismo, y debido al papel predominante de los ritmos circadianos en la naturaleza, los ritmos se han subdividido en **ultradianos**, cuando tienen frecuencias más grandes (períodos más cortos) que los circadianos, e **infradianos** cuando la frecuencia es menor (el período es de mayor duración) que los circadianos (Halberg y cols. 1965).

Los ritmos circadianos se refieren a las oscilaciones que presentan los parámetros bioquímicos, fisiológicos o en la conducta de los seres vivos, y que tienen una correlación

temporal con los cambios del ciclo día/noche. Se ha demostrado que en condiciones naturales del sujeto en estudio, estos ritmos normalmente son sincronizados por eventos externos, como la luz y la temperatura, sin embargo, las oscilaciones pueden continuar aún en condiciones ambientales constantes, con un periodo cercano -pero generalmente diferente- a las 24 horas. Otra característica de los ritmos circadianos es que en condiciones constantes de obscuridad (o iluminación), se pueden producir variaciones en su fase (ser "reiniciados") mediante interrupciones breves del régimen constante ambiental, tales como pulsos de luz (Cuadro I). Un hallazgo interesante ha sido el que la longitud del período de oscilación es relativamente independiente de la temperatura dentro de un rango fisiológico. Esto significa que la duración del período en animales que no regulan su temperatura interna (poiquiloterms), normalmente exhibe poca dependencia de la temperatura del ambiente.

Cuadro I. Características de los ritmos circadianos

- 1) La oscilación puede ser medida como el cambio en alguna propiedad del organismo en el tiempo. Por ejemplo, el ritmo de *Neurospora* es medido determinando el número de horas entre los picos de conidación.
- 2) La duración del período endógeno expresada en condiciones constantes, es específica para la especie en estudio, y generalmente hasta para la cepa o individuo dentro de la especie.
- 3) La duración del período de un ritmo circadiano se dice que es compensada, de tal manera que a diferentes temperaturas del ambiente o bajo diferentes condiciones nutricionales, la duración del período del reloj permanece cercana al mismo valor.
- 4) El concepto de tiempo circadiano (CT por las siglas en inglés: *circadian time*) ha sido formulado para comparar osciladores circadianos con diferente periodicidad endógena. El tiempo biológico es dividido en 24 partes iguales, cada una correspondiente a una hora circadiana. Por convención, CT12 corresponde al inicio de la actividad en condiciones de corrimiento libre.
- 5) El oscilador (o reloj) tendrá un corrimiento libre en condiciones constantes, de acuerdo a su periodicidad endógena, pero puede ser ajustado ("reseteado") o cambiarle su fase mediante cambios abruptos en los niveles ambientales de luz, temperatura, u otros factores. Esto es la forma como el reloj puede ser sincronizado con el ambiente ("entrainment") en la naturaleza.

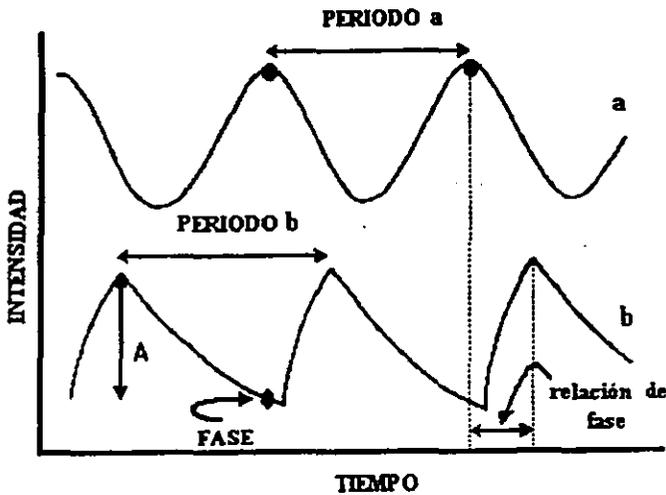


Figura 1.- Ilustración de dos fenómenos oscilatorios con periodos semejantes. El de mayor intensidad (a) alcanza su valor máximo antes que el de menor intensidad (b). La diferencia temporal entre un fenómeno y otro es denominada relación de fase. Convencionalmente la fase es un momento del ciclo escogido arbitrariamente, aunque los valores máximos pueden ser particularmente útiles para comparar varios fenómenos oscilatorios. La amplitud se muestra con una flecha hacia abajo (A) en el primer ciclo de la curva inferior (Modificado de Granados-Fuentes, y cols. 1995).

Las propiedades principales de los sistemas oscilatorios son su período, la fase, su amplitud y sus cambios de fase en respuesta a estímulos externos (Figura 1; Czeisler y cols. 1987; Granados-Fuentes y cols. 1995).

Mecanismos de oscilación o relojes biológicos

Los experimentos de Bunning, quien demostró que las características de los ritmos circadianos de la planta de frijol *Phaseolus* tienen un origen genético que se comporta de acuerdo con las leyes de Mendel (Bünning 1935), y el haber encontrado que los estímulos luminosos de la misma calidad y cantidad, pueden inducir la floración solamente en un momento crítico del reloj (Bunning 1963), lo llevaron a proponer que los organismos

poseen mecanismos internos innatos que les permiten medir el tiempo, al menos en 24 horas y 1 año (Bünning 1963). El mecanismo biológico que le permitiría medir el tiempo a los animales superiores parece residir en el núcleo supraquiasmático (Drucker-Colin y cols. 1984; Aguilar-Roblero, 1989). Este núcleo recibe aferentes directas de la retina (Moore y Lenn, 1972; Hendrickson y cols. 1972), su destrucción ocasiona la pérdida de los parámetros temporales para una amplia serie de funciones biológicas y conductas animales, y su reposición mediante trasplante de tejido de supraquiasmático fetal regenera el ritmo en los animales hospederos (Drucker-Colin y cols. 1984; Aguilar-Roblero y cols. 1986; Aguilar-Roblero, 1989).

En la actualidad, se investiga si existen uno o varias estructuras endógenas que tengan la función de osciladores (relojes biológicos), y el mecanismo de sincronización entre los diferentes osciladores, o entre el oscilador principal y las múltiples funciones fisiológicas que son coordinadas por éste. Otro aspecto importante es la caracterización de la biología molecular de los osciladores biológicos.

Estructuras temporales

El conocimiento de las estructuras temporales en mamíferos ha sido desarrollado a partir de la década de los sesenta. Un ejemplo que explica claramente el concepto de estructura temporal sería un individuo humano sano, que muestra un pico (máxima) de concentración plasmática de la hormona adreno corticotrópica (ACTH) en la noche, durante el sueño. Es importante destacar que en este momento no ocurre la secreción de las hormonas suprarrenales, sino hasta después de cierto retraso de fase con respecto al pico de ACTH el nivel de cortisol plasmático se eleva a su máximo nivel (hacia el momento de despertar del sujeto). El pico de las concentraciones de los metabolitos urinarios del cortisol ocurre 4 horas después del pico de cortisol plasmático, y el cortisol junto con otros corticosteroides influyen sobre los patrones circadianos de otras variables fisiológicas, como la excreción urinaria de potasio, la fuerza de presión manual y la permeabilidad de las vías aéreas (Reinberg y Smolensky, 1993). De este modo, es posible elaborar un mapa de fase de las variables metabólicas de cada especie animal o vegetal, como la que muestra la figura 2, que ubica el valor máximo en el tiempo de las variables metabólicas y

fisiológicas en el humano.

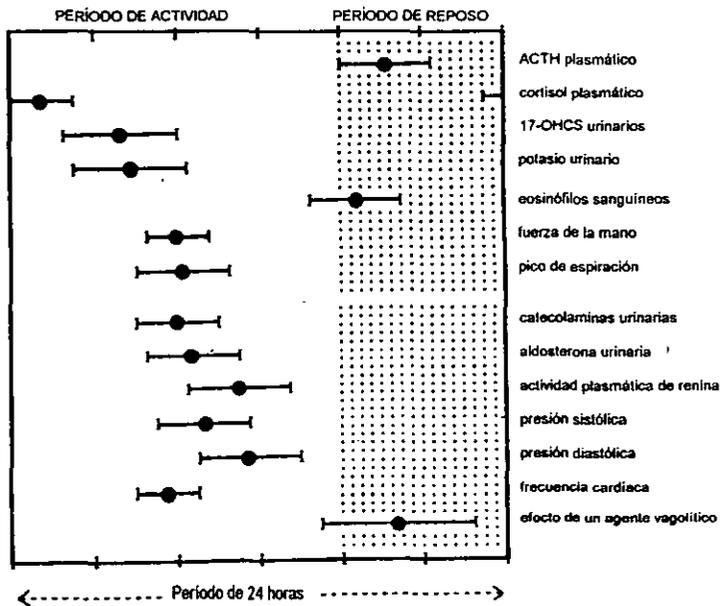


Figura 2: Aspectos de la estructura temporal del humano. Los datos fueron obtenidos de diferentes estudios cronobiológicos, con sujetos que tuvieron 16 horas de actividad diurna y 8 horas de reposo nocturno. En la gráfica se muestran diferentes relaciones fisiológicas validadas temporalmente (Modificado de Reinberg y Smolensky 1993).

Implicaciones en fisiología

El concepto de organización temporal ha tenido poca difusión en medicina. En una magnífica revisión, Reinberg y Smolensky (1993) discutieron la importancia del reconocimiento de las variaciones circadianas de los fenómenos fisiológicos para el ejercicio de la medicina, que sin embargo, ha confrontado uno de los conceptos fundamentales de la fisiología: la **homeostasis**. El concepto del mantenimiento de un medio interno constante (Bernard, 1926), generalmente es presentado como una "ley" absoluta. Por otro lado, en la mayoría de los libros de texto de fisiología, dentro de los mecanismos de regulación se consideran exclusivamente aquellos procesos de retroalimentación negativa, en donde cualquier cambio en una función biológica deberá ser inmediatamente

contrarrestado o balanceado, de tal modo que se mantenga un “equilibrio”, “estado estable”, o “niveles constantes” de acuerdo a un modelo de referencia para tal función, como lo propone la teoría homeostática (Cannon, 1929; figura 3).

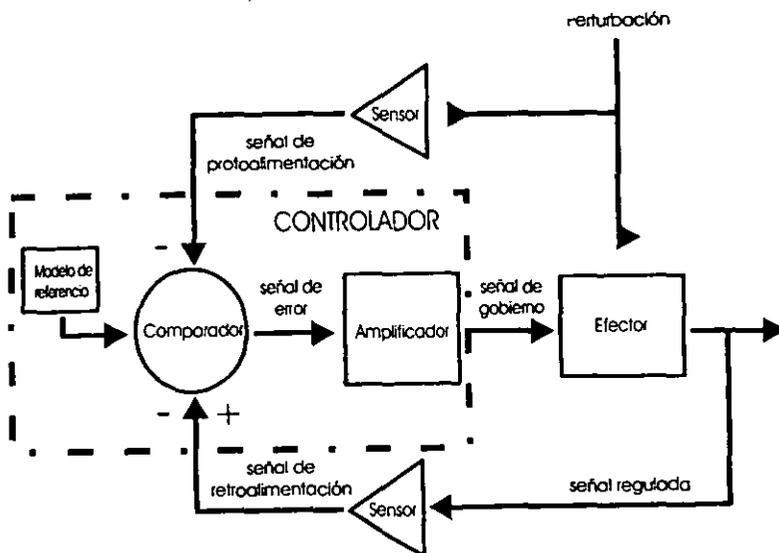


Figura 3.- Representación esquemática de un sistema de regulación homeostática. Los diversos componentes forman asas de retroalimentación y proalimentación. Este tipo de sistemas constan generalmente de 3 elementos: el sensor, el controlador y el efector. En el controlador debe compararse la información que proviene del sensor con un modelo de referencia, produciéndose un ajuste solo cuando hay diferencias (Modificado de Aguilar-Roblero y cols. 1997).

Sin embargo, es obvio que este modelo no puede explicar las fluctuaciones de las funciones biológicas que se presentan con periodos precisos (Reinberg y Smolensky, 1993); tampoco explican por qué las fluctuaciones pueden seguirse presentando aún a pesar de situar a un individuo en condiciones ambientales constantes. El concepto reostasia, el cual “se refiere a aquellos procesos fisiológicos que permiten la ocurrencia de cambios en el modelo de referencia del controlador, lo que conduce a un nivel diferente de la señal regulada” (Aguilar-Roblero y cols. 1997; ver figura 4) tampoco explicaría estas fluctuaciones periódicas, por lo que Aguilar-Roblero y cols. (1997), han propuesto el concepto de “cronostasia”, en donde las variaciones periódicas son reguladas modificando

de manera circadiana el modelo de referencia (figura 5), y los procesos de regulación se encargarían de: a) medir el tiempo biológico, b) ajustar el tiempo biológico con el tiempo geofísico, y c) coordinar la progresión temporal de distintos procesos fisiológicos entre sí.

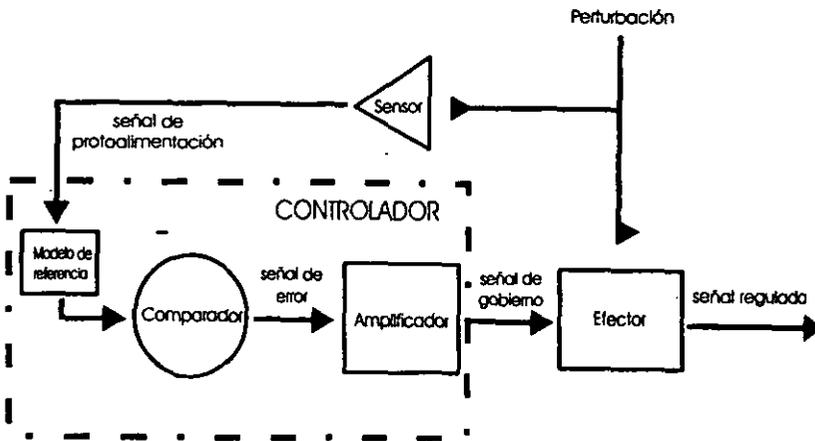


Figura 4.-Para permitir la reostasis, las señales externas inciden sobre el modelo de referencia del controlador, lo que permite un cambio en los valores de regulación de una variable y promueven una adaptación regulada (Modificado de Aguilar-Roblero y cols. 1997).

Implicaciones en medicina

El concepto de homeostasia ha influido sobre otras ramas del conocimiento médico, como la farmacología. En la terapéutica farmacológica "clásica", uno de los principios fundamentales para la dosificación de los medicamentos (posología) ha sido el intentar mantener "niveles terapéuticos constantes" en el organismo. De acuerdo con este "principio farmacológico", los estudios farmacocinéticos para caracterizar las vías de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de una droga, han sido utilizados para calcular la frecuencia de administración del fármaco, intentando mantener "niveles séricos constantes" dentro del rango terapéutico, lo que se denomina: estado estacionario (ver figura 6). Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, la mayoría de las funciones corporales

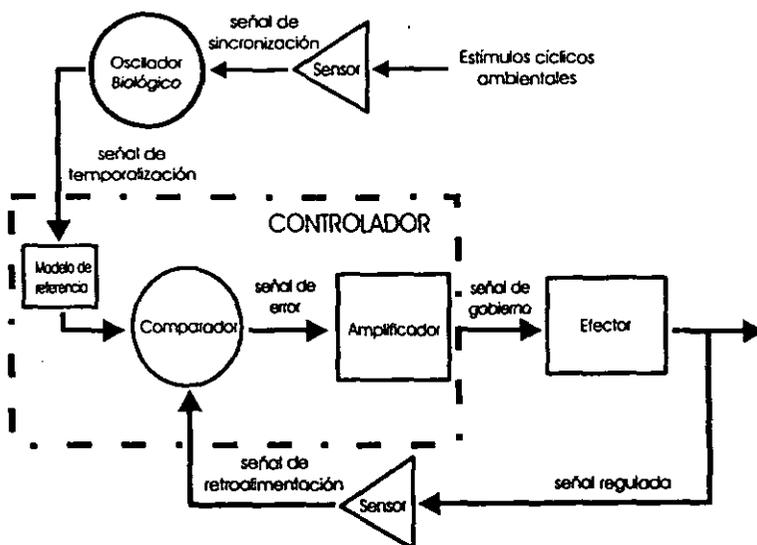


Figura 5.- El sistema cronostático contiene osciladores que se encargan de la medición del tiempo biológico. Estos a su vez cuentan con sensores para la sincronización y con vías de salida para modificar el modelo de referencia de los procesos fisiológicos en función del tiempo (Modificado de Aguilar-Roblero y cols. 1997).

presentan variaciones diurnas (en medicina se les ha denominado “nictamerales”). A la fecha, se han caracterizado ampliamente las variaciones en el metabolismo y la circulación del hígado, así como en la filtración glomerular, el volumen y pH de la orina, la presión sanguínea, la frecuencia cardíaca y la tasa de perfusión de los órganos, la secreción del tracto gastrointestinal y el tiempo de vaciamiento gástrico (Lemmer 1995; Reinberg 1992). La variación de estos factores puede influir sobre los parámetros farmacocinéticos, como son: la absorción de la droga, su distribución, su metabolismo y la eliminación renal. Más aún, más importantes que las variaciones farmacocinéticas, serían las variaciones a lo largo del día que pudiera tener el efecto producido por un fármaco (farmacodinamia). Pese a todo lo anterior, generalmente la eficacia terapéutica y los efectos colaterales de un medicamento, son evaluados experimentalmente en un solo momento del día, y no se explora si los efectos producidos por el medicamento pudiesen tener variaciones

dependientes de la hora de administración. De acuerdo con esta línea de pensamiento, la industria farmacéutica ha financiado múltiples investigaciones intentando conseguir aplicaciones de medicamentos que, mediante una liberación constante, presenten niveles constantes y una mayor duración en el individuo, basándose en la lógica de la homeostasia y la necesidad de los niveles constantes (Figura 6; Benet y cols. 1991).

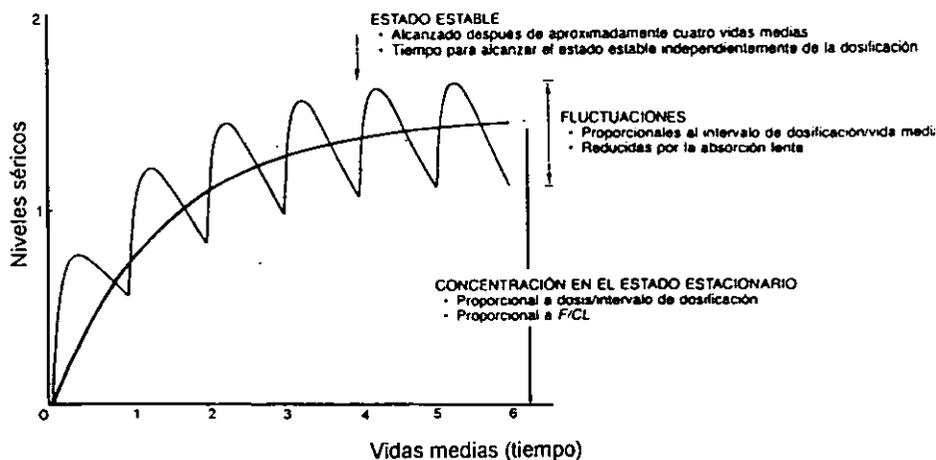


Figura 6.- Representación gráfica de las relaciones farmacocinéticas fundamentales para la administración repetida de medicamentos. De acuerdo con esta hipótesis, para alcanzar el estado estable la administración debe repetirse en un tiempo semejante a la vida media de eliminación (Modificada de Benet y cols. 1991).

La optimización de un tratamiento adecuándolo a las variaciones circadianas de los parámetros fisiológicos en los que incide, recibe el nombre de cronoterapia (Reinberg 1992; Golombeck 1993). Actualmente existen múltiples evidencias que muestran que los efectos de una droga varían en función del tiempo biológico de su administración (Halberg y cols. 1959; Scheving y cols. 1974; Pauly y Scheving 1964; Reinberg y Smolensky 1993; Lemmer 1995). Quizá el campo más estudiado a este respecto, sea la terapéutica anticancerosa. La escuela de Franz Halberg ha demostrado que es posible incrementar la eficacia de una droga y al mismo tiempo disminuir los efectos indeseables de ésta, mediante su administración dirigida a atacar el problema y no al paciente (Cornélissen y cols. 1993).

Implicaciones en psiquiatría

En psiquiatría se han caracterizado una serie de trastornos en los que se han encontrado variaciones rítmicas. Los criterios diagnósticos psiquiátricos (DSM-IV) contienen un "Trastorno del ritmo circadiano" (F51.2 - 307.45), en donde se presenta un patrón de sueño desestructurado que obedece a una mala sincronización entre el sistema circadiano endógeno de sueño-vigilia del individuo, con las exigencias exógenas de espaciamiento y duración del sueño. En este diagnóstico hay cuatro sub-diagnósticos: sueño retrasado, jet-lag, cambios de turno de trabajo, y no especificado.

Otros casos en los que se encuentran variaciones rítmicas son los trastornos del estado de ánimo (DSM-IV), en los que es posible especificar un patrón estacional para los episodios depresivos mayores en el trastorno bipolar I, en el trastorno bipolar II o en el trastorno depresivo mayor recidivante (DSM-IV: 296.x del 0 al 7; los números accesorios se asignan dependiendo de las características clínicas de cada paciente). La depresión bipolar también ha sido estudiada en cuanto a la frecuencia con la que se presentan las variaciones de depresión a manía, además de una serie de parámetros fisiológicos. Este tipo de depresión está asociado a cambios en los parámetros de sueño y la actividad locomotora. Existe la hipótesis de que la depresión bipolar se encuentra asociada con trastornos en los ciclos circadianos del individuo (Gillin y Borbely 1985).

Por otro lado, varios autores han propuesto la existencia de una "depresión de invierno" (Czeisler y cols. 1987; etc.). Este trastorno es más frecuente en latitudes muy al norte, por lo que se ha asociado con la disminución de la cantidad de luz en las estaciones invernales. De este modo, uno de los tratamientos que han demostrado su eficacia en este trastorno es la fototerapia, que consiste en la aplicación de luz de alta intensidad a los pacientes, con lo que se obtiene una mejoría de los síntomas depresivos.

En psiquiatría se ha explorado poco la cronoterapia, salvo el caso de los niños con trastorno de atención por hiperactividad ("*hipercinesia*"), en los que el tratamiento basándose en psico-estimulantes (metilfenidato) debe administrarse por la mañana, de otro modo estos medicamentos no ayudarán a controlar a estos niños sino que se produce el efecto contrario (Uriarte, 1988; Kaplan y Sadock 1991). En la terapéutica medicamentosa

psiquiátrica, se ha favorecido el uso de medicamentos "de depósito", los cuales son inyectados aproximadamente cada mes; este tipo de medicamentos están diseñados para el mantenimiento de niveles terapéuticos constantes. Sin embargo, con el tratamiento utilizando fármacos antipsicóticos, a pesar de mantener niveles circulantes muy bajos, los síntomas colaterales (extrapiramidales) son frecuentemente de mayor severidad que con cualquier otro tipo de administración-dosificación. Como veremos más adelante, las variaciones circadianas de los receptores dopaminérgicos en el caso de la esquizofrenia, pueden modificar los efectos tanto terapéuticos como colaterales de los fármacos antipsicóticos.

Ritmos circadianos en la neurotransmisión

Los sistemas de neurotransmisión juegan un papel importante en las variaciones circadianas anteriormente descritas. Se encuentra ampliamente documentada la participación de los neurotransmisores en la transmisión de información de una célula a otra (Schwartz 1985). El fenómeno de comunicación celular también presenta variaciones rítmicas (Wirz-Justice 1986), lo que brinda la posibilidad de estudiar no solamente la caracterización de los ritmos biológicos en los sistemas de neurotransmisión conocidos, sino el posible papel que tienen en un contexto biológico (adaptación), así como en el comportamiento de animales individuales.

Las variaciones circadianas de los sistemas de neurotransmisión pueden ocurrir a varios niveles como el metabolismo (biosíntesis y degradación), la liberación hacia el espacio sináptico, los receptores y los mecanismos asociados de transducción que median la recepción de la señal en la célula blanco. En relación con la dopamina, se revisarán someramente los aspectos neuroquímicos más importantes para este trabajo.

Dopamina en el sistema nervioso.

Catecolaminas.

El término catecolaminas deriva de la estructura molecular. Estos compuestos están formados por un anillo dihidroxifenilo (catecol) al que se acopla una cadena con un radical amino. La familia de las catecolaminas está compuesta por la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina. La dopamina es la catecolamina más abundante en el cerebro; cerca del 80 % de las células catecolaminérgicas contienen dopamina, menos de 20 % son noradrenérgicas, y un porcentaje mínimo son adrenérgicas (McGeer y cols. 1987).

Las células dopaminérgicas han sido ampliamente estudiadas. Sin embargo, forman sólo una pequeña parte de la población neuronal en el cerebro; se calcula la existencia de cerca de 50,000 en el cerebro de la rata y no más de 2 millones en el cerebro del humano. Estas células presentan una marcada divergencia axonal; cada célula tiene aproximadamente 500,000 botones sinápticos en el estriado de rata, aumentando este número en el humano hasta 5 millones, aproximadamente (McGeer y cols. 1987).

Dopamina

La dopamina se conoce desde los experimentos de Holtz (1939), quien la aisló como un elemento biológico activo. Sin embargo, como la dopamina y la noradrenalina participan en la vía biosintética de la adrenalina, fueron consideradas solamente metabolitos intermediarios en la síntesis de esta última (Figura 7; Blaschko, 1939). La evidencia para la aceptación de la dopamina como un agente activo fue aportada por Carlsson y su grupo (1959), quienes encontraron una distribución diferencial, con concentraciones mayores de dopamina en el cuerpo estriado que en el resto del cerebro. Por otro lado, el tratamiento con reserpina

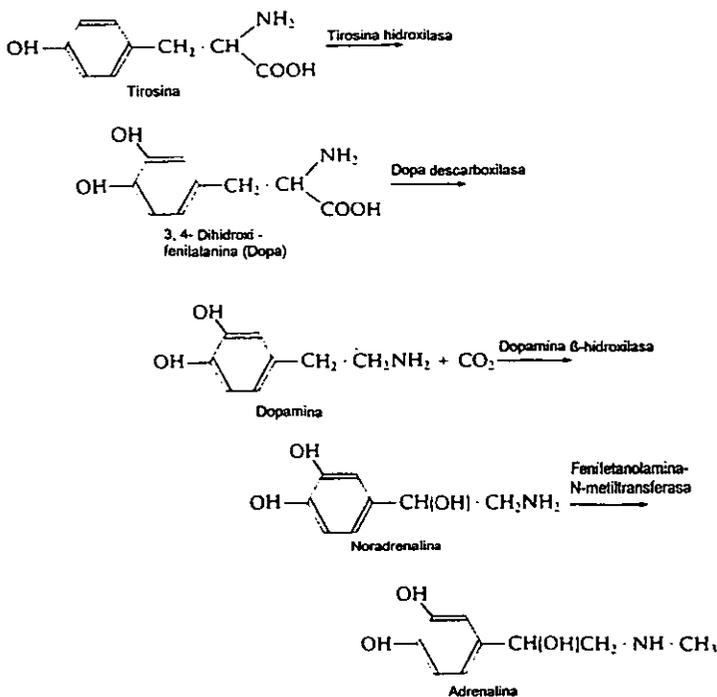


Figura 7.- Metabolismo de las catecolaminas. La vía biosintética de las catecolaminas inicia con el aminoácido tirosina, interviniendo la enzima tirosina hidroxilasa, junto con el cofactor tetrahidrobiopterina que interviene como donador de átomos de hidrógeno. Esta enzima es el paso limitante para la síntesis de catecolaminas, de modo tal que las variaciones en la concentración de tirosina en la sangre no se reflejan en las concentraciones catecolaminérgicas en el cerebro. Sin embargo, la administración parenteral del metabolito siguiente en la vía, la L-dopa, incrementa drásticamente los niveles de catecolaminas.

produce efectos conductuales semejantes a los de la enfermedad de Parkinson; como la reserpina produce una disminución de los niveles de catecolaminas en el estriado, Carlsson (1959) infirió la participación de la dopamina en las funciones extrapiramidales (McGeer y cols. 1987). Esta hipótesis fue confirmada por Birkmayer y Hornykiewicz (1961) quienes encontraron niveles disminuidos de dopamina en los ganglios basales de cerebros obtenidos por autopsia de sujetos con enfermedad de Parkinson.

Con el advenimiento de la técnica para estudiar los receptores mediante su interacción con ligandos radiactivos, se encontró que los fármacos capaces de mejorar los síntomas psicóticos comparten como mecanismo de acción el antagonizar a los receptores dopaminérgicos del subtipo D₂, lo que dio origen a la teoría dopaminérgica de la esquizofrenia (ver más adelante). Este antagonismo dopaminérgico D₂ también es responsable de los efectos colaterales de estos fármacos, siendo los más frecuentes los síntomas extrapiramidales tipo enfermedad de Parkinson, también conocidos como parkinsonismo medicamentoso. Sin embargo, el efecto antipsicótico no parece depender del efecto parkinsoniano, debido a que el tratamiento para disminuir el efecto parkinsoniano (drogas anticolinérgicas) no disminuye el efecto antipsicótico (Snyder, 1976; Kaplan y Sadock 1991; Uriarte 1988). Por toda la evidencia acumulada a la fecha, se sabe que el efecto parkinsoniano es generado por el bloqueo dopaminérgico D₂ en el sistema nigro-estriatal. Sin embargo, el efecto antipsicótico, aunque comparta este mismo mecanismo de acción, aún no tiene una localización neural demostrada.

La teoría dopaminérgica de la esquizofrenia ha sido propuesta con base en el mecanismo de acción de los fármacos antipsicóticos. Sin embargo, existen otros datos que apuntalan esta teoría: los fármacos que incrementan la transmisión dopaminérgica (como la L-dopa, las anfetaminas, y el metilfenidato) pueden producir reacciones psicóticas dosis-dependientes (Griffith y cols. 1972; Janowsky y cols. 1973; Snyder 1976; Feldman y cols. 1997), que puede ser revertida por los fármacos antipsicóticos (Snyder, 1976; Kaplan y Sadock, 1991).

Relaciones anatómicas dopaminérgicas

Los sistemas dopaminérgicos se han descrito detalladamente (Tabla I), sin embargo, se aceptan tres vías dopaminérgicas principales: la nigro-estriatal, la tubero-infundibular y la mesolímbico-cortical (figura 8).

Tabla I. Distribución anatómica de los sistemas dopaminérgicos (según Bjorklund y Lindvall, 1984).

Sistema	Origen de las células	Proyección
Sistema mesoestriatal	Substancia nigra (A9), área ventral-tegmental (A10), núcleo retrorubral (A8).	Núcleos caudado-putamen, glóbulus pallidus y n. accumbens
Sistema mesocortical	Área ventral-tegmental, substancia nigra, núcleo retrorubral	Áreas corticales y límbicas del cerebro anterior (detalles en tabla II).
Sistema mesodiencefálico	Substancia nigra, área ventral-tegmental	Núcleos subtalámicos, habenula lateral
Sistema mesopontino	Substancia nigra, área ventral-tegmental	Locus ceruleus
Sistema diencefálico	Hipotálamo dorsal y posterior, zona incerta, y tálamo caudal	Médula espinal
Sistema periventricular	Substancia gris periacueductal mesencefálica y caudal-talámica(A11)	Substancia gris periacueductal, hipotálamo y tálamo medial
Sistema incerto-hipotalámico	Zona incerta, hipotálamo periventricular (A11, A13, A14)	Zona incerta, hipotálamo anterior, medio, preóptico y periventricular, septum
Sistema tubero-hipofisario	Núcleos hipotalámicos arcuato y periventricular (A12, A14)	Eminencia media, pars nervosa y pars intermedia de la pituitaria
Neuronas dopaminérgicas periglomerulares	Bulbo olfatorio (A15)	Procesos dendríticos en los glomérulos olfatorios
Sistema retinal dopaminérgico	Principalmente en la capa interna de la retina	Proyecciones dendríticas locales

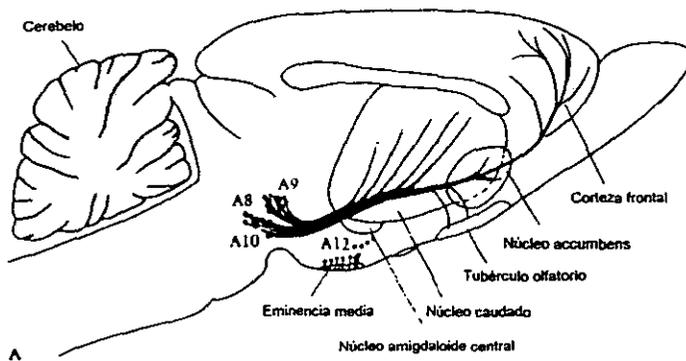


Figura 8 - Esquema de las principales vías dopaminérgicas. Las células de origen se localizan en el mesencéfalo, en las regiones A8, A9 y A10, ubicadas en la sustancia negra y áreas vecinales. El dibujo muestra la abundante proyección hacia los núcleos caudado, accumbens, amigdaloides centrales, el tubérculo olfatorio y la corteza frontal. En la parte ventral se esquematizan vías hacia la eminencia media (Bradford, 1986).

Fisiología de los sistemas dopaminérgicos.

Los aspectos fisiológicos dopaminérgicos más conocidos han sido estudiados fundamentalmente en el estriado. En esta estructura, la pérdida de vías aferentes dopaminérgicas, produce los síntomas característicos de la enfermedad de Parkinson, derivados del aumento del tono muscular (rigidez) y la dificultad para la iniciación del movimiento (acinesia).

Las funciones del sistema mesolímbico-mesocortical no han sido completamente caracterizadas en términos fisiológicos. Se presume que participan en procesos afectivos, así como en la organización del pensamiento en los humanos. Este sistema ha sido implicado en diversas conductas como: estereotipias, auto-estimulación, y conductas de consumo como alimentación e ingesta de líquidos. Se ha propuesto que este sistema se encuentre involucrado en la fisiopatología de la esquizofrenia, aunque la evidencia experimental aún no sea definitiva (McGeer y cols. 1987; Kaplan y Sadock 1991).

El sistema tubero-infundibular participa en el acoplamiento del hipotálamo con la hipófisis. Las neuronas dopaminérgicas de la base del hipotálamo envían proyecciones a

todas las partes de la eminencia media, al lóbulo neural y a la pars intermedia de la pituitaria (Lindvall y Björklund, 1983). Las terminales se encuentran en la cercanía de los vasos portahipofisarios. Se presume que la dopamina ejerce su efecto en la hipófisis gracias a la distribución de la circulación portal. La estimulación dopaminérgica inhibe la secreción de prolactina, estimula la secreción de la hormona de crecimiento, inhibe la liberación de la hormona estimulante de los melanocitos, y puede tener un efecto inhibitorio en la liberación de gonadotropinas (con la posibilidad de inhibir la ovulación). Tanto la prolactina como la hormona estimulante de los melanocitos ejercen un control por retroalimentación sobre las neuronas dopaminérgicas tuberales. Otras neuronas diencefálicas dopaminérgicas, pueden facilitar el reflejo para la liberación de oxitocina y modular la liberación de vasopresina (Moos y Richard, 1982). Más recientemente, se ha estudiado la participación en la conducta sexual en ratas macho, en las que el efecto antidopaminérgico en la región supraóptica hipotalámica inhibe la respuesta sexual del macho ante el estímulo de una hembra (Hull 1995).

Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra presentan un patrón de actividad que puede ser de espigas únicas con frecuencia de 4 a 6 Hz. La otra forma de actividad celular es en salvas de 3 a 10 potenciales de acción por salva, que disminuyen en amplitud e incrementan los intervalos inter-espigas conforme progresan. La aplicación de dopamina o agonistas dopaminérgicos en la vecindad de las neuronas de la sustancia nigra, produce una supresión de la actividad de estas células, mientras que la aplicación de antagonistas aumenta la tasa de disparo de estas células (Chiodo, 1983; Graybiel 1990).

Receptores dopaminérgicos

Los receptores dopaminérgicos pudieron ser estudiados cuando se encontró que la dopamina aumentaba la síntesis de AMP cíclico (Kebabian y cols. 1972). Este primer bioensayo, permitió además caracterizar que en distintas regiones cerebrales la dopamina no solamente no estimula, sino que inhibe la síntesis de AMP cíclico. Estos resultados sugirieron la existencia de dos tipos de receptores dopaminérgicos.

Los receptores dopaminérgicos fueron plenamente caracterizados cuando se pudo disponer de ligandos radiactivos (Seeman 1980). El radio-ligando empleado inicialmente para la caracterización de los receptores dopaminérgicos D_2 , fue el [^3H]-haloperidol, puesto que era la molécula conocida en la década de los sesenta con mayor afinidad por estos receptores (Burt y cols. 1976; Seeman 1980). Posteriormente, se han empleado tanto el [^3H]-espiroperidol como el [^3H]-sulpiride.

Nomenclatura de los receptores dopaminérgicos:

Los receptores dopaminérgicos fueron inicialmente denominados como α - y β -dopaminérgicos, sin embargo, por la confusión que hubo con los receptores adrenérgicos, se prefirió clasificar los receptores dopaminérgicos en dos subtipos: D_1 y D_2 (Kebabian y Calne, 1970). Los receptores D_1 fueron los que aumentaban la actividad de la adenilato-ciclasa; los receptores D_2 fueron caracterizados a partir del efecto inhibitorio sobre la actividad de esta misma enzima, en regiones diferentes del cerebro (Kebabian y cols. 1972).

Conforme se fueron sintetizando nuevas moléculas que interactuaban con estos receptores, se fueron encontrando combinaciones de fármacos que definieron diferentes subtipos de receptores, lo que hizo más compleja dicha clasificación. La implementación de métodos de biología molecular ha permitido recientemente clonar los genes que codifican para los receptores dopaminérgicos, con lo que se ha obtenido evidencia fehaciente de que los receptores dopaminérgicos derivan de la divergencia de dos familias de genes, divididos en tipos D_1 y D_2 . Los genes del tipo D_1 no contienen intrones en las regiones codificadoras de proteína, mientras que los genes del tipo D_2 si los tienen. Más aún, varios de los intrones

en los genes tipo D₂ están localizados en posiciones similares (Grandy y cols. 1989).

Los receptores dopaminérgicos son proteínas transmembranales, acopladas con el sistema de proteínas G. Presentan 7 dominios putativos transmembranales, con el extremo amino-terminal hacia afuera de la célula, y el extremo carboxilo-terminal hacia el interior. Los siete dominios transmembranales deben formar un orificio hidrofóbico, flanqueado por las tres asas extracelulares y las tres intracelulares (Dohlman y cols. 1991).

Actualmente, los receptores dopaminérgicos se clasifican en dos grandes familias dependiendo de su efecto sobre la adenilato-ciclasa; de este modo, la familia de receptores dopaminérgicos D₁, comprende a los receptores D₁ y D₅, los cuales al ser estimulados por agonistas estimulan la producción de AMP cíclico, mientras que la familia de los receptores D₂ comprende a los receptores D₂, D₃ y D₄, los cuales inhiben la producción de AMP cíclico (Tabla II). Además, en el caso de los receptores D₂, se conocen dos isoformas, que parecen depender de una serie de modificaciones post-transcripcionales, que regulan la longitud de la cadena de aminoácidos del asa intracelular cercana al extremo amino-terminal. Estos son los receptores D₂ de asa larga (D_{2long}) y D₂ de asa corta (D_{2short}).

Tabla II: Localización cromosómica de los genes de los receptores dopaminérgicos.

Receptor	Localización genómica
D ₁	gene DRD1 en el cromosoma 5q35.1 (Sunahara y cols. 1990).
D ₂	gene DRD2 en el cromosoma: 11q23 (Grandy y cols. 1989).
D ₃	gene DRD3 en el cromosoma 3q13.3 (Giros y cols. 1990).
D ₄	gene DRD4 en el cromosoma 11p15 (Gelernter y cols. 1992).
D ₅	gene DRD5 en el cromosoma 4p15.1-p15.3 (Eubanks y cols. 1992).

Mecanismos de acción conocidos

Los receptores dopaminérgicos interactúan directamente con el sistema de proteínas G de la membrana, como mecanismo transductor de la señal hacia el interior de las células. El reconocimiento de ligandos dopaminérgicos debe involucrar al centro hidrofóbico. Esta propuesta está reforzada por el alto grado de identidad secuencial que se encuentra en los dominios hidrofóbicos. Entre todos los receptores dopaminérgicos, se ha encontrado un 31 % de secuencias idénticas de aminoácidos, lo que aumenta a 75 % y 52 % si se dividen en tipo D₁ y tipo D₂, respectivamente.

En cuanto al mecanismo de unión de la dopamina al receptor, se han desarrollado modelos moleculares que indican que los residuos cargados de las α -hélices ven hacia la parte interior del espacio hidrofóbico. Un aspartato en la cadena transmembranal III y dos serinas en el dominio V, podrían interactuar con los grupos amino e hidroxilo de la dopamina, respectivamente (Gringrich y Caron, 1993).

Distribución de los receptores D₁ y D₂ dopaminérgicos en vías neurales específicas

Mediante técnicas de biología molecular, se encontró que el mRNA de los receptores dopaminérgicos del subtipo D₁ se expresaban preferencialmente en las neuronas estriato-nigrales, mientras que el mRNA de los receptores subtipo D₂ se expresan preferencialmente en las neuronas estriato-palidales (Keefe y Gerfen, 1995; Gerfen 1992; Gerfen y cols. 1990; LeMoine y cols. 1991; LeMoine 1990). La evidencia que apoya esta distribución de los receptores dopaminérgicos, está reforzada por el hecho de que la lesión de la vía nigro-estriatal con 6 OH-dopamina, resulta en un incremento en la expresión de encefalina y receptores D₂, que se consideran marcadores de la vía estriato-palidal, mientras que la substancia P, la dinorfina y los receptores D₁, considerados marcadores de la vía estriato-nigral, disminuyen. Estas alteraciones en la expresión genética inducidas por la lesión, son revertidas mediante el tratamiento con agonistas D₂ en el caso de las encefalinas y los

mRNA de los receptores D_2 , y son revertidas en el caso de la sustancia P, la dinorfina y los receptores D_1 , mediante el tratamiento con agonistas D_1 (Keefe y Gerfen, 1995).

Cuadro II .- Características del pegado de los [3 H]-ligandos a los receptores D_2 .

a) Saturabilidad.

Los radio-ligandos se unen a los receptores en forma saturable, lo que permite calcular las constantes de disociación (K_d) y el pegado máximo (B_{max}).

b) Estereo-selectividad.

Resulta de poder distinguir entre el pegado específico a los receptores, del pegado inespecífico del radio-ligando. En el caso de los neurolépticos, los enantiómeros (+) y (-) del butaclamol han sido definitivos para separar la unión inespecífica (hidrofóbica) del pegado estereo-específico a los receptores D_2 dopaminérgicos.

c) Localización regional.

El pegado de radio-ligandos es distinto en diferentes regiones cerebrales, lo que sugiere que la dopamina tiene funciones de neurotransmisor en vías específicas.

d) Perfil farmacológico.

Para que el pegado de un [3 H]-ligando pueda ser denominado "dopaminérgico", resulta esencial que el ligando endógeno más efectivo para el desplazamiento del [3 H]-ligando sea la dopamina en ensayos de desplazamiento.

e) Correlación entre los diferentes neurolépticos.

Para que una proteína especializada en la interacción ligando-receptor pueda ser denominada como un "receptor", es deseable que tenga correlación con alguna función biológica. En el caso de los receptores dopaminérgicos, Seeman (1980) relaciona los valores IC_{50} de los neurolépticos para el desplazamiento del [3 H]-haloperidol de los receptores dopaminérgicos, con las dosis clínicas del mismo compuesto con que han reportado el efecto antipsicótico.

f) Concentraciones absolutas apropiadas para los valores de IC_{50} .

En adición a la correlación significativa entre los sitios de unión con alguna función biológica, es deseable que las concentraciones absolutas de los valores de IC_{50} para los agonistas y los antagonistas sean apropiadas. Por ejemplo, en el caso de los receptores D_2 marcados con [3 H]-haloperidol, los valores de IC_{50} para todos los neurolépticos estudiados presentaron valores absolutos que corresponden con los detectados en el suero de los pacientes en tratamiento con los mismos neurolépticos (figura 9).

g) Efecto de la estimulación de los receptores dopaminérgicos

La respuesta a la aplicación directa de dopamina a las neuronas o en células que espontáneamente presentan potenciales de acción, puede producir el bloqueo de los potenciales, o causar excitación, o ambos. La estimulación de somas neuronales en la sustancia nigra produce una respuesta en las neuronas del caudado que consiste en un incremento del disparo en pocos milisegundos (Gerfen, 1992), la cual no parece ser dopaminérgica en primera instancia debido a que los impulsos ocurren muy rápidamente después de la estimulación. Posteriormente, las células del caudado permanecen eléctricamente inhibidas durante varios cientos de milisegundos. Esta inhibición puede ser debida a un "prolongado potencial post-sináptico inhibitorio (IPSP), o simplemente a la generación de un bloqueo en la despolarización. (Gallager y cols. 1980)

La manipulación de los receptores D₁ y D₂ pueden afectar el funcionamiento de los sistemas estriato-palidal o estriato-nigral en ratas neurológicamente intactas. La administración aguda de agonistas dopaminérgicos inespecíficos produce un aumento en la expresión de los genes tempranos predominantemente en las neuronas estriato-nigrales (Berreta y cols. 1992; Cenci y cols. 1992; Cole y cols. 1992; Steiner y Gerfen 1993). Este aumento de la expresión génica inducido por agonistas, puede ser bloqueado por la administración de antagonistas del receptor D₁, lo que sugiere que la estimulación de los receptores D₁ aumenta el funcionamiento del sistema estriato-nigral. A la inversa, el bloqueo de los receptores D₂ produce un incremento en la expresión de los genes tempranos del estriado, principalmente en las neuronas estriado-palidales, lo que es consistente con la supresión mediada por los receptores D₂ del funcionamiento neuronal estriato-palidal (Dragunow y cols. 1990; Robertson y cols. 1992). Estos datos del estudio de la expresión génica, sugieren que la estimulación de los receptores D₁ de alguna manera aumenta el funcionamiento de las neuronas estriado-nigrales, mientras que la estimulación de los receptores D₂ suprime el funcionamiento de las neuronas estriado-palidales.

Cuadro III.-Tipo de sitios marcados por [³H]-neurolépticos

a) Sitios inespecíficos no saturables

Estos sitios se consideran los que no pueden ser inhibidos por un exceso de ligando frío, de la misma molécula que el radio-ligando (generalmente en concentraciones de 100 a 1000 nM de ligando frío).

b) Sitios inespecíficos saturables

Existe usualmente una diferencia entre el pegado inespecífico definido mediante un exceso del mismo compuesto frío que el radio-ligando, y el pegado inespecífico definido por un ligando frío diferente al radio-ligando, aunque con similitud molecular e igualmente agonista (o antagonista; en inglés: *closest congener*). En el caso ideal, ambos ligandos deberían producir un desplazamiento idéntico, sin embargo, esto raramente ocurre.

c) Sitios específicos estereo-selectivos

Se define como pegado específico la cantidad de radio-ligando que puede ser inhibida por una concentración excesiva de una molécula similar. Mediante este procedimiento, se excluyen los sitios inespecíficos saturables y no-saturables. Si la molécula similar presenta además estereoisomería, el pegado estereoselectivo será la diferencia en el pegado del [³H]-ligando en presencia del enantiómero inactivo (pegado total) menos el pegado en presencia del enantiómero activo (pegado inespecífico).

Nota: puede haber problemas si se utilizan enantiómeros agonistas para competir en el pegado al receptor con radio-ligandos antagonistas, y viceversa (antagonistas vs radio-ligandos agonistas). Se recomienda utilizar la molécula del mismo género de mayor similitud molecular (Seeman 1980).

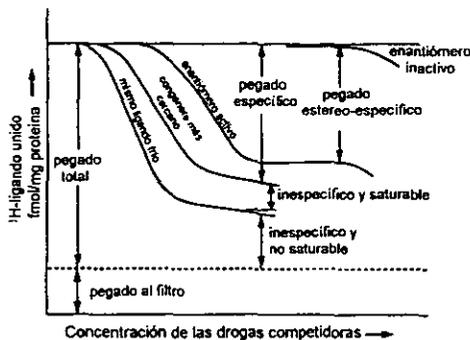


Figura 9. - Ilustración gráfica de los componentes de la unión de ^3H -ligandos al tejido. Una pequeña parte del radio-ligando se pega al filtro (generalmente Whatman GF/B). Aunque la unión total al tejido está compuesta de pegado específico e inespecífico, se consideran dos tipos de pegado inespecífico, saturable y no saturable. Al efectuar el desplazamiento por la misma molécula ("fría") que el radio-ligando, se tiene el pegado específico más un pegado inespecífico pero saturable. Se recomienda medir el pegado inespecífico incubando en presencia del congénere molecular más cercano, o preferentemente, por la diferencia entre un enantiómero activo vs. un inactivo (Modificado de Seeman 1980).

La caracterización del pegado de radioligandos a los receptores dopaminérgicos se muestra en el cuadro II. En el cuadro III se muestran el tipo de sitios susceptibles de ser marcados con radioligandos, los cuales se muestran gráficamente en la figura 9.

Ritmicidad en receptores dopaminérgicos

Diversos autores han estudiado las variaciones circadianas de los receptores de los sistemas de neurotransmisión conocidos. La tabla III muestra algunos resultados.

En el estriado de la rata, se han caracterizado las variaciones circadianas que presenta la neurotransmisión dopaminérgica, tanto en el metabolismo biosintético (Perlow y cols. 1977; Owasoyo y cols. 1979), como en la liberación del neurotransmisor (O'Neill y cols. 1982; O'Neill 1990), y la densidad de los receptores dopaminérgicos D_2 (Naber y cols. 1980; Kafka y cols. 1982).

Tabla III. Variaciones diurnas (circadianas) en varios sistemas de neurotransmisión cerebral en mamíferos (modificada de Wirz-Justice, 1986).

Radio-ligando	Tipo de receptor	Referencia
DHA	β - adrenérgico	Kafka y cols. 1986
DHA		Kraeuchi y cols. 1984
DHA		Di Lauro y cols. 1986
Prazosina	α - adrenérgico	Kafka y cols. 1986
WB-4101		Di Lauro y cols. 1986
		Wirz-Justice y cols. 1983
p-amino-clonidina		Kafka y cols. 1986
		Jhanwar-Uniyal y cols. 1986
Clonidina		Kraeuchi y cols. 1984
		Wirz-Justice y cols. 1983
QNB	Muscarínicos	Por y Bondy, 1981
Espiroperidol	D ₂ y 5-HT ₂	Di Lauro y cols. 1986
		Kafka y cols. 1982
Imipramina	5-HT	Di Lauro y cols. 1986
		Wirz-Justice y cols. 1983
		Kraeuchi y cols. 1986
Naloxona	Opiáceos	Jacobson y Wilkinson 1985
Flunitrazepam	Benzodiazepínicos	Brennan y cols. 1985

Los receptores dopaminérgicos D₂ fueron estudiados por Naber y cols. (1980) en ratas Sprague-Dawley (100 g peso inicial) que fueron mantenidas en ciclos L:O 12:12 durante 3 semanas. Un grupo de animales se utilizó para estudiar los cambios diurnos de los receptores, mientras que otro grupo recibió tratamiento con imipramina (antidepresivo tricíclico que produce cambios de fase circadiana) 10 mg/kg/día. Los animales fueron sacrificados cada 4 horas, y se disecaron los estriados para los ensayos de unión ligando-receptor. Se encontraron variaciones diurnas en el pegado de [³H]-espiroperidol, con picos a las 02:00 y las 14:00 horas. El tratamiento con imipramina produjo un retraso en el tiempo

de aparición de los picos, de las 02:00 a las 06:00 horas y de las 14:00 hacia las 18:00 horas. Estos cambios fueron altamente significativos (ANOVA, $p < 0.001$). El mantenimiento de los animales durante 3 días en condiciones de obscuridad continua no produjo cambios en el ritmo de los receptores, por lo que los autores sostuvieron que los cambios del receptor son circadianos. Sin embargo, la imipramina produjo un retraso de fase con respecto al ritmo en los animales sin imipramina, lo que apoya el hecho conocido de que la imipramina produce cambios en los ritmos circadianos de los receptores cerebrales estudiados.

El grupo de Kafka y cols. (1982) y el de Wirz-Justice y cols. (1982), estudiaron las variaciones diurnas de varios receptores cerebrales: alfa-adrenérgicos ($[^3\text{H}]$ WB4101); beta-adrenérgicos ($[^3\text{H}]$ DHA); muscarínicos ($[^3\text{H}]$ QNB); benzodiazepínicos ($[^3\text{H}]$ diazepam); opiáceos ($[^3\text{H}]$ naloxona); y dopaminérgicos D_2 ($[^3\text{H}]$ espiroperidol). El ensayo de unión de los radio-ligandos lo hicieron en ratas Long-Evans, encontrando variaciones diurnas en todos los receptores estudiados. Un grupo de animales recibió clorgiclina (inhibidor de la MAO tipo A; bloquea preferentemente la desaminación de noradrenalina y serotonina), 4 mg/kg/día/14 días en un implante subcutáneo (bombas Alzet). Encontraron que el tratamiento con clorgiclina disminuyó la unión a los receptores adrenérgicos. También se encontró que la clorgiclina produce una disminución marcada de la unión de ligandos a los receptores dopaminérgicos y benzodiazepínicos, mientras que produjo un incremento en el pegado a los receptores colinérgicos en todas las horas estudiadas. Los autores discutieron la posibilidad de que el efecto de la clorgiclina sea en el núcleo supraquiasmático, debido a que este fármaco modifica la frecuencia de los ritmos circadianos.

Catalepsia y síndrome extrapiramidal

Desde el uso de la reserpina como antipsicótico, se sabe que la disminución de la neurotransmisión dopaminérgica, ya sea por la disminución de la liberación de dopamina (como la reserpina), o por la administración de antagonistas de los receptores D_2 (neurolépticos), se produce un aumento del tono muscular, lo que se manifiesta como rigidez muscular y dificultad para el movimiento (Hoffman y Donovan, 1995); esto se puede manifestar como Parkinsonismo (en humanos) o catalepsia (tanto en humanos como en otros animales; p. ej.: la rata). La catalepsia ha sido definida como la incapacidad de un animal -

generalmente roedores- para corregir una postura inusual impuesta (Sanberg y cols. 1988; Hoffman y Donovan, 1995). Esta conducta ha sido considerada como un modelo capaz de predecir los efectos colaterales extrapiramidales del tratamiento antipsicótico en humanos (Costall y Naylor, 1973; Arnt 1982; Hoffman y Donovan 1995). Más aún, Lorenc-Koci y cols. (1996) estudiaron mecanomiográficamente la modificación del tono muscular inducida por haloperidol en ratas; estos autores encontraron que el haloperidol produce incrementos dosis-dependientes, tanto del tono muscular como en la resistencia a los movimientos pasivos. Estos resultados les permitió suponer que la catalepsia es un buen modelo de la rigidez parkinsoniana.

Más aún, de manera semejante al fenómeno de tolerancia descrito para el uso de antipsicóticos en humanos (Duvoisin 1976), se ha descrito un fenómeno de tolerancia para el tratamiento crónico de haloperidol en roedores (Campbell y Baldessarini, 1981; Ushijima y cols. 1993).

Medición de catalepsia

La medición de catalepsia puede ser efectuada mediante varios procedimientos; los más utilizados son la prueba de la barra, que consiste en una barra de metal generalmente de 1 cm de diámetro, situada a 10 cm de altura sobre el piso de una jaula, y la prueba de la gradilla, que consiste en una reja con cuadros de 1.2 cm c/u sobre la cual se sitúa al animal en una postura extendida, la reja debe tener una inclinación que varía según el grupo de investigación. En ambos procedimientos se cuantifica el tiempo de duración del animal en una postura impuesta. La medición puede ser manual, o mediante dispositivos electrónicos para registrar los movimientos del animal. Generalmente se considera terminada la catalepsia cuando el animal quita una o las dos patas de la barra, cuando toca el suelo, o cuando corrige la posición de extensión en la gradilla (Sanberg y cols. 1988).

En relación con los ritmos biológicos, varios estudios han sugerido que las variaciones diurnas de los sistemas dopaminérgicos pudiesen regular el efecto producido por fármacos que actúen sobre los receptores dopaminérgicos. En el caso del haloperidol (bloqueador D2 dopaminérgico), Campbell y cols. (1982) reportaron variaciones temporales de catalepsia producida por haloperidol, aunque no encontraron variaciones dependientes

del tiempo en los receptores dopaminérgicos, aunque sí en la concentración cerebral de haloperidol, por lo que propusieron que las variaciones en el efecto del haloperidol dependían de factores farmacocinéticos (Campbell y cols., 1982a; 1982b). Las variaciones que reportan Campbell y cols. (1982) presentaron el mayor efecto cataléptico (pico) hacia las 16:00 horas, y el menor (valle) a las 04:00 horas.

Sin embargo, Nagayama y cols. (1979) encontraron que dependiendo de la hora de administración de haloperidol, puede producir mayor o menor efecto de sedación en la rata. Este grupo (Nagayama y cols. 1979; 1988) no encontró diferencias temporales en las concentraciones de haloperidol ni en sangre ni en el cerebro, por lo que propuso que las variaciones en el efecto del haloperidol pudiesen ser producidas por variaciones de los receptores dopaminérgicos. Resulta interesante que el mayor efecto de sedación producida por el haloperidol se haya encontrado en horas de luz, a semejanza de la catalepsia reportada por Campbell y cols. (1982).

Estudios de variaciones diurnas de sistemas dopaminérgicos en humanos.

Como se discutió anteriormente, el sistema dopaminérgico tiene una participación importante en la esquizofrenia, debido fundamentalmente a que los fármacos con efecto antipsicótico presentan un mecanismo de acción común en todos ellos: el bloqueo de los receptores dopaminérgicos D_2 (Creese y cols. 1976; Snyder 1976; Carlsson 1988; Kaplan y Sadock 1991), aunque al mismo tiempo es responsable de los efectos colaterales, consistentes en síntomas semejantes a la enfermedad de Parkinson (síntomas extrapiramidales). Sin embargo, a pesar de la evidencia de los cambios circadianos de este sistema en mamíferos, existen pocos estudios clínicos donde se hayan explorado las variaciones diurnas relacionadas con el sistema dopaminérgico.

Las variaciones diurnas de los sistemas dopaminérgicos en humanos han sido objeto de varios estudios: las concentraciones séricas del ácido homovanílico (catabolito dopaminérgico, que se consideran como un índice de liberación sináptica de dopamina), presentan variaciones diurnas tanto en sujetos sanos (Sack y cols. 1988; Dávila y cols. 1989), como en esquizofrénicos (Dávila y cols. 1989; Zumárraga y cols. 1993). Rao y su

grupo (1993) reportó un ritmo circadiano en la concentración de dopamina en la sangre tanto en individuos sanos como sujetos con esquizofrenia.

En otros estudios, Van Cautier y cols. (1991) encontraron que los individuos con esquizofrenia no tuvieron diferencias con los controles en los niveles séricos de cortisol, corticotropina, ni en la hormona de crecimiento. La diferencia se encontró en la liberación de prolactina, la cual al momento de conciliar el sueño presentaba un adelanto de fase, además de liberarse en mayor cantidad en los sujetos esquizofrénicos comparados con los controles. Se desconoce la relevancia de este efecto; sin embargo, se discutió la posible regulación de la liberación de prolactina por la vía dopaminérgica tubero-infundibular. Finalmente, Damba (1990) reportó que los sujetos esquizofrénicos presentaron dos picos de actividad tanto conductual, como verbal a las 10 y las 16 horas.

El efecto de la variación circadiana de los sistemas dopaminérgicos parece ser importante en el tratamiento antiparkinsoniano. La administración de L-dopa en sujetos con enfermedad de Parkinson produce mejores efectos por la mañana, mientras que por la noche su administración brinda poco beneficio a estos sujetos (Piccini y cols. 1991).

En la década de los sesenta, dos grupos independientes, Peterson y Olson (1963) y DiMasio y Shader (1969), encontraron que en el tratamiento de pacientes psicóticos hospitalizados, la administración nocturna del antipsicótico clorpromazina producía menos síntomas extrapiramidales que su administración en dosis repartidas en el día, aunque con ambos esquemas de dosificación el efecto antipsicótico era similar. En otro estudio, Uriarte y Rütger (1976) encontraron que el haloperidol administrado por la noche producía menos síntomas extrapiramidales que su administración mediante dosis repartidas; ambos esquemas de tratamiento produjeron un efecto antipsicótico semejante. Sin embargo, el grupo de Hruska y cols. (1966) no encontró las diferencias del efecto temporal de la administración de este fármaco.

Estudios clínicos preliminares

Los estudios clínicos preliminares fueron realizados en el Hospital Psiquiátrico "Fray Bernardino Alvarez". Como antecedente, en una valoración inicial de expedientes clínicos,

se había encontrado que la mejor respuesta antipsicótica se obtenía con la utilización de los medicamentos antipsicóticos perfenazina o haloperidol en el tratamiento de pacientes esquizofrénicos (Quirasco y cols. 1990). Como el haloperidol era el antipsicótico de mayor uso, se decidió buscar en los expedientes clínicos evidencias que sugirieran la dosis óptima de este neuroléptico, intentando establecer una correlación entre la dosis de haloperidol y la respuesta al tratamiento. El criterio para considerar la respuesta fue el tiempo de internamiento necesario para que los pacientes obtuvieran el alta por mejoría.

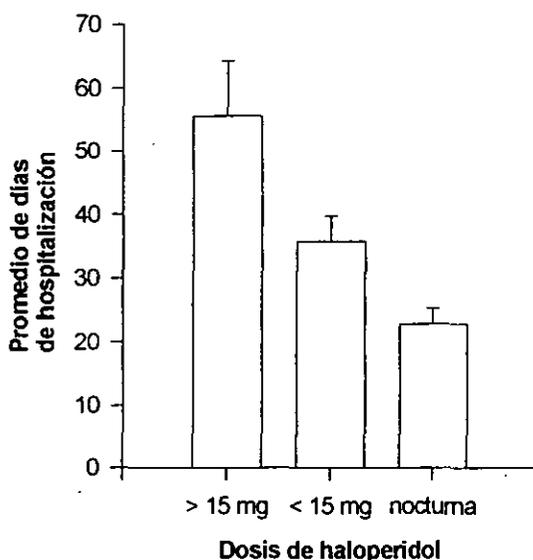


Figura 10. Días de hospitalización relacionadas con la dosis de haloperidol. Todos los pacientes que recibieron más de 15 mg/día de haloperidol ($n = 22$), tomaron el medicamento en dosis repartidas a lo largo del día. Los que tomaron menos de 15 mg/día en dosis repartidas ($n = 15$) se representan como: < 15 mg; mientras que los que recibieron el haloperidol en una sola toma por la noche se representan como: nocturna ($n = 14$). La diferencia fue significativa (Kruskal-Wallis: $H = 14.2$; g.l. = 2; $p < 0.001$). Las barras representan el error estándar (modificado de Torner y cols. 1995).

Se encontró que en los pacientes tratados con haloperidol en dosis mayores de 15 mg/día, tuvieron estancias de internamiento en promedio de 55.57 +/- 8.69 días. Los

esquizofrénicos tratados con dosis bajas fueron divididos en dos subgrupos, dependiendo de la dosis con la que se les administró el haloperidol: los que recibieron el haloperidol en dosis repartidas (tomas en la mañana y en la noche) que tuvieron un promedio de 35.76 +/- 3.95 días, y los pacientes que recibieron el haloperidol en una toma por la noche, que tuvieron un promedio de 23.45 +/- 2.38 días de estancia (figura 10).

Este resultado concuerda con los reportes donde las dosis bajas de antipsicóticos producen mejores resultados que las dosis elevadas; sin embargo, en nuestro estudio no fue posible evaluar la severidad de los síntomas psicóticos, por lo tanto, estos resultados podrían deberse al tipo de dosificación del antipsicótico, o a que los pacientes tratados con dosis más altas presentaron cuadros con mayor severidad. Sin embargo, el hecho de que las dosis bajas administradas por la noche fueran las que tuvieron la respuesta antipsicótica más rápida, sugería un mecanismo de acción para el que no se tenía ninguna explicación satisfactoria en ese momento, y que contradecía al criterio farmacológico clásico de administración en dosis repartidas.

El siguiente estudio fue diseñado para tener pacientes hospitalizados por un episodio agudo de esquizofrenia, con la misma severidad en los síntomas. De este modo, se intentaría diferenciar los efectos del tratamiento con dosis bajas de haloperidol (menores a 15 mg/día), en un grupo que recibiera el tratamiento "convencional" de dosis repartidas en tres tomas al día, contra el tratamiento mediante una dosis única nocturna. Se comparó el efecto de tres tomas repartidas en el día, de 5 mg de haloperidol cada una, contra una toma nocturna de 10 mg de haloperidol.

La respuesta al tratamiento fue satisfactoria en ambos grupos (figura 11). Sin embargo, aunque la respuesta al tratamiento en los sujetos que recibieron el haloperidol por la noche fue más rápida (24.7 +/- 7.8 días) que en los sujetos que recibieron el tratamiento en dosis repartidas (34.45 +/- 6.9 días), la diferencia en la evolución de ambos tratamientos no fue significativa (figura 11).

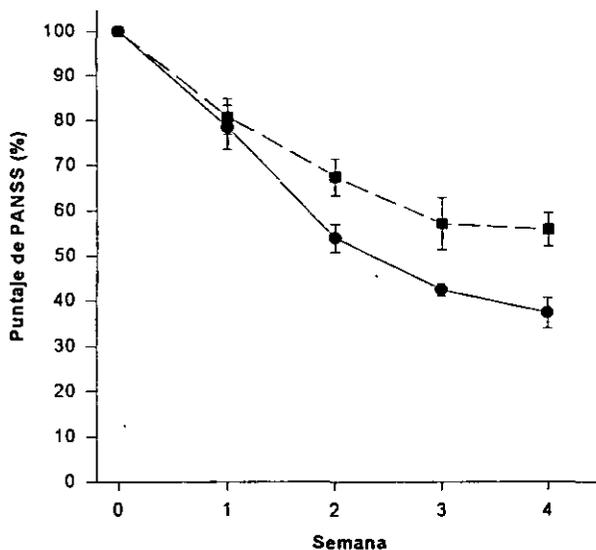


Figura 11. Evolución de los síntomas psicóticos evaluados mediante la escala de severidad PANSS (Herrera-Estrella y cols. 1993). La evolución de los síntomas compara el tratamiento nocturno a base de haloperidol (círculos) contra el tratamiento habitual de dosis repartidas (cuadros). Las evaluaciones fueron realizadas cada semana. El análisis estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas ($T = 1401$; $n = 36, 53$; $p = 0.0678$). Las barras representan el error estándar.

Respecto a los síntomas extrapiramidales producidos por el haloperidol, los sujetos tratados con dosis nocturnas tuvieron significativamente menos efectos colaterales y de menor severidad, que los tratados con dosis repartidas. Los promedios de los puntajes de los efectos extrapiramidales se muestran en la figura 12.

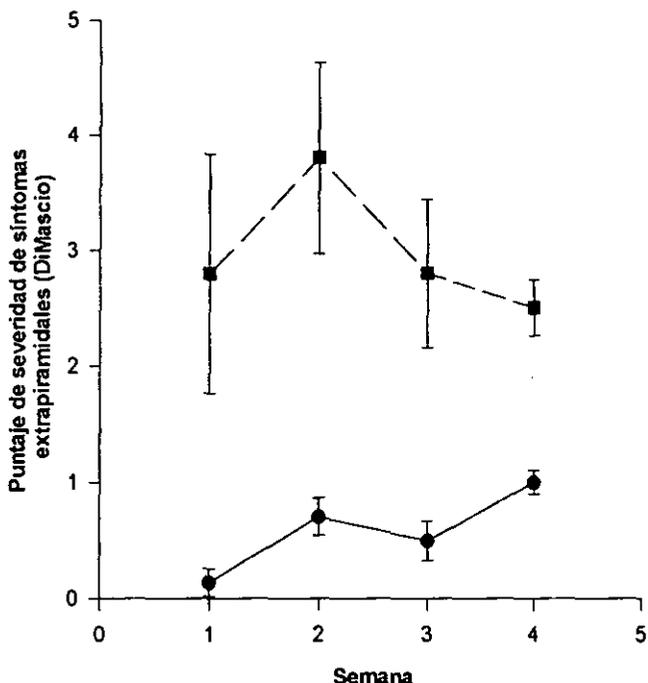


Figura 12. Evolución temporal de la severidad de los síntomas extrapiramidales producidos por el haloperidol, dependiendo de la dosis y tipo de administración. Los círculos representan las dosis nocturnas de haloperidol, mientras que los cuadros representan las dosis repartidas. La diferencia fue significativa desde la primera semana ($T = 36$; $n = 7,8$; $p < 0.05$) hasta la última ($T = 11$; $n = 4,5$; $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar.

Estos resultados sugirieron que pudiesen haber efectos temporales en la respuesta al haloperidol, sin embargo, tuvieron el problema de haber comparado dosis diferentes, por lo que solamente pueden ser tomados como resultados preliminares (Torner y cols. 1995).

Para evaluar si el horario para la toma del haloperidol modifica su efecto, se decidió estudiar únicamente la severidad de los síntomas extrapiramidales en pacientes esquizofrénicos que tomaran la misma dosis de haloperidol tres veces al día; de este modo, se comparó el efecto de la misma dosis en la misma categoría de sujetos, teniendo como única variable la hora del día para la toma del medicamento.

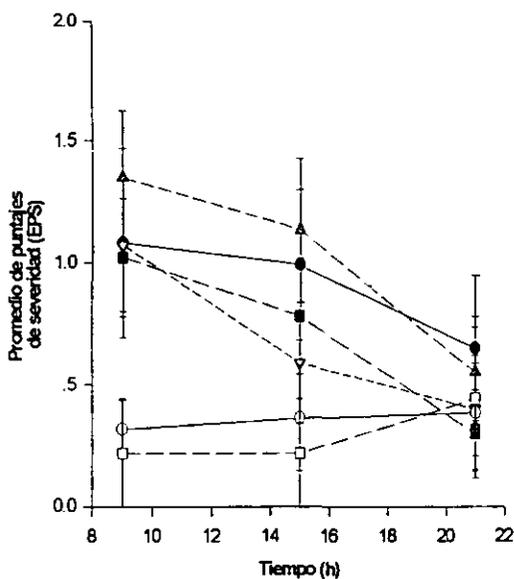


Figura 13. Variaciones dependientes del tiempo en la severidad de los síntomas extrapiramidales producidos por haloperidol. Triángulos hacia arriba: temblor; círculos oscuros: rigidez facial; cuadros oscuros: rigidez muscular; triángulos hacia abajo: marcha parkinsoniana; círculos claros: discinesia; cuadros claros: acatisia. Las diferencias se encontraron entre los síntomas de las 9:00 ($H=15.7$, g.l.=5; $p < 0.05$), y de las 15:00 horas ($H=13.1$; g.l. = 5; $p < 0.05$), los síntomas de las 21:00 horas no tuvieron diferencias significativas en su severidad ($H=1.84$; g.l.=5; $p < 0.05$; modificado de Torner y cols. enviado). Las barras representan el error estándar.

Se seleccionaron pacientes hospitalizados que hubiesen recibido tratamiento a base de 30 mg/día de haloperidol (10 mg v.o., tres veces al día). Esta dosis era mayor a las del estudio anterior, por lo que deberíamos encontrar síntomas extrapiramidales más severos (para una mejor resolución de la variación en el tiempo). Todos los síntomas extrapiramidales evaluados mostraron variaciones diurnas. La mayoría de los síntomas presentaron mayores puntajes de severidad por la mañana, y fueron disminuyendo en el transcurso del día. Sin embargo, dos síntomas: discinesia y acatisia, mostraron menor severidad por la mañana y aumentando discretamente hacia la noche (figura 13).

Estos últimos resultados mostraron claramente que existen variaciones diurnas en los efectos extrapiramidales del haloperidol, con un patrón temporal que depende del efecto o síntoma particular que se considere, lo que sugiere que las diferencias dependientes del tiempo en los sitios de acción del haloperidol, pudiesen tener un perfil temporal diferente de un sitio a otro. Por otro lado, como el efecto demostrado del haloperidol es consistentemente en los receptores dopaminérgicos, la susceptibilidad de estos receptores podría variar de una región cerebral a otra dependiendo de su localización, o del sistema dopaminérgico que participe en el efecto en cuestión.

El estudio de las diferencias en el perfil de variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos, no solamente tendría valor heurístico, sino que representa la posibilidad de seleccionar el efecto que se desee producir con la aplicación de los fármacos antipsicóticos, dependiendo de la hora del día para su administración.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el cerebro de la rata se han definido tres sistemas dopaminérgicos principales: 1) la vía nigro-estriatal, 2) la vía mesolímbico-cortical y 3) el sistema tubero-infundibular. De estos, la concentración mayor, tanto de dopamina como de receptores dopaminérgicos, se localiza en el estriado. Por este motivo, la mayoría de los estudios relacionados con las funciones de neurotransmisor de la dopamina han sido realizados en esta región cerebral. Entre estos, se han reportado variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos D_2 en el estriado de la rata (Kafka y cols. 1982). Sin embargo, hasta el momento se desconoce si estos receptores presentan variaciones diurnas en otras estructuras cerebrales, y en el caso de que las presentasen, no se sabe si el patrón de variaciones es semejante o no, entre las distintas regiones que expresan receptores dopaminérgicos D_2 .

Por otro lado, se han reportado variaciones diurnas en diferentes conductas producidas por el haloperidol (antagonista dopaminérgico D_2), como sedación (Nagayama y cols. 1979) y catalepsia (Campbell y cols. 1982). Sin embargo, hasta el momento no ha quedado demostrada la posible correlación entre las variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos y las variaciones diurnas de la conducta producida por el efecto antagónico del haloperidol sobre estos receptores.

Finalmente, el hecho de que la administración nocturna de haloperidol (y cloropromazina) a pacientes esquizofrénicos produzca menos síntomas extrapiramidales que las dosis repartidas, y sin producirse diferencias importantes en el efecto antipsicótico, permite suponer que pudiese haber diferencias dependientes del tiempo, en los receptores sobre los que actúan estos fármacos para producir el efecto colateral o el efecto terapéutico.

Por lo anterior, parece importante estudiar si los receptores dopaminérgicos D_2 presentan variaciones diurnas en diferentes regiones cerebrales, además, si las variaciones diurnas tienen ritmos similares o si el ritmo es diferente de una región cerebral a otra, y si los ritmos de los receptores dopaminérgicos modulan de alguna manera el efecto conductual producido por los fármacos que inciden directamente sobre los estos receptores.

HIPOTESIS

Con base en los antecedentes previamente descritos, se propone que:

- a) Los receptores dopaminérgicos D₂ presentan variaciones diurnas.
- b) Que dichas variaciones muestran diferente perfil temporal dependiendo de la región cerebral en estudio.
- c) Que dichas variaciones modulan por lo menos algunos de los efectos conductuales de los fármacos que actúan sobre ellos (neurolépticos).

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si los receptores dopaminérgicos tipo D₂ presentan variaciones diurnas (circadianas); caracterizar si las variaciones difieren en la hora pico (acrofase) de una región cerebral a otra, y estudiar su relevancia en la expresión funcional en la rata (conducta).

Objetivos Específicos.

1. Caracterizar las variaciones diurnas en el pegado estereoespecífico de [³H]-espiroperidol a los receptores dopaminérgicos D₂ de la corteza frontal, el estriado, el complejo amigdalino y el cerebelo.
2. Determinar si la acrofase del pegado específico de [³H]-espiroperidol a los receptores D₂ ocurre a la misma hora en las diferentes regiones cerebrales mencionadas.
3. Determinar mediante curvas de saturación si las variaciones son debidas a cambios en la afinidad (K_d) o cambios en la cantidad de receptores (B_{max}).

4. Evaluar la posible correlación funcional de las variaciones diurnas de los receptores, en los diferentes sistemas dopaminérgicos mediante su participación en la conducta producida por haloperidol.

METAS

1- Establecer las condiciones óptimas para estudiar los receptores dopaminérgicos D₂ mediante ensayos de unión ligando-receptor, utilizando como ligando al compuesto tritiado [³H]- espiroperidol.

2- Determinar el patrón de variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos D₂ mediante la medición de la interacción ligando-receptor en diferentes regiones cerebrales (estriado, corteza frontal, amígdala, cerebelo) de ratas.

3- Determinar si las variaciones ocurren por cambios en la constante de afinidad (K_d) o en el número de receptores (B_{max}) dopaminérgicos, mediante curvas de afinidad en las horas de mayor y menor pegado del ligando a los receptores, por cada región.

4- Estudiar los efectos conductuales de un antagonista de los receptores dopaminérgicos (haloperidol) inyectado en las ratas a diferentes horas (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, y 21 h). Las conductas a estudiar son: la catalepsia, la actividad locomotora, y la conducta de exploración hacia el medio ("rearing").

4. Evaluar la posible correlación funcional de las variaciones diurnas de los receptores, en los diferentes sistemas dopaminérgicos mediante su participación en la conducta producida por haloperidol.

METAS

1- Establecer las condiciones óptimas para estudiar los receptores dopaminérgicos D₂ mediante ensayos de unión ligando-receptor, utilizando como ligando al compuesto tritiado [³H]- espiroperidol.

2- Determinar el patrón de variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos D₂ mediante la medición de la interacción ligando-receptor en diferentes regiones cerebrales (estriado, corteza frontal, amígdala, cerebelo) de ratas.

3- Determinar si las variaciones ocurren por cambios en la constante de afinidad (K_d) o en el número de receptores (B_{max}) dopaminérgicos, mediante curvas de afinidad en las horas de mayor y menor pegado del ligando a los receptores, por cada región.

4- Estudiar los efectos conductuales de un antagonista de los receptores dopaminérgicos (haloperidol) inyectado en las ratas a diferentes horas (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, y 21 h). Las conductas a estudiar son: la catalepsia, la actividad locomotora, y la conducta de exploración hacia el medio ("rearing").

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Para todos los experimentos de este trabajo, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (Instituto de Fisiología Celular, UNAM). Los animales fueron seleccionados con un peso inicial de 200 gramos aproximadamente. Los animales fueron dispuestos en cajas grandes de acrílico (54 cm largo x 43 cm ancho x 20 cm alto), en grupos de cuatro animales en cada caja, en condiciones de agua y alimento *ad libitum*. Las cajas de los animales fueron situadas en cuartos con ciclos luz-obscuridad regulados (ciclo normal, con luz encendida de las 8:00 a las 20:00 horas; y ciclo invertido, con luz encendida de las 20:00 a las 8:00 horas). Para que los animales estuvieran perfectamente adaptados y sincronizados a los parámetros temporales, se mantuvo un período de adaptación-sincronización no menor a tres ni mayor de seis semanas antes de su utilización en los experimentos.

Experimentos de unión ligando-receptor

Para el desarrollo de los experimentos de unión específica, se utilizaron los métodos descritos por Creese y cols. (1977), modificados por Seeman y cols. (1989).

a) Preparación de membranas:

Los animales fueron sacrificados por decapitación. El cerebro fue removido rápidamente y puesto en solución Tris-Krebs (Tris 50 mM, pH 7.4, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM) a 4 ° C, inmediatamente después, el tejido fue disecado en la superficie de un vidrio de reloj a la misma temperatura. Se disecaron bloques de las siguientes estructuras: la corteza frontal (disecada hasta el forceps menor del cuerpo calloso), la cabeza del cuerpo estriado, el complejo amigdalino (que incluyó los polos ventrales del hipocampo) y el cerebelo. Los bloques de tejido fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización.

Los bloques de tejido se homogeneizaron en una solución hipo-osmolar Tris 50 mM, pH 7.6 a 4 ° C, con un homogenizador teflón-vidrio en un taladro de velocidad regulada (650 r.p.m.), 10 recorridos del émbolo. Los homogenados fueron centrifugados utilizando una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B a 48,200 x g (rotor SS-34 a 20 000 r.p.m.). La pastilla

fue resuspendida en la misma solución y centrifugada nuevamente. La pastilla final fue resuspendida en la solución Tris-Krebs. En esta preparación de membranas se midió la concentración de proteínas para calcular la cantidad a utilizar en el ensayo de unión ligando-receptor.

b) Validación de la técnica.

Para los experimentos en los que se implementó la técnica de unión radioligando-receptor, se decidió utilizar una concentración de 0.2 nM de [³H]-espiroperidol (Kd reportada por Creese y cols. 1977). Los experimentos consistieron en a) el estudio del pegado de [³H]-espiroperidol a concentraciones crecientes de proteína, de la preparación de membranas de cada región cerebral disecada; b) la determinación del tiempo de incubación en el que se alcanza el equilibrio en el pegado de [³H]-espiroperidol; c) la caracterización de los compuestos utilizados para definir el pegado inespecífico y el pegado total a los receptores D₂ dopaminérgicos; y d) determinación en un ensayo piloto (n = 3) de la constante de afinidad (Kd) para el pegado de [³H]-espiroperidol en nuestras condiciones experimentales.

c) Experimentos de unión ligando-receptor

El ensayo ligando-receptor consistió en la incubación del homogenado de membranas en una solución Tris-Krebs en presencia de 0.1 nM de [³H]-espiroperidol (la concentración de membranas utilizada se describe más adelante, y depende del tejido utilizado. Lowry y cols. 1951). Para medir el pegado total del ligando al tejido, la incubación se hizo en presencia de (-)-butaclamol 1 μM y Ketanserina 40 nM. El pegado inespecífico fue medido en presencia de (+)-butaclamol 1 μM y Ketanserina 40 nM. El pegado estereoespecífico de [³H]-espiroperidol a los receptores D₂, consistió en la diferencia entre el pegado total menos el pegado inespecífico. En estas condiciones, la medición de receptores incluyó a toda la familia de receptores del tipo D₂ (D₂, D₃, y D₄).

Los homogenados fueron incubados a 37°C durante 30 minutos, deteniendo la reacción mediante filtración en un aparato Cell Harvester (Brandel), utilizando filtros GF/B.

Los filtros se dejaron secar 12 horas. La radiactividad fue medida poniendo los filtros en viales con 5 ml de tritosol, en un contador de centelleo Beckman LS 6000SC.

d) Experimentos de variaciones diurnas en el pegado de [^3H]-espiroperidol a los receptores dopaminérgicos.

Para estos experimentos, los animales fueron sacrificados cada 3 horas hasta completar un ciclo de 24 h, partiendo de las 00:00 horas. Durante el periodo de obscuridad, los animales fueron sacrificados con el auxilio de luz roja de baja intensidad. El procedimiento para la obtención de la fracción membranal y los experimentos de unión fue el descrito anteriormente. La concentración de [^3H]-espiroperidol que se utilizó en estos experimentos fue de 0.1 nM. Esta concentración se encuentra dentro del rango de las constantes de afinidad (K_d) reportadas para la familia de los receptores D_2 dopaminérgicos.

e) Cinética de los receptores D_2 dopaminérgicos.

Para determinar los valores de la afinidad (K_d) y densidad (B_{max}) de los receptores D_2 dopaminérgicos, se efectuaron curvas de pegado de [^3H]-espiroperidol para determinar los valores de saturación. Como el propósito de estos experimentos fue determinar si las variaciones diurnas obedecen a cambios en la afinidad o la densidad de los receptores, los experimentos de saturación fueron realizados en preparaciones de membranas de animales sacrificados en las horas de pico y valle que fueron determinadas previamente mediante el estudio de variaciones diurnas.

Experimentos de conducta

Estos experimentos intentaron estudiar si existe alguna correlación en las variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos D_2 , y su posible participación en la regulación del efecto conductual de los fármacos que actúan sobre estos receptores. Para esto, una hora antes de la medición de la conducta los animales fueron inyectados con haloperidol (presentación comercial, diluida en solución salina 1:25) o con solución salina (controles).

a) Campo abierto

En todos los casos, la primera medición fue la conducta espontánea en el campo abierto, para tener un indicador de las variaciones diurnas en el ritmo de actividad espontánea. El campo abierto consiste en situar al animal en un entorno novedoso para él. En este caso, fue una caja de acrílico de 54 x 43 x 20 cm, la cual tenía dibujadas líneas en el piso formando una cuadrícula. Cada cuadro tenía un tamaño cercano a 11 x 11 cm (cabría una rata en cada cuadro). La rata se situaba en una esquina para iniciar la prueba; un observador siguió los movimientos del animal durante dos minutos, registrándolos en un papel con una cuadrícula semejante a la de la caja de acrílico.

Las conductas que se registraron en el campo abierto fueron:

Locomoción. Consistió en contar los cuadros que cruzaba el animal al moverse en el campo abierto.

Exploración vertical ("rearing"). Conducta de exploración en la cual el animal levantaba el cuerpo parándose solo en las patas posteriores, olfateando hacia arriba.

Otros parámetros que se tomaron en cuenta en esta prueba fueron el número de micciones y defecaciones durante la misma.

b) Catalepsia

La catalepsia ha sido definida como la dificultad del animal para corregir una postura impuesta (Sanberg y cols. 1988). Para el montaje y la validación de la medición de catalepsia se realizaron varios ensayos piloto, en los que se probó la prueba de la barra inyectando haloperidol (1.2 mg/kg de peso), midiendo el tiempo de catalepsia como la duración de la postura impuesta, manteniendo las patas delanteras de la rata sobre la barra, y deteniendo el reloj hasta que el animal pusiera las dos patas delanteras (ambas) en el piso de la caja. La barra era una pieza de madera de 1 cm de diámetro, situada a 10 cm del piso de la jaula. Sin embargo, con esta prueba encontramos que los animales podían permanecer en esta posición durante largo tiempo (más de 300 segundos). La medición de catalepsia parecía estar modificada por la manifestación de otras conductas como sedación y sueño. Intentando evitar medir sedación junto con la catalepsia, se decidió probar la "prueba del corcho" reportada por Morelli y DiChiara (1985). Comparando estas pruebas, encontramos tiempos

más breves de catalepsia con los corchos que con la barra, además, los valores de catalepsia medida en los corchos mostraron menor dispersión que la barra. Por otro lado, la catalepsia medida en los corchos requiere de mayor inmovilidad que la medición en barra, por lo que aparentemente era más difícil confundir y medir otras conductas (como sedación, por ejemplo) junto con la catalepsia; por todo lo anterior, decidimos utilizar esta prueba en los experimentos subsecuentes.

El método para medir la catalepsia (Morelli y DiChiara, 1985) consiste en situar cada pata del animal sobre un corcho de 2.5 cm de alto, los corchos se situaron en las "esquinas" de un rectángulo hipotético de 9 x 12 cm, de tal modo que los animales fueron colocados en extensión de las extremidades y se midió el tiempo de duración de esta postura mediante un cronómetro (Figura 14). El criterio para detener el reloj fue cualquier movimiento de las extremidades o de la cabeza que no fuesen sacudidas involuntarias, y que corrigiera la postura impuesta al animal.

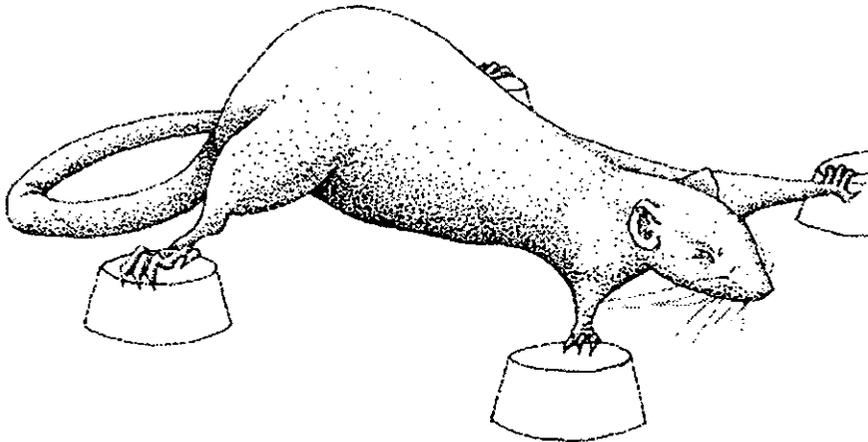


Figura 14.- Dibujo mostrando la forma en la que fueron situados los animales, para medir catalepsia utilizando la prueba de los corchos.

La catalepsia se midió una hora después de la inyección subcutánea del haloperidol. Se realizaron cuatro mediciones de catalepsia en cada animal, con un intervalo de 30 segundos entre una prueba y la siguiente.

Para estandarizar la prueba de catalepsia realizamos dos intentos exitosos en los cuales se lograba situar a la rata en la posición cataleptica. Consideramos como un intento el tomar

con suavidad al animal, poner las patas y el cuerpo en la posición correcta, y soltar gradualmente al animal (figura 14). El intento se consideró exitoso si el animal duraba en la posición impuesta más de 5 segundos. Para disminuir la variabilidad en los tiempos de catalepsia, se tomó únicamente el promedio del segundo intento exitoso para considerarlo como el tiempo de catalepsia. Las variaciones diurnas de catalepsia fueron medidas en diferentes grupos de animales, programando la evaluación de cada grupo en pruebas aisladas cada 3 horas a partir de las 00:00 horas. Las mediciones de la conducta en horas de obscuridad se realizaron con el auxilio de luz roja de baja intensidad.

Diseño experimental y análisis estadístico

En la primera parte del proyecto, caracterizamos las variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos D_2 mediante el pegado de [3H]-espiroperidol. Como en estos experimentos los animales deben ser sacrificados (solamente pueden ser utilizados una vez), se utilizaron grupos independientes de animales en cada experimento. Sin embargo, todos los animales fueron machos de 280 - 350 g de peso, en condiciones semejantes de almacenamiento y sincronización.

Para medir la interacción radioligando-receptor determinamos las regiones cerebrales que tuvieran una correlación entre el aumento de la cantidad de tejido (medida a través de la concentración de proteínas) y el aumento en el pegado específico de [3H]-espiroperidol. Para esto se disecaron cerebros de ratas que fueron repartidos en cuatro grupos. Cada cerebro fue disecado y las regiones a estudiar fueron mezcladas con las mismas regiones de otras dos ratas ("*pool*"); de estriados, de corteza, etc.); de este modo, un grupo consistía de la mezcla de tejido de tres animales (n total de animales = 12).

Para los experimentos de incubación se utilizaron igualmente cuatro grupos mezclados de tejido (tres ratas en cada grupo). En los de desplazamiento, se utilizaron seis grupos de tres animales.

Una vez montada la técnica, medimos el pegado de [3H]-espiroperidol a las membranas de cada región, obtenida de animales individuales sacrificados cada 3 horas. Con este procedimiento, obtuvimos las variaciones diurnas de los receptores de cada región, utilizando un animal por cada medición. El número de animales utilizado fue de ocho para el

estriado y la corteza cerebral, y de diez para el complejo amigdalino. El diseño fue de grupos independientes.

Para estudiar el mecanismo de las variaciones de los receptores, estudiamos en las horas de picos y valles de cada región, las características cinéticas del pegado de [³H]-espiroperidol a los receptores D₂. Para esto, utilizamos tejido disecado de grupos de dos cerebros para cada curva de desplazamiento.

En la última parte, estudiamos las variaciones diurnas del efecto conductual de la inyección de haloperidol (0.13 mg/kg peso), en los mismos puntos horarios que se emplearon para la determinación de los receptores dopaminérgicos D₂ (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, y 21). Para esto, se utilizaron grupos independientes de animales a los que se les inyectó haloperidol (0.13 mg/kg de peso) en un diseño contrabalanceado, en donde todos los animales fueron inyectados alternadamente con haloperidol o con solución salina, con un periodo de "lavado" de 10 días para la repetición de la catalepsia, recibiendo lo contrario de lo que se le hubiese inyectado inicialmente. De este modo, cada animal fue su propio control. Ejemplo:

Haloperidol → sol. salina

Sol. salina → haloperidol

Los experimentos en los que se midieron las variaciones diurnas, fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), utilizando como prueba *post hoc* la prueba de Student-Neumann-Keuls cuando fuese pertinente. En los casos que este análisis no fuese posible por tener muestras con distribución no-normal, se utilizó el análisis de varianza basado en rangos de Kruskal-Wallis, con la U de Mann-Whitney como prueba *post-hoc*.

RESULTADOS

ENSAYOS DE UNION LIGANDO-RECEPTOR

1) Validación de la técnica

Para montar y validar la técnica en el laboratorio, se utilizaron concentraciones de 0.2 nM de [³H]-espiroperidol, y tiempos de incubación de 20 minutos a 37 ° C, de acuerdo con la técnica reportada por Creese y cols. (1977) y Seeman y cols. (1997). En los experimentos iniciales el pegado inespecífico fue determinado mediante la incubación en presencia de una concentración excesiva de haloperidol frío (1 µM; véase la figura 9, página 31).

Inicialmente se buscó determinar las regiones cerebrales en donde pudiesen ser medidos los receptores dopaminérgicos D₂ con esta técnica. Para esto, se pusieron concentraciones crecientes de la preparación de membranas (medidas como concentración de proteínas) de cada región cerebral disecada. Los resultados se muestran en la figura 15 a. Además de definir las regiones cerebrales a estudiar, este experimento permitió determinar la concentración óptima de proteínas en el medio de incubación, de cada región cerebral en estudio.

Las regiones cerebrales con mayor pegado específico de [³H]-espiroperidol, fueron el estriado y el núcleo accumbens. La corteza frontal y el complejo amigdalino-temporal presentaron menor pegado del ligando al receptor dopaminérgico. El rango lineal para el pegado de [³H]-espiroperidol tanto en el estriado como en accumbens, fue hasta de 400 µg de proteínas. El rango lineal para el pegado de [³H]-espiroperidol en la corteza frontal y el complejo amigdalino-temporal fue hasta de 600 µg de proteínas (Figura 15 a). De acuerdo con estos resultados, decidimos estandarizar para los subsecuentes ensayos de unión, utilizando 300 µg de proteínas del estriado o del núcleo accumbens, y 500 µg de proteínas para el complejo amigdalino, la corteza frontal y el cerebelo (como control). Interesantemente, aumentando la concentración de membranas de cerebelo, hipocampo, e hipotálamo en los ensayos de unión ligando-receptor, no se encontraron incrementos significativos en el pegado específico de [³H]-espiroperidol.

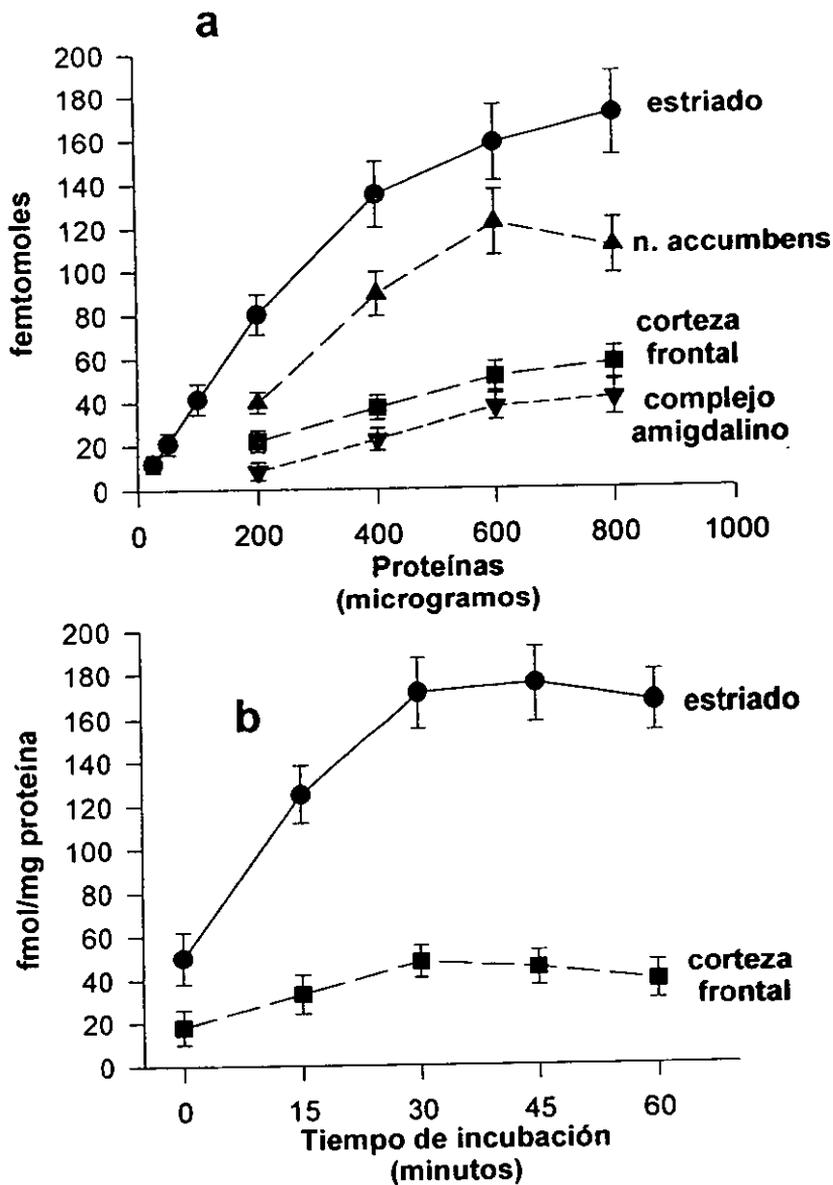


Figura 15.- Validación del pegado específico de [³H]-espiroperidol. a) Pegado de [³H]-espiroperidol a concentraciones crecientes de tejido de las siguientes regiones: estriado, n accumbens, corteza frontal, y complejo amigdalino. b) Tiempo de incubación en el que la interacción ligando-receptor alcanza el equilibrio incubando a 37 ° C. En ambas figuras, los símbolos representan el promedio de cuatro experimentos, realizados cada uno por triplicado. Las barras representan el error estándar.

El siguiente experimento fue para determinar el tiempo en el que se alcanza el equilibrio en la interacción ligando-receptor, lo que depende de la temperatura de incubación. Para esto, decidimos incubar 0.2 nM de [³H]-espiroperidol con 300 µg de proteínas de estriado, o 500 µg de proteínas de corteza frontal, durante diferente tiempo (figura 15 b). El tiempo de incubación para alcanzar el equilibrio tanto en el estriado como en la corteza frontal fue de 30 minutos. Este tiempo de incubación fue utilizado en los experimentos de todas las regiones cerebrales.

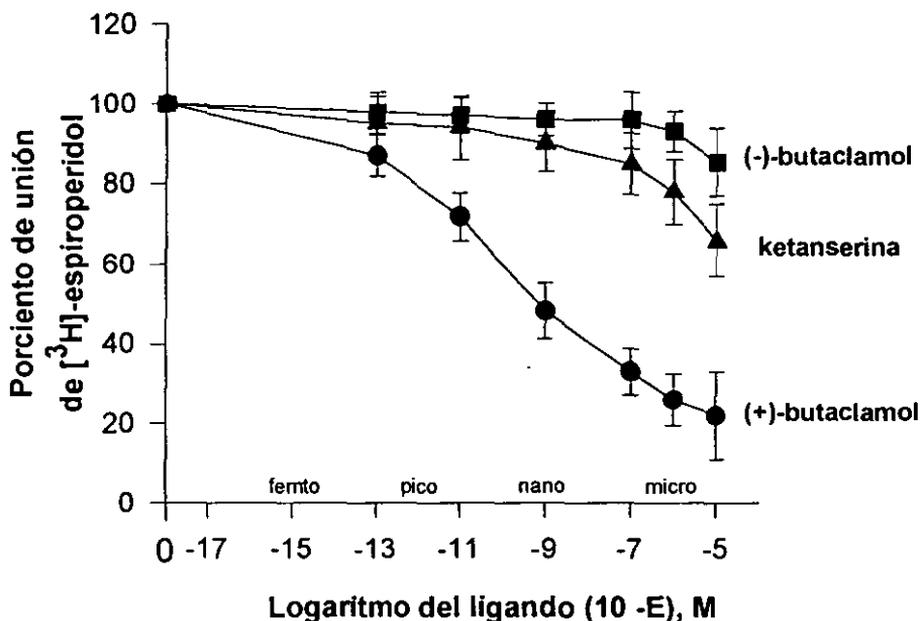


Figura 16. Curva de desplazamiento del pegado de [³H]-espiroperidol por concentraciones crecientes de dextro-butaclamol (círculos), levo-butaclamol (cuadros) y ketanserina (triángulos). Los símbolos representan la media de seis experimentos realizados cada uno por triplicado.

Para definir las concentraciones de los diferentes ligandos que serían utilizados para separar el pegado total del pegado inespecífico, se realizó una serie de curvas de desplazamiento para inhibir el pegado de [³H]-espiroperidol a los receptores D2 del estriado,

lo que se muestra en la figura 16. La inhibición del pegado de [³H]-espiroperidol por el butaclamol dextrógiro fue mayor que la inhibición por el isómero levógiro. Por otro lado, como el [³H]-espiroperidol puede unirse también a los receptores 5-HT₂, estudiamos la inhibición producida por la incubación con concentraciones crecientes de ketanserina, que es un antagonista selectivo de los receptores serotoninérgicos 5HT_{2a} y b. La curva de desplazamiento mostró que la ketanserina a una concentración de 100 nM, tiene apenas un desplazamiento menor al 20 %.

De acuerdo con estos resultados, para los ensayos siguientes el pegado total se determinó incubando en presencia de 1 μM del levoisómero (-) de butaclamol, el pegado inespecífico se determinó incubando en presencia de 1 μM del dextroisómero (+) de butaclamol, y la diferencia entre ambos se consideró como el pegado estereo-específico. En todos los ensayos siguientes se utilizó 0.04 μM de ketanserina, tanto en el pegado total como en el inespecífico,

2) Estudios de ritmos en receptores.

2, 1) Variaciones diurnas

Para medir las variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos de diferentes regiones cerebrales, utilizamos preparaciones de membranas de cada región a estudiar, obtenidas de animales sacrificados cada 3 horas, a partir de las 00:00 horas hasta completar un ciclo de 24 horas.

Los resultados en los experimentos de unión en el estriado se muestran en la figura 17, en la que se observa que el pegado estereo-específico de [³H]-espiroperidol a los receptores D₂ del estriado, mostró variaciones diurnas con un patrón unimodal. La mayor capacidad para el pegado ocurrió en horas de obscuridad, mostrando un pico de las 0 a las 3 horas, con un valor máximo de pegado de 231 fmol/mg prot. La menor capacidad de pegado (valle) se tuvo hacia las 18:00 horas, con 145 fmol/mg prot. de [³H]-espiroperidol. La media de los valores de pegado fue de 180.2 fmol/mg prot., y las variaciones tuvieron una amplitud de 86 fmol/mg prot., que equivale al 47.8 % de la media. Las variaciones del pegado de [³H]-espiroperidol a los receptores D₂ del estriado fue significativa ($F_{(7, 40)} = 3.81$; $p < 0.05$).

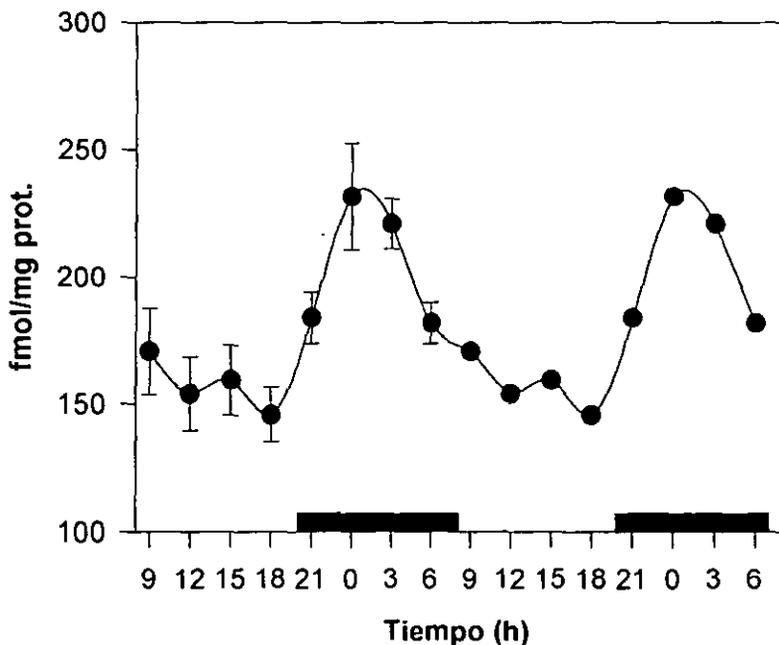


Figura 17. Variaciones diurnas en el pegado estereoespecífico de [^3H]-espiroperidol, a los receptores dopaminérgicos del estriado de rata. Se repitieron los mismos datos, graficándolos como si fuesen dos periodos, para observar mejor el perfil de variaciones en el tiempo. Cada símbolo representa la media de 6 experimentos, cada uno por triplicado. Las barras representan el error estándar (\pm).

El pegado estereoespecífico de [^3H]-espiroperidol a los receptores D_2 de la corteza frontal se muestran en la figura 18. Las variaciones diurnas del pegado de [^3H]-espiroperidol a los receptores D_2 de la corteza frontal mostraron un patrón bimodal. Los picos ocurrieron a las 00:00 (13.48 fmol/mg prot.) y las 12:00 horas (11.4 fmol/mg prot.). El menor nivel de pegado de [^3H]-espiroperidol ocurrió entre las 18:00 y las 21:00 horas (4.87 fmol/mg prot.), en el momento de la transición de la luz a la obscuridad. La media de los valores de pegado fue de 8.45 fmol/mg prot., con una amplitud de variación de 8.39 fmol/mg prot.,

que equivale al 108.7 %. Las variaciones diurnas del pegado de [³H]-espiroperidol a los receptores D₂ de la corteza frontal fueron estadísticamente significativas (F_(7, 40) = 4.31; p < 0.01).

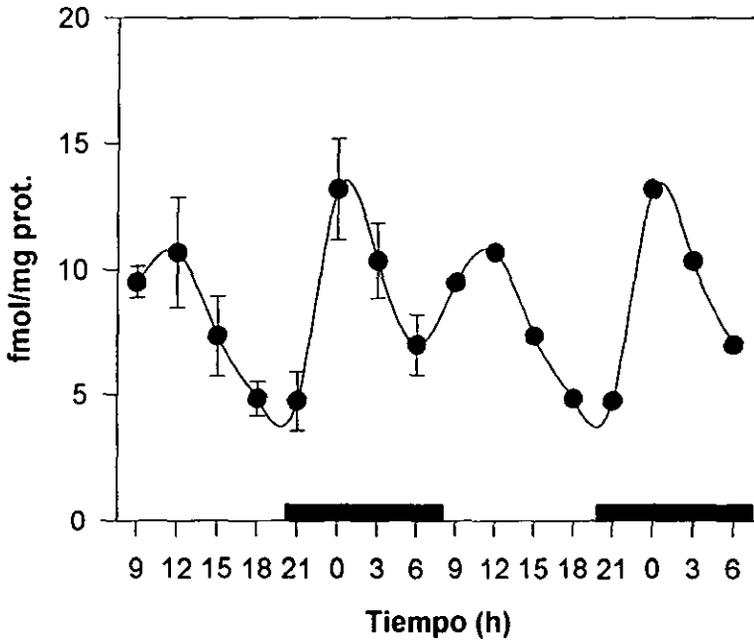


Figura 18. Variaciones diurnas en el pegado de [³H]-espiroperidol a los receptores dopaminérgicos de la corteza frontal. Se repitieron los mismos datos en la gráfica en forma de dos periodos, para observar mejor el perfil de variaciones. Cada símbolo representa la media de 6 experimentos, cada uno por triplicado. Las barras representan +/- el error estándar

El pegado estereoespecífico de [³H]-espiroperidol a los receptores D₂ del complejo amigdalino-temporal (figura 19), mostraron un patrón bimodal de variaciones con un pico mayor hacia las 18:00 horas (17.14 fmol/mg prot.) y un pico menor hacia las 06:00 horas (13.04 fmol/mg prot.). Los valles en el pegado ocurrieron a las 09:00 (7.86 fmol/mg prot.) y las 00:00 horas (7.75 fmol/mg prot.). La media de los valores de pegado fue de 10.73

fmol/mg prot., con una amplitud de variaciones de 9.6 fmol/mg prot., equivalente al 89.4 %. Las variaciones diurnas fueron significativas ($F_{(7, 72)} = 2.3$; $p < 0.05$).

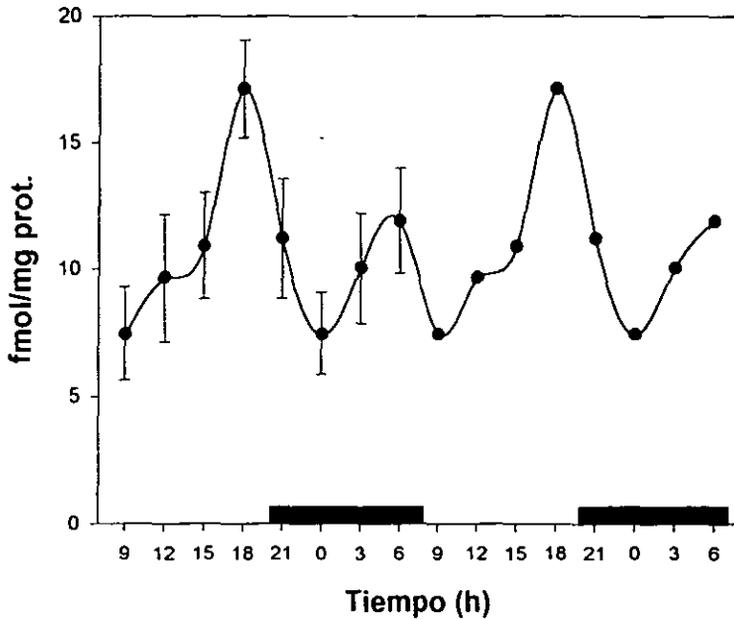


Figura 19. Variaciones diurnas en el pegado de [3 H]-espiroperidol a los receptores dopaminérgicos del complejo amigdalino-temporal. Se repitieron los mismos datos en la gráfica en forma de dos períodos, para observar mejor el perfil de variaciones. Cada símbolo representa la media de 10 experimentos, cada uno por triplicado. Las barras representan \pm el error estándar.

El pegado estereoespecífico del pegado de [3 H]-espiroperidol a las membranas del cerebelo, presentó un patrón ultradiano de variaciones, con valores entre 0.23 a 1.89 fmol/mg prot., que se situaron en el nivel de ruido para las variaciones diurnas que encontramos en otras regiones. Las variaciones diurnas encontradas en el cerebelo no fueron estadísticamente significativas.

2, 2) cinética de los receptores D₂ dopaminérgicos

Para determinar el mecanismo de las variaciones de los receptores D₂ dopaminérgicos, se estudió la cinética de la interacción ligando-receptor en diferentes regiones, de animales sacrificados a la hora del pico y la hora del valle de las variaciones diurnas encontradas en cada región. En el estriado el pico se midió a las 00:00 horas y el valle a las 12:00 horas; en la corteza frontal se midieron dos picos, uno a las 00:00 y el otro a las 12:00 horas, mientras que el valle fue medido a las 18:00 horas. En el complejo amigdalino, el pico fue medido a las 18:00 horas y el valle hacia las 12:00 horas.

La curva de saturación de la interacción radioligando-receptor en el estriado, alcanzó niveles mayores en los animales de las 00:00 horas (K_d 0.22 nM; B_{max} 355 fmol/mg prot.), que en los animales de las 12:00 horas (K_d 0.21; B_{max} 245 fmol/mg prot.), lo que sugirió que las variaciones dependientes del tiempo se relacionan con la densidad de los receptores en la superficie de la membrana (figura 20 a).

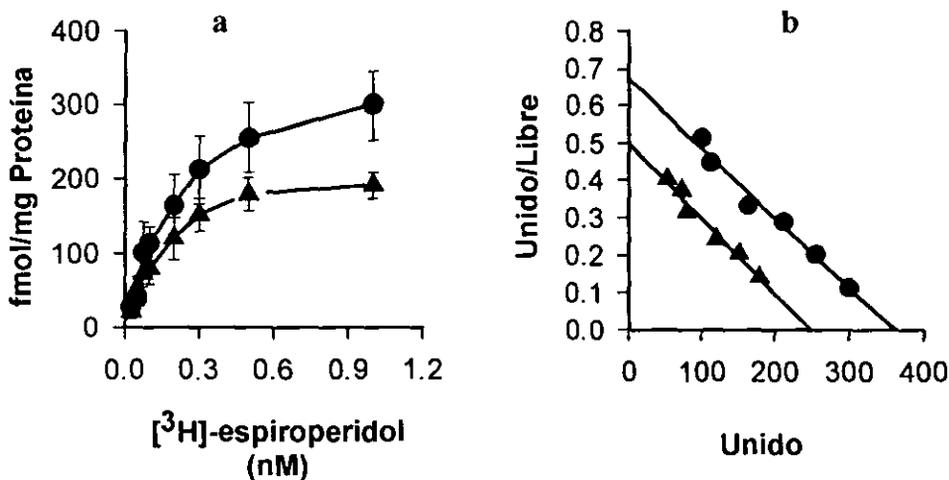
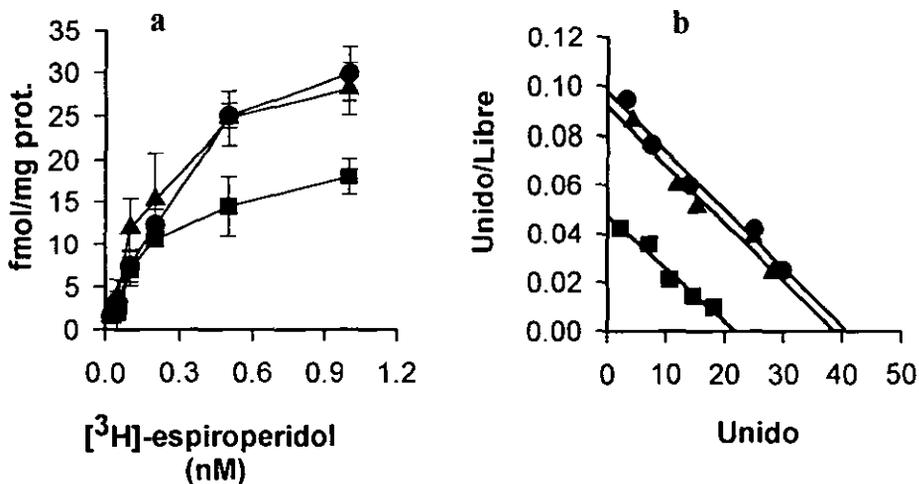


Figura 20.- Curva de saturación para el pegado de [³H]-espiroperidol a receptores de estriado de rata. a) curva de saturación (n = 8). b) transformación a Scatchard-Rosenthal de los datos de saturación. En ambas gráficas, los círculos representan al tejido obtenido a las 00:00 horas, los triángulos representan al tejido de las 12:00 horas. Las barras representan el error estándar.

Esto fue confirmado mediante el análisis de Scatchard-Rosenthal (figura 20 b). En donde no se observaron cambios en la pendiente de las rectas, y la diferencia se encontró en los interceptos con los ejes. Tampoco se encontraron curvas "sesgadas" que sugirieran dos receptores, por lo que asumimos que en este rango de concentraciones se midió un solo receptor dopaminérgico de alta afinidad. Las constantes de afinidad (K_d) del estriado de las 00:00 y 12:00 horas, no mostraron grandes diferencias, ni en las constantes calculadas en las curvas de afinidad, ni en las calculadas mediante el análisis Scatchard-Rosenthal.

Figura 21- Curva de saturación para el pegado de [3 H]-espiroperidol a receptores dopaminérgicos D_2 de corteza frontal. a) curva de saturación (n = 8), b) transformación Scatchard-Rosenthal de los



datos de saturación. En ambas gráficas los círculos representan al tejido de las 00:00 horas, los triángulos el de las 12:00 horas, y los cuadrados representan el de las 18:00 horas. Las barras representan el error estándar.

Los receptores D_2 de la corteza frontal tuvieron curvas de saturación que mostraron un patrón similar entre las 00:00 horas (K_d 0.34 nM; B_{max} 40.5 fmol/mg prot.) y las 12:00 horas (K_d 0.341nM; B_{max} 38 fmol/mg prot.), que correspondían a las horas de los picos de pegado de espiroperidol (véase figura 18). Sin embargo, la curva fue diferente a las 18:00

horas (Kd 0.24 nM; Bmax 22 fmol/mg prot.), que presentó un nivel menor de saturación (figura 21 a). Esto sugiere que las variaciones dependientes del tiempo ocurren en la densidad de los receptores dopaminérgicos D₂. Lo que se confirmó con el análisis Scatchard-Rosenthal que mostró rectas con la misma pendiente. Esto confirmó que las variaciones ocurren en la densidad de los receptores, aunque exista una discreta variación en las constantes de afinidad respecto a otras regiones cerebrales (figura 21 b).

La curva de afinidad de los receptores D₂ del complejo amigdalino-temporal mostró un nivel menor de saturación a las 12:00 horas (Kd 0.18; Bmax 17 fmol/mg prot.), al compararla con la preparación de las 18:00 horas (Kd 0.23; Bmax 37 fmol/mg prot.), (figura 22 a). El análisis de Scatchard-Rosenthal mostró rectas paralelas para las curvas de las 12:00 y las 18:00 horas (figura 22 b).

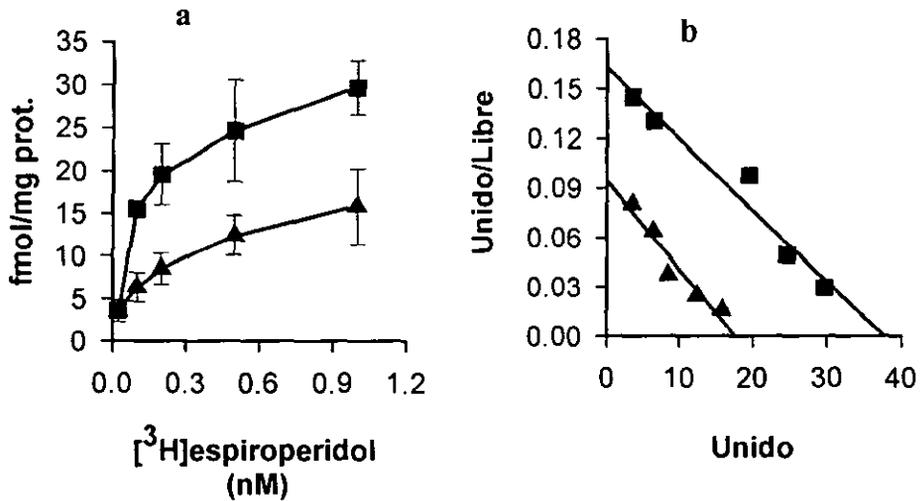


Figura 22.- Curva de saturación del pegado de [³H]-espiroperidol a los receptores dopaminérgicos D₂ del complejo amigdalino-temporal. a) curva de saturación (n = 8), b) transformación Scatchard-Rosenthal de los datos de saturación. En ambas gráficas los triángulos representan el tejido de las 12:00 horas, y los cuadrados representan el de las 18:00 horas. Las barras representan el error estándar.

Estudios de conducta

1) Catalepsia

Estandarización de la técnica

Para la medición de catalepsia se probó inicialmente la prueba de la barra, inyectando 1.2 mg/kg de peso de haloperidol. Esta dosis fue seleccionada debido a que en un estudio piloto resultó mejor que la dosis más frecuentemente utilizada en la literatura (1 mg/kg de peso). Con este procedimiento se realizaron mediciones de catalepsia cada tres horas, encontrando variaciones diurnas con un patrón unimodal, y un pico de catalepsia de las 12:00 a las 15:00 horas (figura 23). La catalepsia presentó variaciones diurnas con valores entre 300 a 900 segundos (5 a 15 minutos aproximadamente). Los animales control tuvieron tiempos de catalepsia que oscilaban entre 8 a 13 segundos.

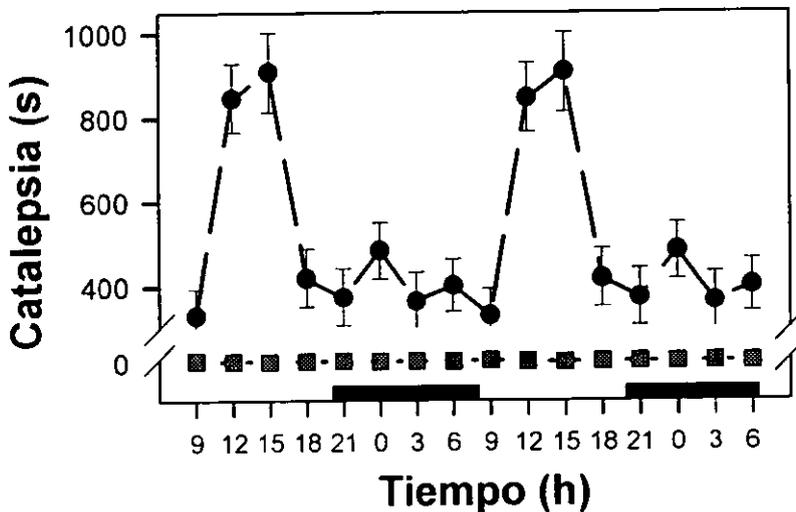


Figura 23.- Catalepsia producida por haloperidol (1.2 mg/kg) medida en la prueba de la barra. Los círculos representan la catalepsia producida por haloperidol ($n=12$; $F_{(7,88)} = 4.502$; $p < 0.05$), los cuadros representan la catalepsia producida por una inyección de solución salina (controles; $n=12$). Las barras representan el error estándar. La gráfica muestra repetidos los mismos datos para una mejor visualización.

Sin embargo, con esta metodología encontramos que algunos animales permanecían en la barra manteniendo la posición impuesta durante tiempos largos, lo que daba la impresión de que la medición de catalepsia estaba siendo modificada por otras conductas como sedación y/o sueño. Esta sospecha pareció confirmada al realizar la curva dosis-respuesta midiendo la catalepsia en la barra. Encontramos que la mitad de la dosis para producir el efecto máximo (DEM_{50}) era de aproximadamente 0.11 mg/kg a las 03:00 horas, y de 0.15 mg/kg a las 15:00 horas (figura 24) lo que resultó opuesto a lo esperado con respecto al pico y el valle de la curva de variaciones diurnas. Estas dosis fueron mucho menores que la dosis utilizada de 1.2 mg/kg. Para evitar la posibilidad de medir sedación y sueño junto con la catalepsia, decidimos probar la "prueba del corcho" reportada por Morelli y DiChiara (1985).

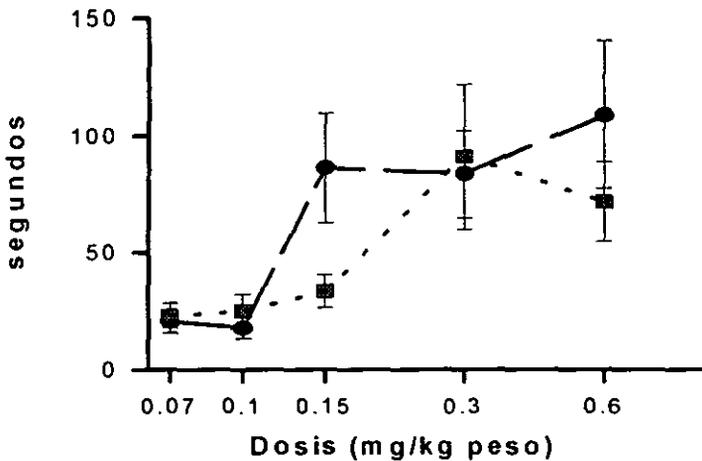


Figura 24 .- Curva dosis-respuesta para la catalepsia producida por haloperidol, medida en la prueba de la barra, (n = 12). Los círculos representan la duración de la catalepsia medida a las 03:00 horas, mientras que los cuadros representan la medición de la catalepsia a las 15:00 horas.

Al mismo tiempo que la curva dosis-respuesta de la catalepsia en barra, se realizó la curva dosis-respuesta midiendo la catalepsia en la prueba de los corchos, utilizando los mismos animales y en el mismo horario (03:00 y 15:00 horas; figura 25), con un intervalo de 5 minutos entre una prueba (barra) y la siguiente (corchos). La comparación de estas pruebas mostró resultados similares en cuanto a que los tiempos mayores fueron los medidos en la obscuridad y en que las dosis bajas brindaron una mejor resolución de la catalepsia (figuras 24 y 25). Más aún, la catalepsia medida en los corchos requiere de mayor inmovilidad que la medición en la barra, por lo que aparentemente es más difícil confundir y medir otras conductas junto con la catalepsia (por ejemplo: sedación); por todo lo anterior, decidimos utilizar esta prueba para los experimentos subsecuentes.

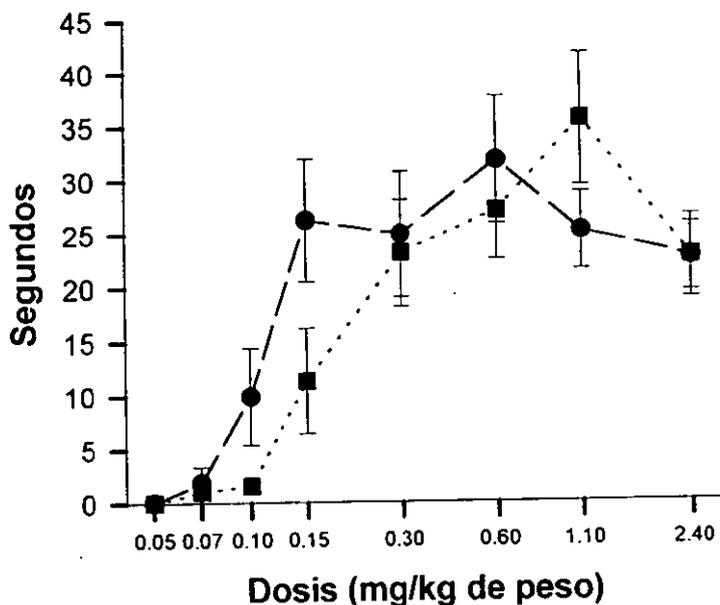


Figura 25 .- Curva dosis-respuesta preliminar, comparando la catalepsia (medida en corchos) a las 03:00 (círculos) y 15:00 horas (cuadros). El rango de dosis en el que se encontraron diferencias fue entre 0.1 a 0.15 mg/kg de haloperidol (n = 12).

La curva dosis respuesta de la catalepsia medida en los corchos, mostró un perfil similar a la curva de catalepsia medida en la barra, aunque con tiempos menores en la duración de la catalepsia. En la figura 25 se puede observar la diferencia entre la curva dosis-respuesta de las 03:00 horas y la curva a las 15:00 horas. Con esta curva inicial, la dosis escogida para evaluar las variaciones diurnas de catalepsia producida por haloperidol fue de 0.13 mg/kg de peso. Los controles (inyectados con sol. salina) tuvieron valor de 0 en todas las horas en las que se midieron.

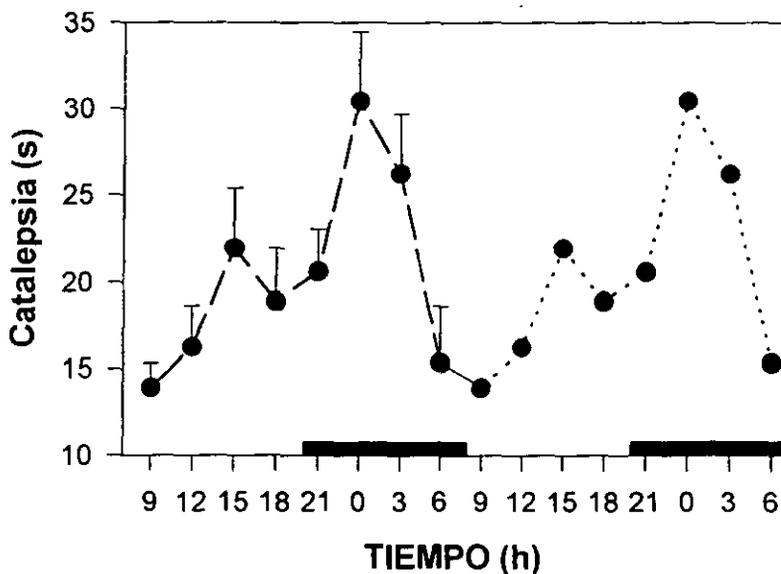


Figura 26. - Variaciones diurnas de catalepsia inducida por haloperidol (0.13 mg/kg). La prueba fue medida en corcho (n = 8). En la gráfica se muestran los mismos datos, por duplicado para una mejor observación de las variaciones.

La catalepsia en los corchos permitió determinar sus variaciones diurnas midiendo esta conducta cada tres horas a partir de las 00:00 horas, hasta completar un ciclo de 24 horas (figura 26). El efecto máximo de la producción de catalepsia por haloperidol se

observó a las 00:00 horas, y el mínimo a las 09:00 horas. Las variaciones fueron estadísticamente significativas ($F_{(7, 56)} = 2.38$; $p < 0.01$). La duración máxima de catalepsia fue de 30 segundos (00:00 h), el mínimo de 14 (09:00 h), con una amplitud de 100 % con respecto a la media.

Para confirmar la correlación del efecto cataleptógeno del haloperidol con las variaciones de los receptores dopaminérgicos, realizamos nuevamente las curvas dosis-respuesta en las horas de pico y valle (00:00 y 12:00 horas) de la conducta de catalepsia (Figura 27).

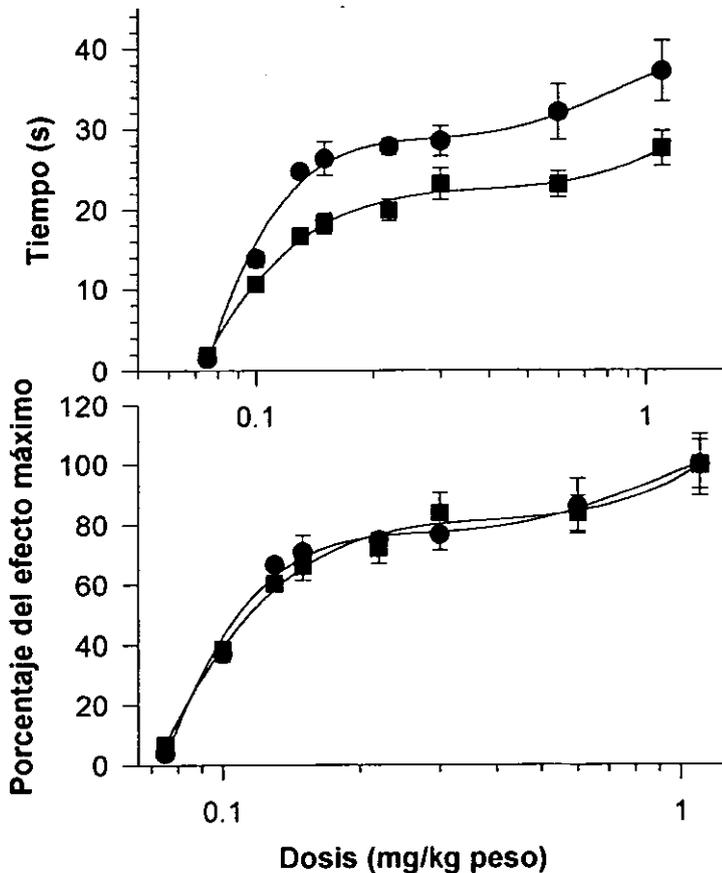


Figura 27 .- Curva dosis-respuesta de catalepsia producida por haloperidol. A .- Curva donde se muestran las diferencias entre las 00:00 (círculos) y las 12:00 (cuadrados) horas. B .- Transformación a porcentajes para comparar el efecto dependiente del tiempo del haloperidol. Cada símbolo representa el promedio de 6 datos, las barras representan el error estándar.

2) Conductas locomotora y de exploración vertical ("rearing")

La conducta espontánea en situación de campo abierto que se observó una hora después de la inyección de 1.2 mg/kg de haloperidol, fue de inmovilidad total. Con esta dosis, los animales permanecieron en el sitio en el que fueron situados, manteniendo los ojos cerrados y la espalda encorvada.

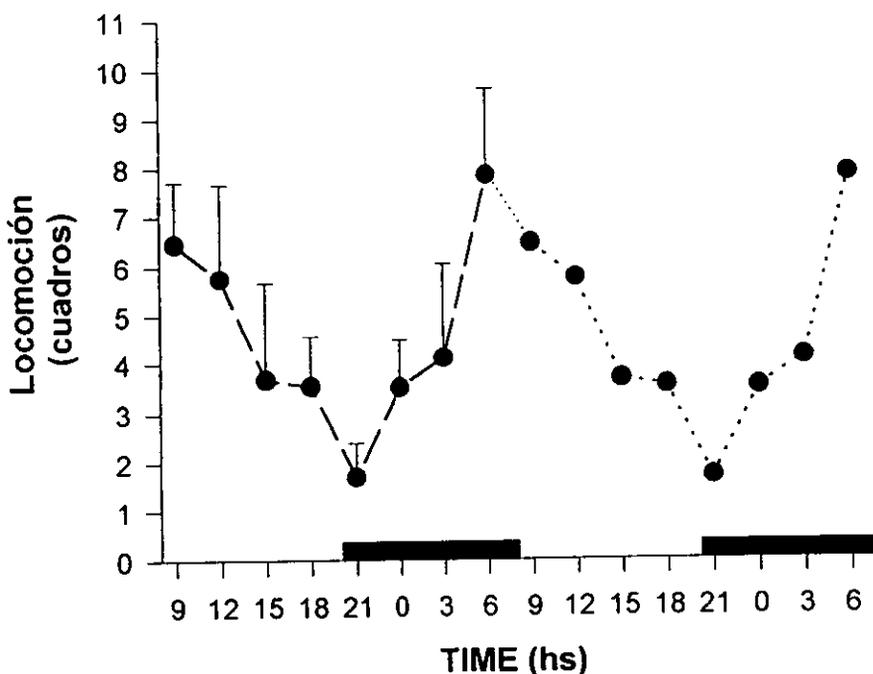


Figura 28 .- Variaciones diurnas de la actividad locomotora en ratas inyectadas con haloperidol 0.13 mg/kg de peso (n = 8). Las variaciones diurnas fueron analizadas con la prueba de Kruskal-Wallis, resultando estadísticamente significativas (H= 16.9; g.l. = 7; p < 0.05).

Con la dosis de 0.13 mg/kg, encontramos variaciones diurnas de la conducta

locomotora que se muestran en la figura 28. El máximo de conducta locomotora en presencia de haloperidol ocurrió a las 06:00 horas, con un mínimo a las 21:00 horas. Las variaciones diurnas de la conducta locomotora fueron estadísticamente significativas (figura 28). Los animales control (inyectados con solución salina) presentaron variaciones no significativas (no se muestran) con un patrón irregular.

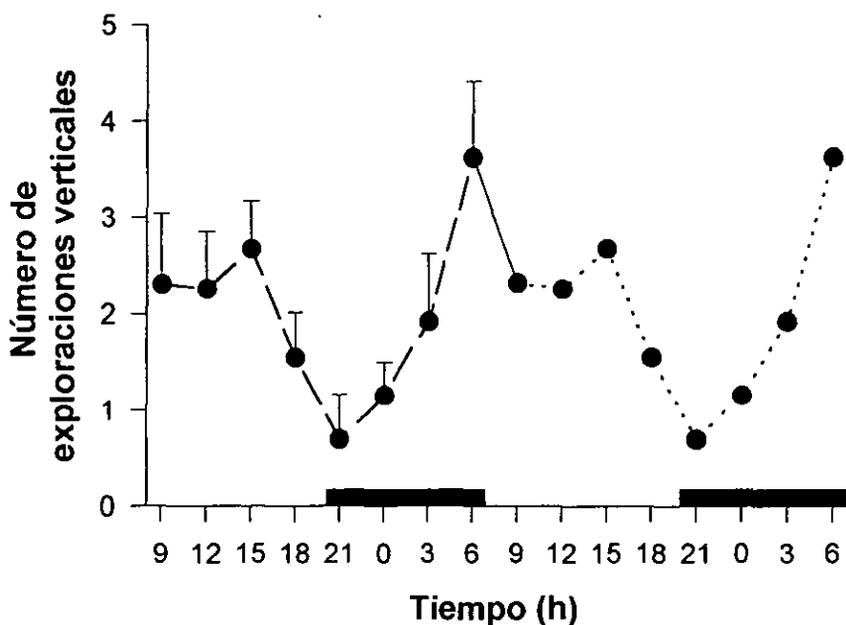


Figura 29 .- Variaciones diurnas de la actividad de exploración vertical en ratas inyectadas con haloperidol 0.13 mg/kg de peso (n = 8). Las variaciones diurnas no fueron estadísticamente significativas (H= 9.4; g.l.=7; p=0.22).

Las variaciones diurnas de la conducta de exploración vertical se muestran en la figura 29. La exploración vertical en presencia de haloperidol mostró un patrón ultradiano, con dos picos de actividad a las 06:00 y las 15:00 horas, y un valle hacia las 21:00 horas,

aunque no tuvieron significancia estadística. Los animales inyectados con solución salina, no tuvieron variaciones significativas.

No se encontraron variaciones diurnas estadísticamente significativas en micción ni en defecación durante la ejecución de las pruebas de conducta.

DISCUSION

Previo a este estudio, las variaciones diurnas del pegado de radioligandos a los receptores dopaminérgicos D_2 sólo habían sido caracterizadas en el estriado de rata (Naber y cols., 1980; Kafka y cols. 1982; Wirz-Justice y cols. 1982). A la fecha, no se había estudiado si las variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos D_2 presentaban el mismo perfil en otras regiones cerebrales, lo que sugeriría un mecanismo común de regulación, o si hubiese diferencias en las variaciones diurnas de una región a otra, lo que sugeriría una regulación diferencial para cada sistema dopaminérgico. Para el abordaje de este problema, decidimos estudiar las variaciones diurnas de estos receptores en diferentes regiones cerebrales mediante el ensayo de unión de [3H]-espiroperidol a tejido de diferentes regiones cerebrales, obtenido cada tres horas hasta completar un ciclo diurno.

a) Validación Metodológica

Los experimentos iniciales se realizaron para establecer las condiciones adecuadas para medir la interacción radioligando - receptor; en éstos se utilizó haloperidol para establecer el pegado inespecífico. El haloperidol es la molécula congénere más cercana al espiroperidol (figura 9), lo que significa que al restar el pegado inespecífico del pegado total, solamente calculamos el pegado **específico** a los receptores D_2 (Creese y cols. 1975).

La medición de los receptores dopaminérgicos D_2 mediante el uso de [3H]-espiroperidol ha sido ampliamente documentada (Seeman y cols., 1979; Creese y cols. 1977; Naber y cols. 1980; Kafka y cols. 1992; Wirz-Justice y cols. 1982), debido a que este radioligando es el de mayor afinidad por los receptores D_2 (Creese y cols. 1977; Seeman 1980). Sin embargo, se han utilizado diferentes protocolos para medir la interacción ligando-receptor, desde medios de incubación hipotónicos a base de solamente Tris 50 mM (Naber y cols., 1980; Wirz-Justice y cols. 1982), hasta medios isotónicos con concentraciones fisiológicas de solutos (Creese y cols. 1977; Seeman y cols. 1984). En nuestros experimentos utilizamos un medio de incubación con concentraciones fisiológicas de iones de sodio, potasio, magnesio, calcio, y cloruros, semejante al reportado por Seeman y cols. (1984; 1995).

Otra variación en el protocolo de esta técnica se basó en la concentración de proteínas. Nosotros encontramos un rango lineal en el pegado específico de [³H]-espiroperidol, que varió de 25 a 400 µg de proteínas por mililitro de medio de incubación en preparaciones de estriado, mientras que en la corteza frontal y el complejo amigdalino, el rango lineal para el pegado del radioligando fue de 200 a 600 µg de proteínas por mililitro de medio de incubación. Tomando en cuenta estos resultados para medir las variaciones diurnas de estos receptores dentro del rango lineal, la concentración de proteínas que utilizamos en todos los experimentos fue siempre de 300 µg en preparaciones de estriado y de 500 µg en preparaciones de corteza frontal, o de complejo amigdalino, o de cerebelo. Estos valores estuvieron de acuerdo con los reportados utilizando preparaciones de estriado. Seeman y cols. (1984) habían reportado un rango útil de concentración de proteínas en el medio de incubación entre 8 y 800 µg. En los experimentos en los que se estudiaron las variaciones diurnas de estos receptores, Naber y cols. (1980) utilizaron 8 mg del estriado por cada mililitro de ensayo (pesado como bloque de tejido disecado), lo que corresponde aproximadamente a 560 µg de proteínas por mililitro de medio de incubación (calculando 7 % de proteínas, según Seeman y cols. 1995). Wirz-Justice y cols. (1982) utilizaron 10 mg de estriado (bloque de tejido disecado), lo que correspondería a 700 µg de proteínas en el medio de incubación. Kafka y cols. (1982) no refirieron la concentración de proteínas que utilizaron. Por otro lado, en las regiones con densidades bajas de receptores dopaminérgicos, no encontramos incrementos del pegado específico de [³H]-espiroperidol al aumentar la concentración de proteínas en el ensayo; estas regiones fueron: el hipocampo, el hipotálamo, y el cerebelo. Sin embargo, esto no significa necesariamente que no haya receptores D₂, sino que en el caso de que los hubiese por su baja densidad, se requeriría de radioligandos con mayor actividad específica para poder medirlos.

También se modificó el protocolo en el tiempo de incubación necesario para alcanzar el equilibrio en la interacción ligando-receptor. Naber y cols. (1980) utilizaron 10 minutos incubando a 37 °C; el grupo de Seeman había utilizado incubaciones desde 30 minutos a 20 °C (Seeman y cols. 1979), hasta 1.5 - 2 horas incubando a 20 - 21 °C (Seeman y cols. 1984). Creese y cols. (1977) utilizaron 10 minutos a 37 °C. En nuestro ensayo, para alcanzar el equilibrio requerimos de 30 minutos a 37 °C (figura 15-a).

Cabe recordar que en los experimentos de validación de la técnica se utilizó haloperidol para definir el pegado inespecífico. Los resultados de las curvas de desplazamiento mostraron que el estereoisómero dextro-butaclamol desplaza el pegado de [³H]-espiroperidol a concentraciones mucho menores que su homólogo levo-butaclamol, lo que implica la actividad biológica de los receptores dopaminérgicos en el reconocimiento a nivel molecular entre un estereoisómero y otro. De acuerdo con la teoría, en los siguientes experimentos utilizamos el estereoisómero dextro-butaclamol para obtener el pegado inespecífico y levo-butaclamol para el pegado total, de modo que la diferencia entre ambos sirviera para calcular el pegado estereo-específico a los receptores D₂ dopaminérgicos. Finalmente, como el [³H]-espiroperidol es capaz de unirse también a los receptores serotoninérgicos con relativa alta afinidad (Mendoza-Ramírez y cols. 1991; Sheline y cols. 1995), todos los ensayos fueron realizados en presencia de ketanserina, para tener a estos receptores previamente ocupados, y que no interfiriesen en la medición de los receptores dopaminérgicos. De acuerdo a los resultados de nuestra curva de desplazamiento (figura 16), la concentración de ketanserina utilizada para bloquear a los receptores serotoninérgicos fue de 40 nM, lo que coincide con los valores reportados en la literatura (Mendoza-Ramírez y cols. 1991),

Una vez establecidos los parámetros para la medición de los receptores D₂ dopaminérgicos, realizamos un experimento piloto de curvas de saturación para determinar la constante de afinidad (K_d) del [³H]-espiroperidol en nuestras condiciones experimentales, lo que motivó la corrección de la concentración inicial de 0.2 nM de [³H]-espiroperidol hacia 0.1 nM de este.

b) Variaciones diurnas de los receptores

Una vez obtenidas las condiciones para la medición de la interacción del [³H]-espiroperidol con los receptores de la familia D₂, se evaluaron las variaciones diurnas de los receptores en animales sacrificados cada 3 horas. Esto representó un incremento en la frecuencia de muestreo con respecto a lo reportado anteriormente por Naber y cols. (1980), Kafka y cols. (1982), y Wirz-Justice y cols. (1982) quienes evaluaron solamente 6 puntos a lo largo del día (nosotros evaluamos 8 puntos por día). La medición del pegado de [³H]-

espiroperidol permitió caracterizar las variaciones diurnas de la interacción ligando-receptor en la corteza frontal, el estriado, el complejo amigdalino y el cerebelo (este último como control).

En el estriado encontramos un patrón unimodal de variaciones, con un pico en la noche (entre las 00:00 y las 03:00 h), y el valle a las 18:00 horas. Estos resultados fueron diferentes de los reportados por Naber y cols. (1980) quienes describieron las variaciones en el estriado de ratas Sprague-Dawley, con un ritmo que describieron como ultradiano (sin haber demostrado su naturaleza endógena), con picos a las 2 a.m. y a las 2 p.m. Sin embargo, Kafka y cols. (1982) también estudiaron las variaciones diurnas de los receptores D_2 en ratas Sprague-Dawley, reportando un ritmo unimodal con un pico sostenido ente las 22:00 a las 06:00 horas (en oscuridad), lo que es semejante al tipo de ritmo de nuestros resultados. En relación con la amplitud de las variaciones, Naber y cols. (1980) tuvieron una amplitud de variación de 72 fmol/mg prot., mientras que Kafka y cols. (1982) reportaron una amplitud de 110 fmol/mg prot. En nuestros resultados, la amplitud de variaciones que encontramos fue de 83 fmol/mg prot., lo que se encuentra dentro del rango de variaciones reportado. Cabe destacar que en todos estos estudios, los autores utilizaron [3H]-espiroperidol como radioligando.

La constante de afinidad (Kd) que encontramos para la unión de [3H]-espiroperidol en el estriado tuvo valores cercanos a 0.2 nM. Los valores de Kd que encontramos se ubican dentro del rango reportado por otros autores (0.3 nM, Creese y cols. 1976; 0.07 nM, Seeman 1980; 0.05, Seeman y cols. 1984). Sin embargo, los valores de afinidad (Kd) reportados por Naber y cols. (1980) para el pegado de [3H]-espiroperidol en el estriado de ratas (Sprague-Dawley) fueron de 1.78 nM a las 02:00 y 1.56 nM a las 22:00 horas. Wirz-Justice y cols. (1982) reportaron valores de afinidad (Kd) de 1.7 nM, sin cambios significativos por el horario. Esta diferencia parece importante, sin embargo, los valores de afinidad (Kd) reportados tanto por Naber y cols. (1980), como por Wirz-Justice y cols. (1982), están considerados entre los más altos dentro de la literatura internacional (Seeman 1980; Seeman y cols. 1984). Las diferencias en los valores de afinidad en el pegado de [3H]-espiroperidol pudieran deberse a diferentes aspectos como la cepa de ratas que utilizaron

(Sprague-Dawley), o aspectos como a variaciones en la técnica empleada para la medición del receptor.

Para buscar el mecanismo posible de las variaciones diurnas de los receptores D_2 dopaminérgicos, se realizaron experimentos de saturación para determinar los parámetros de la cinética de la interacción ligando-receptor. En las curvas encontramos que las variaciones están relacionadas con cambios en la densidad de los receptores dopaminérgicos (B_{max}), más que con la constante de afinidad de los receptores (K_d). Esto está de acuerdo con los resultados de experimentos en donde se han medido las variaciones diurnas de otros receptores, como son los receptores opiáceos (Naber y cols. 1981) y los receptores noradrenérgicos (Kafka y cols. 1981).

Como las variaciones diurnas de los receptores D_2 solamente se han determinado en el estriado, nuestros datos sólo pueden ser comparados con los estudiados en esta estructura. En relación con las otras regiones cerebrales, en la corteza frontal encontramos un ritmo bimodal, con picos a las 00:00 y las 12:00 horas, y valles a las 06:00 y 18:00 horas, mientras que el complejo amigdalino mostró un patrón bimodal de variaciones, con un pico de pegado antes del cambio de la luz a la oscuridad (18:00 horas) y de la oscuridad a la luz (06:00 horas); los valles fueron encontrados a las 00:00 y las 09:00 horas. El hecho de que se encontraran diferentes perfiles de variaciones diurnas en diferentes regiones, confirma la hipótesis de que cada región podría tener un perfil de variaciones propio.

La mayoría de los estudios en receptores habían sido realizados utilizando homogenados de cerebro completo de rata, encontrando variaciones diurnas significativas en la mayoría de éstos (ver tabla III). En este trabajo, para estudiar las variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos D_2 , disecamos las regiones cerebrales en donde éstos receptores pudiesen ser medidos con el radioligando [3H]-espiroperidol. Esto permitió caracterizar las diferencias de una región cerebral a otra, en relación al perfil de variaciones diurnas para el pegado del radioligando. El nuestro es el primer estudio en donde se han medido los receptores dopaminérgicos D_2 de diferentes regiones cerebrales para establecer su perfil de variaciones diurnas, y compararlos entre sí buscando determinar si existen diferencias entre una región cerebral y otra. Un aspecto necesario en esta línea de

investigación será confirmar si el ritmo que se observa es de naturaleza endógena. Para evaluarlo, se requiere mantener a los animales en condiciones constantes de iluminación (obscuridad continua) y repetir el estudio de las variaciones diurnas de estos receptores. En tales condiciones, las variaciones diurnas desaparecerían en el caso de que el ritmo fuera de naturaleza exógena. Existe el antecedente del estudio de Kafka y cols. (1982), quienes estudiaron ratas (Spague-Dawley) que después de haber sido sincronizadas a condiciones de luz-obscuridad (12:12) durante tres semanas, al término de estas los animales fueron cambiados a condiciones de obscuridad continua por un periodo de 3 días, lo que no eliminó las variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos D₂, aunque sí se produjeron algunas modificaciones en la hora de aparición de los picos. Estos autores concluyeron que las variaciones diurnas de los receptores D₂ dopaminérgicos en el estriado (medidos mediante su interacción con [³H]-espiroperidol) son de naturaleza endógena (Kafka y cols. 1982).

El hecho de haber encontrado en el estriado que el pico de los receptores dopaminérgicos D₂ ocurrió en horas de obscuridad, concuerda temporalmente con otros estudios como la liberación de dopamina en el estriado de la rata (medida mediante su metabolito: ácido homovanílico), que mostró niveles más altos en horas de obscuridad, y que correlacionaba además con el incremento de la actividad de los animales (O'Neill y cols. 1982). De este modo, resulta lógico que el incremento tanto de la liberación de dopamina, como en la densidad de los receptores dopaminérgicos en el estriado de la rata, se encuentren relacionados con la actividad locomotora. Sin embargo, la diferencia en la hora en que aparecen los picos de receptores en otras regiones, particularmente el complejo amigdalino, permite sospechar que la actividad dopaminérgica en el complejo amigdalino pudiesen estar relacionada con funciones distintas de la locomoción.

La técnica de medición de receptores mediante el pegado de [³H]-espiroperidol no permite diferenciar a los receptores de la familia D₂, (D₂, D₃ y D₄), de modo que las variaciones diurnas que observamos pudiesen deberse a uno o varios de los subtipos de los receptores de la familia D₂. Solamente para el receptor D₂ se ha encontrado una expresión heteróloga del mismo receptor (Grandy y cols. 1994). Sin embargo, el no haber encontrado grandes diferencias en la constante de disociación (K_d) sugiere que las

variaciones ocurren con base en un solo receptor, o con base en cambios sincrónicos de todos los receptores de ésta familia. Para diferenciar entre los diferentes tipos de receptor de la familia D₂, sería necesario realizar estudios con métodos que permitieran diferenciar de una manera específica cada receptor, tales como el uso de radioligandos de mayor especificidad para un subtipo de receptor particular, o una aproximación experimental diferente (anticuerpos, sondas de RNA mensajeros, etc.).

Por otro lado, el que los receptores de diferentes sistemas dopaminérgicos presenten oscilaciones con distinto perfil temporal dependiendo de la región en la que hayan sido caracterizadas, permite sugerir la existencia de mecanismos de regulación selectivos en cada región de neuronas dopaminoceptivas (postsinápticas), lo que les brindaría la posibilidad de regular la recepción de la señal, adecuándola a un ritmo previamente establecido. Aunque no tenemos elementos claros para distinguir si las variaciones diurnas que medimos en los receptores dopaminérgicos de la familia D₂, fue en los receptores pre- o post-sinápticos, nos inclinamos hacia la posibilidad de que los receptores medidos fueron fundamentalmente postsinápticos, debido a que el mecanismo para la catalepsia producida por haloperidol, es el bloqueo de los receptores dopaminérgicos en el estriado. El uso prolongado de estos medicamentos produce un bloqueo continuo a largo plazo de estos receptores, activa al mecanismo de compensación postsináptico para la sobreproducción de los receptores, lo que se traduce en hipersensibilidad a los agonistas dopaminérgicos (Kaplan y Sadock, 1991). Una tercera razón que apoya el que los receptores medidos fueran los postsinápticos, es la diferencia regional encontrada. Como el origen de las células dopaminérgicas está en la misma región cerebral (substancia nigra compacta), si los receptores que medimos fuesen los presinápticos, hubiese sido difícil encontrar las diferencias regionales en las variaciones diurnas de estos receptores.

Los datos de la interacción ligando-receptor que indican claramente que los cambios están en la densidad de los receptores (B_{max}), sugieren que las variaciones temporales de los receptores pudiesen ocurrir desde los mecanismos para la síntesis del receptor, ya sea transcripcionales (variaciones cíclicas de los RNA mensajeros que codifican para la síntesis de la proteína-receptor), o en el mecanismo de traducción (síntesis de la proteína - receptor), o en las reacciones que activen la expresión funcional de estos receptores. Sin

embargo, actualmente no se ha estudiado si los receptores son sintetizados preferentemente a una hora del día, o si la síntesis es continua y las variaciones en la densidad de los receptores es por cambios en el mecanismo para su inserción funcional en la membrana de la sinapsis. Aunque los receptores dopaminérgicos han sido clonados y se conoce el modo de regulación para la síntesis de los receptores, estos estudios han sido realizados considerando al receptor como una molécula estable, o planteado de otro modo, con el paradigma homeostático que no considera cambios temporales para una mejor adaptación.

El hecho de que las variaciones diurnas tengan como mecanismo un cambio en la densidad de receptores parece más costoso biológicamente que una regulación en la afinidad del receptor, lo que se conseguiría mediante fosforilación o procesos con menor costo energético que la síntesis de proteínas. Para estudiar más a fondo las posibles causas de que la variación de los receptores dopaminérgicos sea en la densidad más que en la afinidad de estos, podrían medirse los niveles de los RNA mensajeros cada tres horas (o un lapso similar) buscando si existen variaciones en su concentración a lo largo del día. En el caso que hubiese variaciones, la probable causa se inclinaría hacia una regulación en el genoma. Es conocido que la transcripción está finamente regulada por promotores y represores, que generalmente obedecen a señales provenientes del exterior, como segundos mensajeros o iones.

Otra posibilidad es que las variaciones estén relacionadas con cambios en la traducción. Esto requeriría posiblemente de un anticuerpo que reconociera un epitope específico de los precursores de estos receptores. Una tercera posibilidad es que la producción de receptores sea continua y alimente una poza de estos. Es conocido que los receptores pueden estar secuestrados de los sitios funcionales por mecanismos de internalización o fragmentos de membrana que se invaginan formando vesículas con receptores no funcionales precisamente por su ubicación. El mecanismo para incorporar los receptores a la membrana sináptica pudiese también tener un ritmo.

Finalmente, debemos considerar la posibilidad de que las variaciones de los receptores dopaminérgicos D₂ tengan relación con su degradación. Sin embargo, se conoce poco de los mecanismos de degradación de estos receptores (Grandy y cols. 1994; Hall 1994).

c) Conducta

Una de las primeras observaciones relevantes acerca de que los modelos animales podrian generar información importante relacionada con el tratamiento de trastornos psiquiátricos, surgió al observar que la reserpina (alcaloide que depleta monoaminas) producía en animales una triada caracterizada por ptosis palpebral, hipotermia y catalepsia (Costa y cols. 1960; Ferreira y cols. 1998). Si bien estos signos nada tienen que ver con un cuadro psiquiátrico, abrieron la posibilidad de monitorear la actividad monoaminérgica central a través de observaciones relativamente simples. Esto ha sido de gran valor al probar diferentes drogas en animales, por la predicción que brindan de su posible efecto al ser utilizadas en los seres humanos. Debido a lo anterior, la catalepsia fue considerada como un requisito necesario para cualquier sustancia que pudiese presentar un efecto antipsicótico en humanos (Ortega-Soto y cols. 1991; Kaplan y Sadock 1991; Uriarte 1988). Actualmente, la catalepsia no se considera como predictora del efecto antipsicótico en las drogas en desarrollo como antipsicóticos, pero sí de los efectos colaterales de éstas.

Diferentes evidencias experimentales habían demostrado la relación causal de la catalepsia con el bloqueo de la actividad dopaminérgica en el estriado. Debido a esto, para evaluar si los cambios de los receptores dopaminérgicos D_2 modificaban el efecto de un antagonista D_2 (haloperidol), estudiaríamos la correlación temporal entre las variaciones de la densidad de receptores y la catalepsia.

La catalepsia había sido medida con diferentes paradigmas experimentales, como el método de la barra, el de los corchos, la gradilla inclinada, en una escalera (Morelli y DiChiara, 1985; Sanberg y cols. 1988; Wandenberg, 1996). Inicialmente, utilizamos el método de la barra con una dosis de haloperidol de 1.2 mg/kg de peso, que consideramos que estaba entre las dosis más frecuentemente reportadas (1 a 2 mg/kg de peso). La medición de catalepsia con esa dosis y el método de la barra, generó una curva de variaciones diurnas que tenía tiempos mayores de catalepsia en horas de luz, lo que coincidió con el perfil de variaciones reportado por Campbell y cols. (1982). Sin embargo, con esta dosis los animales mostraron signos como apoyar la cabeza sobre la barra, mantener los ojos

cerrados, e inmovilidad de larga duración (más de 300 segundos), lo que sugería la participación de otras conductas como sedación o sueño que podían modificar la medición de la catalepsia. Esto pudiera significar que tuviéramos la participación de conductas diferentes además de la catalepsia en la curva de variaciones diurnas. La curva inicial dosis-respuesta de la catalepsia producida por el haloperidol utilizando el método de la barra, mostró que la dosis que habíamos utilizado de 1.2 mg/kg de peso era casi diez veces mayor a la que encontramos como dosis efectiva media (ED_{50} entre 0.1 a 0.2 mg/kg de peso, dependiente de la hora; figura 24).

Por otro lado, los animales inyectados con 1.2 mg/kg de peso de haloperidol, la única conducta que presentaron en el campo abierto fue de inmovilidad total, de modo que todos los animales tuvieron valores de cero. Esto aumentó la sospecha de que con esta prueba se tuvo una medición indirecta de sedación además de la catalepsia. Nagayama y cols. (1979; 1987) midieron la sedación como el tiempo de inmovilidad producido por haloperidol, en condiciones de campo abierto (registro instrumental). Para determinar las variaciones diurnas del efecto de sedación, utilizaron una dosis de haloperidol de 0.5 mg/kg de peso, encontrando el pico en horas de luz (12:00 h) y el valle en horas de obscuridad (00:00 h). El perfil de variaciones diurnas de la sedación producida por haloperidol (0.5 mg/kg) fue muy semejante a la curva de variaciones diurnas de la catalepsia producida por haloperidol (1 mg/kg de peso) que reportaron Campbell y Baldessarini (1982), y a la que también se parecen nuestros datos de la catalepsia (o sedación) en la barra (haloperidol 1.2 mg/kg). Campbell y cols. (1982) también encontraron mayor duración de catalepsia producida por una dosis menor de haloperidol (0.5 mg/kg) en horas de luz (16:00 h) y menor duración en obscuridad (04:00 h).

El método de medición de catalepsia en corchos (Morelli y DiChiara, 1985), presentó varias ventajas sobre la medición en la barra. Con el método de la barra, los controles presentaron tiempos de catalepsia que iban aumentando con las repeticiones. Este fenómeno ha sido reportado y ha motivado que varios autores consideren la posibilidad de que los animales presenten un efecto de aprendizaje al emitir la respuesta conductual esperada (Sanberg, 1980; 1988). En la prueba de catalepsia en los corchos, ninguno de los animales control (inyectados con sol. salina) presentó catalepsia bajo ninguna circunstancia;

de este modo, con la medición de la catalepsia en corchos eliminamos la posible interferencia del aprendizaje en nuestros resultados. Por otro lado, los tiempos de catalepsia que registrábamos en los corchos era de segundos, siendo raros los animales que duraban más de un minuto manteniendo la postura cataléptica (figura 14). Otra diferencia importante fue que la catalepsia medida en la barra permitía que el animal tuviese movimientos, ya que el reloj era detenido cuando el animal ponía las dos patas delanteras en el piso, mientras que la catalepsia en los corchos media inmovilidad, el criterio para detener al reloj era que la rata hiciese cualquier movimiento propositivo (excepto sacudidas o contracciones sin modificar la postura). La catalepsia en corchos parece relacionarse con la iniciación del movimiento, mientras que la catalepsia en la barra puede tener relación con la corrección de la postura impuesta.

Con el método de los corchos, los tiempos de catalepsia mostraron variaciones diurnas significativas en la duración de la catalepsia producida por haloperidol (Figura 26). El pico de catalepsia lo encontramos en horas de obscuridad, a la misma hora que el pico del pegado de [^3H]-espiroperidol a los receptores dopaminérgicos D_2 del estriado (00:00 h), lo que sugiere que las variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos D_2 modulan el efecto sobre el movimiento que produce el haloperidol (Torner y cols. 1998). Nuestros resultados fueron diferentes de los resultados de los de Campbell y cols. (1982) lo que puede deberse a varias causas, estos autores utilizaron ratas Sprague-Dawley, a las que les inyectaron una dosis sustancialmente mayor de haloperidol (0.5 a 1 mg/kg). Metodológicamente, la catalepsia reportada por Campbell y cols. (1982) fue medida con la prueba de la barra, que pudo haber medido otras conductas indirectamente (como sedación) además de catalepsia. Por otra parte, Campbell y cols. (1982) buscaron la causa de las variaciones diurnas de la catalepsia midiendo los receptores dopaminérgicos D_2 utilizando [^3H]-espiroperidol, para lo cual, escogieron solamente los puntos de las 04:00 y las 16:00 horas (pico y valle de sus variaciones de catalepsia), sin encontrar diferencias en el pegado del radioligando a los receptores, lo que fue interpretado como que las variaciones diurnas de catalepsia inducida por un antagonista D_2 (haloperidol), no tenía relación con las variaciones de estos receptores. Sin embargo, el no haber encontrado diferencias en dos puntos no significa que no las hubiese, sino que seleccionaron puntos que por su ubicación

en las variaciones diurnas, no tenían diferencias entre sí. Las horas que seleccionaron Campbell y cols. (1982) no corresponden a pico y valle del pegado de [³H]-espiroperidol a los receptores D₂ del estriado (Kafka y cols. 1982; Torner y cols. 1998). Campbell y cols. (1982) no midieron el perfil de variaciones diurnas de los receptores D₂. Por otro lado, Campbell y cols. (1982) sí encontraron diferencias dependientes del tiempo en las concentraciones de haloperidol en la sangre y el cerebro. No obstante, Nagayama y cols. (1979) hicieron la misma determinación sin encontrar tales diferencias en las concentraciones séricas ni cerebrales de haloperidol. En el caso de nuestro estudio nosotros no medimos las variaciones diurnas de las concentraciones de haloperidol, por lo que la controversia entre los reportes de Campbell y cols. (1982) y Nagayama y cols. (1979; 1987) continúa. En nuestros resultados, la correlación del perfil de variaciones diurnas de catalepsia con el perfil de variaciones diurnas de los receptores D₂ en el pegado de [³H]-espiroperidol sugiere que la variación diurna de estos receptores juega un papel importante en la farmacodinamia del haloperidol (Torner y cols. 1998).

Por otro lado, las variaciones diurnas en la generación de catalepsia por haloperidol, tuvieron un perfil diferente a las variaciones diurnas tanto de hipocinesia como de la disminución de la exploración vertical. Estas conductas pudieron ser medidas con una dosis de 0.13 mg/kg de haloperidol. El perfil temporal de la locomoción presentó semejanzas con la exploración vertical (Figuras 28 y 29); ambas mostraron un pico a las 06:00 horas y el valle a las 21:00 horas, aunque en la exploración vertical se encontró un segundo pico hacia las 15:00 horas. La amplitud en la variación de estas conductas fue mayor al 100 % de su valor promedio. Las diferencias en las variaciones diurnas de las conductas producidas por haloperidol, confirmaron la hipótesis de que las variaciones de los receptores dopaminérgicos D₂ pueden producir variaciones en el efecto de los fármacos que actúan sobre ellos. Más aún, la existencia de diferentes ritmos en regiones cerebrales distintas podría modular los ritmos de conductas producidas farmacológicamente (por agonistas o antagonistas).

Una posible explicación del hallazgo de diferentes perfiles de variaciones en los efectos conductuales producidos por el haloperidol, sería que este fármaco actuase sobre diferentes receptores dependiendo de la dosis a la que se administre. De este modo, con

dosis bajas se obtendría fundamentalmente el efecto sobre los receptores dopaminérgicos D_2 , que son los de mayor afinidad por este fármaco, mientras que al aumentar la dosis se obtendría su efecto en otro tipo de receptores como los dopaminérgicos D_1 , o los serotoninérgicos u otros (revisión de Seeman 1980; Cooper y cols. 1991). De este modo, al estudiar las variaciones diurnas de la catalepsia producida por dosis bajas de haloperidol, se obtendría su efecto mediante su acción fundamentalmente sobre los receptores D_2 del estriado, mientras que con dosis mayores se obtendría su efecto en otros receptores, y posiblemente en otras regiones cerebrales. Esta sugerencia se deriva de la correlación entre los receptores D_2 y la catalepsia producida por haloperidol en dosis de 0.13 mg/kg. Las dosis mayores pueden producir una conducta susceptible de ser medida como catalepsia, pero en la que posiblemente participen otras conductas como la sedación.

Una evidencia que apoya que la funcionalidad de las variaciones diurnas de receptores se obtiene con dosis bajas, fue documentada mediante la estimulación de la ingesta de alimento administrándole clonidina a la rata, efecto que está mediado por los receptores α_2 -adrenérgicos en el núcleo paraventricular (McCabe y cols. 1984). La prueba funcional fue realizada cuando se le aplicaron dosis bajas de clonidina a las ratas para estimular la ingesta de alimento; efecto que solamente fue observado al inicio de la fase de oscuridad, cuando los receptores α_2 -adrenérgicos son más abundantes, mientras que al inicio de la fase de luz las dosis bajas de clonidina no estimularon la ingesta de alimento, en este momento la densidad de los receptores α_2 -adrenérgicos es bajo (Krakeuchi y cols. 1985). Nuestros resultados son similares. La dosis baja de haloperidol permite encontrar una correlación temporal entre las variaciones diurnas de los receptores del estriado y las variaciones de la catalepsia producida por haloperidol. Con las dosis bajas el haloperidol tendría su efecto sobre los receptores de mayor afinidad (los D_2 dopaminérgicos), mientras que con dosis mayores sería factible que la concentración tisular del medicamento fuese lo suficientemente alta para actuar sobre otros sistemas de neurotransmisión.

De acuerdo con nuestros resultados, las variaciones diurnas que encontramos en los receptores dopaminérgicos están relacionadas directamente con su funcionalidad, precisamente por la correlación que encontramos entre la catalepsia y los receptores del estriado. Sería deseable tener pruebas específicas para estudiar la funcionalidad (y las

variaciones funcionales) de los receptores dopaminérgicos de otras regiones como la corteza frontal, o el sistema límbico.

La relación funcional de las variaciones diurnas que se han reportado en los receptores de diferentes neurotransmisores, ha sido difícil de establecer, particularmente cuando las variaciones fueron caracterizadas en preparaciones de membranas obtenidas de cerebro completo (Tabla III). Pocos estudios han encontrado una correlación funcional en la variación de los receptores, como es el caso de los opiáceos. Se había reportado que el pegado de [^3H]-morfina (Lee y cols. 1984) o [^3H]-naloxona (Naber y cols. 1981) a los receptores a opiáceos, era mayor en la fase de oscuridad manteniendo los animales en ciclos luz-oscuridad 12:12. Por otro lado, los estudios conductuales habían documentado que los estímulos nociceptivos en la cola o en las patas de la rata, presentan mayor sensibilidad en la fase de oscuridad. El estudio que correlacionó la mayor sensibilidad al dolor al final de la fase de oscuridad, fue publicado por Hendrie y cols. (1983), quienes además encontraron la mayor densidad de receptores opiáceos (medidos mediante el pegado de [^3H]-naloxona) a la misma hora.

d) Discusión general

El haber encontrado diferente perfil de variaciones diurnas en cada una de las regiones cerebrales estudiada, es una manifestación de ritmos con diferente ángulo de fase, lo que tiene implicaciones cronobiológicas como la posible regulación por varios osciladores, *versus* diferencias en el retraso del efector, en los mecanismos que regulen la densidad de los receptores en cada una de las regiones cerebrales. La posibilidad de que la regulación de los receptores dopaminérgicos D_2 esté dada por un solo oscilador, es apoyada por la evidencia de que la lesión del núcleo supraquiasmático elimina las oscilaciones de todos los receptores cuando los animales son sometidos a condiciones de iluminación constantes (Wirz-Justice 1986). Sin embargo, estos estudios fueron realizados utilizando preparaciones de membranas de cerebro completo. Por otro lado, la dopamina está relacionada con la conducta de anticipación al alimento, que ha sido caracterizada como regulada por un oscilador diferente del núcleo supraquiasmático (Escobar y cols. 1998).

De este modo, las variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos D₂ pudieran estar reguladas por uno o más osciladores del organismo. Esto implica, además, que los receptores de una misma familia tienen una regulación temporal independiente, lo que permitiría el funcionamiento individual de cada región cerebral dopaminérgica, relacionada con su participación en diferentes procesos o conductas.

Finalmente, nuestros resultados muestran que los efectos que produce el haloperidol pueden presentar variaciones temporales, dependiendo de las variaciones diurnas de los receptores del sistema que se encuentre involucrado en su regulación. Estos resultados tienen varias aplicaciones clínicas posibles. Heurísticamente, le dan coherencia a las diferencias que se encontraron administrando neurolépticos en dosis nocturnas contra dosis repartidas (DiMascio y Schader, 1969; Uriarte y Ruther, 1976; Torner y cols. 1995). Las diferencias temporales de los receptores dopaminérgicos que tienen lugar en varias regiones del sistema nervioso, permite suponer que podría ser utilizada para explorar la posibilidad de diseccionar o seleccionar cronobiológicamente el efecto deseado con el uso de bloqueadores dopaminérgicos D₂ en el tratamiento antipsicótico o el "tranquilizante".

A pesar de la evidente diferencia entre la rata y el humano, los resultados en animales tienen posibilidades de interpretación que sería interesante poner a prueba mediante estudios clínicos rigurosos para definir si las variaciones diurnas del efecto de los antipsicóticos permite diferenciar el efecto terapéutico de los efectos colaterales. Por otro lado, otro tipo de trastornos en los que se encuentran involucrados los receptores dopaminérgicos D₂ como la enfermedad de Parkinson, pudiesen también ser abordados mediante un enfoque cronobiológico, tanto para los efectos del tratamiento, como otro tipo de abordajes.

CONCLUSIONES

- 1.- Los receptores D2 dopaminérgicos medidos mediante su interacción con [3H]-espiroperidol, presentaron variaciones diurnas.
- 2.- Las variaciones diurnas de los receptores D2 dopaminérgicos tienen diferente patrón de variaciones, dependiendo de la región en la que se encuentren ubicados.
- 3.- Las variaciones diurnas de los receptores D2 dopaminérgicos se relacionan con cambios en la densidad de los receptores (B_{max}) más que con cambios en su afinidad (K_d).
- 4.- Las variaciones diurnas de los receptores D2 dopaminérgicos del estriado, mostraron una correlación temporal con la catalepsia producida por haloperidol a dosis bajas (0.13 mg/kg de peso).
- 5.- El estudio de las diferencias que tienen las variaciones diurnas de los receptores dopaminérgicos, puede tener relevancia para comprender el funcionamiento del sistema nervioso, así como en su aplicación clínica para la optimización de la terapéutica de la esquizofrenia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar-Roblero R, García-Hernández F, Aguilar R, Arankowsky-Sandoval G, y Drucker-Colín R. (1986): Suprachiasmatic nucleus transplants functions as an endogenous oscillator only in constant darkness. *Neuroscience Letters* 69: 47-52.

Aguilar-Roblero R. (1989): Estudios morfológicos y funcionales sobre trasplantes del núcleo supraquiasmático fetal. Tesis de Doctorado.

Aguilar-Roblero R, Escobar C, Torner C, Granados-Fuentes D, Salazar-Juarez A, Caldeas I. (1997) Mecanismos generales de regulación fisiológica: acoplamiento de sistemas en oscilación. En el libro: *Actualización en Fisiología*. Editado por la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México, pp. 241 – 254.

Aréchiga H. (1975): La problemática de los ritmos biológicos. En: *Ritmos circadianos*. Editado por la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México, pp. 1 – 34.

Arnt J (1982): Pharmacological specificity of conditioned avoidance response inhibition in rats: Inhibition by neuroleptics and correlation to dopamine receptor blockade. *Acta Pharmacol Toxicol* 51: 321 - 329.

Aschoff J. (1981): A survey on biological rhythms. En el libro: *Handbook of Behavioral Neurobiology* 4: *Biological Rhythms*. Edit: Plenum, New York, pp. 3-10.

Benet LZ, Mitchell JR, y Sheiner LB. (1991): Farmacocinética: dinámica de la absorción, distribución y eliminación de los fármacos. En el libro: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Edits: Goodman AG, Rall TW, Nies AS, y Taylor P. Editorial Médica Panamericana. México, pp. 381 - 432.

Bernard C. (1926): *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*. Paris:Lafuma.

Björklund A, y Lindvall O. (1984): Dopamine containing systems in the CNS. En el libro: *Handbook of chemical neuroanatomy*. Vol. 2: *Classical transmitters in the CNS*. Björklund A y Hokfelt T (editores); Elsevier, New York, pp. 55 – 122.

Berreta S, Robertson HA, y Graybiel AM. (1992): Dopamine and glutamate agonists stimulate neuron-specific expression of c-Fos-like protein in the striatum. *J Neurophysiol* 68: 767-777.

Birkmayer W. y Hornykiewicz O. (1961): The effect of (3, 4-dihydroxy-phenil)-L-alanine (dopa) on akinesia in Parkinson's disease. *Wien Klin Wochenschr*. 73: 787-788.

Blaschko H. (1939): The specific action of L-dopa decarboxylase. *J Physiol (London)* 96: 50P-51P.

Bradford H. (1986): Libro: *Chemical neurobiology. An introduction to neurochemistry*. WH Freeman Co, New York.

Brennan MJW, Volicer L, Moore-Ede MC, y Borsook D. (1985): Daily rhythms of benzodiazepine receptor numbers in frontal lobe and cerebellum of the rat. *Life Sci* 36: 2333-2337.

Bünning E. (1935): Zur Kenntnis der erblichen Tagesperiodizität bei den Primärblättern von *Phaseolus multiflorus*. *Jahrb wiss Botan* 81: 411-418.

Bünning E. (1963): *Die physiologische Uhr*. Berlin: Springer-Verlag (2nd edition).

Burt D.R.; Creese I; y Snyder S.H. (1976): Properties of [³H]-haloperidol and dopamine binding associated with dopamine receptors in calf brains membranes. *Mol Pharmacol* 12: 800-812.

Campbell A, y Baldessarini RJ. (1981): Tolerance to behavioral effects of prolonged administration of haloperidol. *Life Sci* 29: 1341 - 1346.

Campbell A y Baldessarini RJ. (1982): Circadian changes in behavioral effects of haloperidol in rats. *Psychopharmacol* 77: 150 - 155.

Campbell A, Herschel M, Sommer B, Madsen RJ, Cohen BM, y Baldessarini RJ. (1982): Circadian changes in the distribution and effects of haloperidol in the rat. *Neuropharmacology* 21:663-669.

Cannon WB (1929): Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 9:399-431.

Carlsson A. (1959); The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol. Rev.* 11: 490 - 493.

Carlsson A. (1988): The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1(3):179 - 188.

Cenci MA, Campbell K, Victorin K, y Bjorklund A. (1992): Striatal c-fos induction by cocaine or apomorphine occurs preferentially in output neurons projecting to the substantia nigra in the rat. *Eur J Neurosci* 4:376-380.

Chiodo LA, y Benjamin SB (1983): Typical and atypical neuroleptics: differential effects of chronic administration on the activity of A9 and A10 midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 3: 1607 - 1619.

Cole AJ, Bhat RV, Patt C, Worley PF, y Baraban JM. (1992): D₁ dopaminereceptor activation of multiple transcription factor genes in rat striatum. *J Neurochem* 58: 1420-1426.

Cooper JR, Bloom FE, y Roth RH. (1991): Dopamine. En el libro: The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press. Oxford, pp. 285 - 337.

Costall B y Naylor RJ. (1973): Neuroleptic and non-neuroleptic catalepsy. *Arzneimittelforschung* 23: 674 - 683.

Cornélissen G, Halberg E, Bakken E, Delmore P, y Halberg F. (1993): Libro: Toward phase zero preclinical and clinical trials: chronobiologic designs and illustrative applications.

Costa E, Garattini S, y Valzelli L. (1960): Interactions between reserpine, chlorpromazine and imipramine. *Experientia* 16: 461 - 463.

Creese I; Burt D.R.; y Snyder S.H. (1975); Dopamine receptor binding: differentiation of agonist and antagonist states with [³H]-dopamine and [³H]-haloperidol. *Life Sciences* 17: 933 - 1001.

Creese I; Burt D.R.; y Snyder S.H. (1976): Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 192: 481 - 483.

Creese I, Schneider R, y Snyder SH. (1977): [³H]-Spiroperidol labels dopamine receptors in pituitary and brain. *Eur J Pharmacol* 46: 377 - 381.

Czeisler CA, Kronauer RE, Mooney JJ, Anderson JL y Allan JS. (1987): Biologic rhythm disorders, depression and phototherapy. A new hypothesis. *Psychiat Clin North Am* 10(4): 687 - 709.

Damba DB. (1990): Rythmes comportementaux et biologiques des schizophrènes. *L'Encephale*, XVI: 3 - 12.

Dávila R, Zumárraga M, Andía I, y Friedhoff AJ. (1989): Persistence of cyclicity of the plasma dopamine metabolite, homovanillic acid, in neuroleptic treated schizophrenic patients. *Life Sciences* 44:1117-1121.

DiLauro A, Giannini CP, Muscettola G, Greco AM, y DeFrancis P.(1986): No circadian rhythms of serotonergic alpha-, beta-adrenergic and imipramine binding sites in brain regions. *Chronobiol Int* 3: 123-126.

DiMascio A.; y Shader R.I. (1969): Drug administration schedules. *Am J. Psychiatry* 126(6): 796-801.

Dohlman HG, Thorner J, Caron MC, y Lefkowitz RJ. (1991): Model systems for the study of seven-trans-membrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 60: 653 - 688.

Dragunow M, Robertson GS, Faull RLM, Robertson HA y Jansen K. (1990): D₂ dopamine receptor antagonists induce Fos and related proteins in rat striatal neurons. *Neuroscience* 37: 287-294.

Drucker-Colín R, Aguilar-Roblero R, García-Fernández F, Fernández-Cancino F, y Rattoni FB. (1984): Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: Diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res* 311:353-357.

Duvoisin RC. (1976): Parkinsonism: animal analogues of the human disorder. En el libro: *The basal ganglia*. Yahr MD (edit). Raven Press, New York pp. 293-303.

de Mairan JJ, (1729): *Observation botanique*. Paris: Histoire de l'Academie Royale des Science pp. 35. Citado por Reinberg (1992).

Escobar C, Niaz-Muñoz M, Encinas F, y Aguilar-Roblero R. (1998): Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol* 274 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 43): R1309 - R1316.

Eubanks JH, Altherr M, Wagner-McPherson C, McPherson JD, Wasmuth JJ, et al., (1992): Localization of the D5 dopamine receptor gene to human chromosome 4p15.1-p15.3, centromeric to the Huntington's disease locus. *Genomics* 12: 510 - 516.

Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. (1997): *Principles of neuropsychopharmacology*. Sinauer Associates Inc. New York.

Ferreira-Nuño A, Bonilla-Jaime H, Becerril-Cortés N, y Velázquez-Moctezuma J. (1998): Modelos animales de depresión. En el libro: *Bases neurobiológicas y ecológicas de la conducta*. Martínez-Gómez M y Velázquez-Moctezuma J. (Editores). Editado por: Universidad Autónoma de Tlaxcala y Universidad Autónoma Metropolitana, México, pp. 449 - 471.

Friesen WO, y Block GD. (1984): What is a biological oscillator? *Am J Physiol* 246: R847 - 851.

Gallagher JP, Inokuchi H, y Shinnick-Gallagher P. (1980): Dopamine depolarisation of mammalian primary afferent neurons. *Nature (London)* 283: 770-772.

Gelernter J, Kennedy JL, Van Tol HHM, Civelli O, Kidd KK. (1992): The D4 dopamine receptor (DRD4) maps to distal 11p close to HRAS. *Genomics* 13: 208 - 210.

Gerfen CR. (1992): The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 15: 133-139.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr., y Sibley DR. (1990) D₁ and D₂ dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429-1432.

Gillin JC, y Borbeli AA. (1985): Sleep: A neurobiological window on affective disorders. *TINS* 8: 537 - 542.

Giros B, Martres MP, Sokoloff P, y Schwartz JC. (1990): Clonage du gene du recepteur dopaminergique D3 humain et identification de son chromosome. *C R Acad Sci* 311: 501 - 508.

Golombek D. (1993): Ritmos circadianos en humanos: cronofarmacología. *Psiquis* 2: 133 - 138.

Granados-Fuentes D, Salazar-Juárez A, Vergara-Aragón P, Escandon-Calderon J, Vega-González A, Aguilar-Roblero R. (1995): Los ritmos circádicos en mamíferos: conceptos, implicaciones y bases biológicas. En el libro: *Temas selectos de neurociencias*. Universidad Autónoma Metropolitana, México, pp. 433 - 458.

Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni M, Civelly O. (1989): The human dopamine D₂ receptor gene is located on chromosome 11 at q22 - q23 and identifies a TaqI RFLP. *Am J Hum Genet* 45: 778 - 785.

Grandy DK, Bunzow JR, y Civelli O. (1994): The dopamine- D₂ receptor. En el libro: *Dopamine receptors and transporters*. Edit: Niznik HB. Marcel Dekker Inc. New York, pp. 151 - 164.

Graybiel AM. (1990): Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *TINS* 13 (7): 244 - 254.

Griffith JD, Cavanaugh J, Held J. (1972): Dextroamphetamine: evaluation of psychotomimetic properties in man. *Arch Gen Psychiatry* 26: 97 - 100.

Gringrich JA, y Caron MC. (1993): Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Ann Rev Neurosci*. 16: 299-321.

Halberg F (1959): Physiologic 24-hour periodicity in human being and mice, the lighting regimen and daily routine. En: RB Withrow (De.), *Photoperiodicity and related phenomena in plants and animals*. A.A.A.S., pp. 803-878.

Halberg F, EngelM, Hamburger C, y Hillman VD. (1965): Spectral resolution of low-frequency, small-amplitude rhythms in excreted 17-ketosteroids; probably androgen-induced circaseptan desynchronization. *Acta Endocrinologica* 103:1-54.

Hall H. (1994): Dopamine receptors: radioligands for pharmacological and biochemical characterization. En el libro: *Dopamine receptors and transporters*. Edit: Niznik HB. Marcel Dekker Inc. New York, pp. 3 - 36.

Hendrickson AE, Wagoner N, y Cowan WM. (1972): An autoradiographic and electron microscopy study of retino-hypothalamic connections. *Z Zellforsch* 135: 1 - 26.

Hendrie CA, Nohria V, y Rodgers RJ. (1983): Circadian variation in pain sensitivity in rats may be related to alterations in opiate receptor density. *Br J Pharmac* 78: 46P.

Hoffman DC, y Donovan H. (1995): Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability. *Psychopharmacology* 120: 128 - 133.

Holtz P. (1939): Dopa decarboxilase, *Naturwissenschaften* 27:724. Citado por McGeer y cols. (1987).

Hruska P. (1966) Extrapyramidal side effects and therapeutic response. *Arch Gen Psychiatry* 13: 155 - 162.

Hull EM. (1995): Dopaminergic influences on male rat sexual behavior. En el libro: *Neurobiological effects of steroid hormones*. Editado por: Micevych PE y Hammer RP. Cambridge University Press. Cambridge, pp. 234 - 253.

Jacobson W, y Wilkinson M. (1985): Diurnal changes in the opiate control of LH release in prepuberal rats are associated with diurnal variations in hypothalamic but not cortical [³H]-naloxone binding sites. *Soc Neurosci Abstr* 11.

Janowsky DS, El-Yousef MK, Davis JM. (1973): Provocation of schizophrenic symptoms by intravenous administration of methylphenydate. *Arch Gen Psychiatry* 28: 185 - 191.

Jhanwar-Unytl M, Roland CR, y Leibowitz SF. (1986): Diurnal rhythm of α - noradrenergic receptors in the paraventricular nucleus and other brain areas: relation to circulating corticosterone and feeding behavior. *Life Sci* 38: 473-482.

Kafka MS, Wirz-Justice A, y Naber D. (1981): Circadian and seasonal rhythms in α - and β - adrenergic receptors in the rat brain. *Brain Res* 207: 409 - 419.

Kafka MS, Wirz-Justice A, Naber D, Moore RY, Benedito MA. (1982): Circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors. *Fed Proceedings* 42: 2796-2801.

Kafka MS, Benedito MA, Roth RH, Steele LK, Wolfe WW, y Catravas GN. (1986): Circadian rhythms in catecholamine metabolites and cyclic nucleotide production. *Chronobiol Int* 3: 101-115.

Kaplan HI, y Sadock BJ. (1991): Esquizofrenia. En el libro: *Synopsis of Psychiatry. Behavioral sciences and clinical psychiatry*. Edit: Williams & Wilkins, New York. pp. 320-342.

Kaplan HI, y Sadock BJ. (1991): Antipsychotics. En el libro: *Synopsis of Psychiatry. Behavioral sciences and clinical psychiatry*. Edit: Williams & Wilkins, New York. pp. 637-646.

Keefe K, y Gerfen CR. (1995): D₁ - D₂ dopamine receptor synergy in striatum: effects of intrastriatal infusions of dopamine agonists and antagonists on immediate early gene expression. *Neuroscience* 66(4): 903-913.

Kebabian JW, y Calne DB. (1970): Multiple receptors for dopamine. *Nature (London)* 277: 93 - 96.

Kebabian J.W., Petzold G.L., y Greengard P. (1972): Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the "dopamine receptor". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2145-2149.

Kraeuchi K, Wirz-Justice A, Morimasa T, Willener R, y Feer H. (1984): Hypothalamic α - and β - adrenoceptor rhythms are correlated with circadian feeding: evidence from chronic methamphetamine treatment and withdrawal. *Brain Res* 321: 83 - 90.

Kraeuchi K, Wirz-Justice A, Suetterlin-Willener R, y Feer H. (1985): Clonidine stimulation of food intake is circadian phase dependent. *IRCS Med Sci* 13: 561.

Kraeuchi K, Wirz-Justice A, Morimasa T, Suetterlin-Willener R, y Feer H. (1986): Temporal distribution of [³H]-imipramine binding in rat brain regions is not changed by chronic methamphetamine. *Chronobiol Int* 3:127-133.

Lee MS, Kim KW, y Cho KP. (1984): A study on the circadian rhythm of opiate receptor in rat brain. *Korean J Pharmac* 20: 23 - 34.

Lemmer B. (1995): Clinical chronopharmacology: the importance of time in drug treatment. En el libro: *Circadian clocks and their adjustment*. Ciba Foundation Symposium 183, Wiley, Cichester, pp. 235 - 253.

LeMoine C, Normand E, y Bloch B. (1991): Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D₁ dopamine receptor gene. *Proc Nat Acad Sci USA* 88: 4205-4209.

LeMoine C, Normand E, Guitteny AF, Fouque B, Teoule R, y Çbloch B. (1990): Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 230-234.

Lindvall O, y Bjorklund A. (1983): Dopamine- and norepinephrine- containing neuron systems: their anatomy in the rat brain. En el libro: *Chemical Neuroanatomy*. Edit: Emerson PC. Raven Press, New York, pp. 229-255.

Lorenc-Koci E, Wolfart S, y Ossowska K. (1996): Haloperidol-increased muscle tone in rats as a model of Parkinsonian rigidity. *Exp Brain Res* 109: 268 - 276.

Löwry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, y Randall RJ, (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

McCabe JT, DeBellis M, y Leibowitz SF. (1984): Clonidine-induced feeding: analysis of central sites of action and fiber projections mediating this response. *Brain Res.* 309: 85 - 104.

McGeer P.L.; Eccles J.C. y McGeer E.G. (1987): Catecholamine Neurons. En el libro: *Molecular neurobiology of the mammalian brain.* 2nd ed. Plenum Press, New York, pp: 265-315.

Mendoza-Ramírez JL, Aguilar-Roblero R, Zainos-Rosales A, y Drucker-Colin R. (1991): Fetal substantia nigra and adrenal medullary grafts placed contralateral to the nigrostriatal lesion side induce a decrease in turning behavior but not in dopamine receptor density. *Restorative Neurology and Neuroscience* 3: 177-185.

Moore RY, y Lenn NJ, (1972): A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146: 1-46.

Moos F, y Richard P. (1982): Excitatory effect of dopamine on oxytocin and vasopressin reflex in the rat. *Brain Res* 241: 249 - 260.

Morelli M, y DiChiara G. (1985): Catalepsy induced by SCH 23390 in rats. *Eur J Pharmacol* 117: 179-185.

Naber D, Wirz-Justice A, Kafka MS, y Wehr T.A. (1980): Dopamine receptor binding in rat striatum: ultradian rhythm and its modification by chronic imipramine. *Psychopharmacology* 68: 1-5.

Naber D, Wirz-Justice A, y Kafka MS. (1981): Circadian rhythm in rat brain opiate receptor. *Neurosci Lett* 21: 45 - 50.

Nagayama H, Takagi A, Sakurai Y, Yoshimoto S, Nishiwaki K, y Takahashi R. (1979): Chronopharmacological study of neuroleptics. III. Circadian rhythm of brain susceptibility to haloperidol. *Psychopharmacology* 63: 131-135.

Nagayama H, Takagi A, y Takahashi R. (1987): Circadian fluctuation of susceptibility to haloperidol under constant conditions. *Experientia* 43: 625-626.

O'Neill RD, Fillenz M, y Albery WJ. (1982): Circadian changes in homovanillic acid and ascorbate levels in the rat striatum using microprocessor-controlled voltammetry. *Neuroscience Lett* 34: 189-193.

O'Neill RD. (1990): Uric acid levels and dopamine transmission in rat striatum: diurnal changes and effects of drugs. *Brain Res* 507: 267-272.

Ortega-Soto H.; Jasso A.; Ceceña G.; y Hernández C. (1991): La validez y la reproducibilidad de dos escalas para evaluar los síntomas extrapiramidales inducidos por neurolepticos. *Salud Mental* 14(3): 1-5.

Owasoyo JO, Walker CA, y Whitworth UG. (1979): Diurnal variations in the dopamine level of rat brain areas: effect of sodium phenobarbitol. *Life Sci* 25: 119-122.

Pauli JE, y Schieving LE. (1964): Temporal variations in the susceptibility of white rats to pentobarbital sodium and tremorin. *Int J Neuropharmacol* 3: 651 - 658.

Perlow MJ, Gordon EK, Ebert ME, Hoffman HH, y Chase TN. (1977): The circadian variation in dopamine metabolism in the subhuman primate. *J Neurochem* 28: 1381-1383.

Peterson D.P. y Olson G.W. (1963): "Single" versus "multiple" dose administration of tranquilizing medications. *Psychiatric Studies and Projects No 14. Mental Hospital Service of the American Psychiatric Association, Washington, D.C., pp. 2-4.*

Pffefer W. (1875): *Die periodischen bewegungen der blattorgane.* Leipzig: W. Engelmann. Citado por Reinberg (1992).

Pffefer W. (1915): Beiträge zur kenntnis der entstehung der schlatbewegungen. *Abhandl Math Phys Kl König Sächs Ger d Wissensch* 34: 1-154. Citado por Reinberg (1992).

Piccini P, DelDotto P, Pardini C, D'Antonio P, Rossi G y Bonucelli U.(1991): Peggioramento diurno in Parkinsoniani trattati con levodopa. *Riv Neurol* 61(6): 219-224.

Pittendrig CS. (1993): Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* 55: 17-54.

Por SB, y Bondy SC. (1981): Regional circadian variation of acetylcholine muscarinic receptors in the rat brain. *J Neurosci Res* 6: 315 - 318.

Quirasco F, Vidrio H, Luna F, Castañeda C, Mercado J, Arenas J, y Torner C. (1990): Revisión de una muestra de pacientes esquizofrénicos internados en el Hospital Psiquiátrico "Fray Bernardino Alvarez". En: *Trabajos de Investigación. Vol. I, México, pp. 57-66.*

Rao MK, Gross G, Halaris A, Huber G, Marler M, Strebel B, y Brauning P. (1993): Hyperdopaminergia in schizophreniform psychosis: a chronobiological study. *Psychiatry Res* 47: 187 - 203.

Reinberg A. (1992): Concepts in chronopharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32: 51-66.

Reinberg A y Smolensky M. (1993): Introduction to chronobiology. En el libro: "Biological Rhythms and Medicine". Reinberg A y Smolensky M. (Eds). Springer-Verlag, New York, pp. 1 - 21.

Robertson GS, Vincent SR, y Fibiger HC. (1992): D₁ and D₂ dopamine receptors differentially regulate c-fos expression in striatonigral and striatopallidal neurons. *Neuroscience* 49: 285-296.

Sack DA, James SP, Doran AR, Shereer MA, Linnoila M, y Wehr TA. (1988): The diurnal variation in plasma homovanillic acid level persist but the variation in 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol level is abolished under constant conditions. *Arch Gen Psychiatry* 45: 162 - 166.

Sanberg PR, Pisa M, Faulks IJ, y Fibiger HC. (1980): Experiential influences on catalepsy. *Psychopharmacology* 69: 225-226.

Sanberg PR, Bunsey MD, Giordano M, y Norman AB. (1988): The catalepsy test: its ups and downs. *Behav Neurosci* 102: 748-759.

Schieving LE, von Mayersbach H, y Pauly JE. (1974): An overview of chronopharmacology. *Eur J Toxicol* 7: 203 - 227.

Schwartz JH. (1985): Chemical messengers: small molecules and peptides. En el libro: Principles of neural science. 2nd edit. Kandel ER, y Schwartz JH. (Editores). Elsevier, New York, pp. 213 - 225.

Seeman P.; Staiman A.; y Chau-Wong M. (1974): The nerve impulse-blocking actions of tranquilizers, and the binding of neuroleptics to synaptosome membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 190: 123-130.

Seeman P.; Chau-Wong M.; Tedesco J.; y Wong K. (1975): Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 4376-4380.

Seeman P, Westman K, Protiva M, Jilek J, Jain PC, Saxena AK, Anand N, Humber L, y Philipp A. (1979): Neuroleptic receptors: stereoselectivity for neuroleptic enantiomers. *Eur J Pharmacol* 56: 247-251.

Seeman P. (1980); Brain dopamine receptors. *Pharmacological reviews.* 32(3): 229 - 313.

Seeman P, Ulpian C, Wreggett KA, y Wells JW. (1984): Dopamine receptor parameters detected by ³H -spiperone depend on tissue concentration: analysis and examples. *J Neurochem*, 43: 221 - 235.

Seeman P, Van Toel HHM. (1995): Deriving the therapeutic concentrations for clozapine and haloperidol: the apparent dissociation constant of a neuroleptic at the dopamine D₂ or D₄ receptor varies with the affinity of the competing radioligand. *Eur J Pharmacol* 291: 59 - 66.

Sheline YI, Black KJ, Bardgett ME, y Csernansky JG. (1995): Platelet binding characteristics distinguish placebo responders from nonresponders in depression. *Neuropsychopharmacology* 12: 315 - 322.

Snyder S. (1976): The dopamine hypothesis of schizophrenia: Focus on the dopamine receptor. *Am J Psychiatry* 133(2): 197 - 202.

Steiner H y Gerfen CR. (1993): Cocaine-induced c-fos messenger RNA is inversely related to dynorphin expression in striatum. *J Neurosci* 13: 5066-5081.

Sunahara RK, Niznik HB, Weiner DM, Storman TM, Brann MR, et al., (1990): Human dopamine D₁ receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* 347: 80 - 83.

Torner C, Chávez-Juárez JL, Herrera-Estrella M. (1995): Modulación del efecto de los antipsicóticos por el ritmo circadiano de los sistemas dopaminérgicos. En el libro: *Temas Selectos de Neurociencias*. Editado por la Universidad Autónoma Metropolitana, México, pp. 511 - 530.

Torner C, Sánchez-Hurtado A, Aguilar-Roblero R. (1998): Diurnal variations of striatal D₂ dopamine receptors and its relation with haloperidol-induced catalepsy. *Biol Rhythm Res* 29(5): 538 - 545.

Torner C.; Herrera-Estrella M.; Gutiérrez J.A.; Castañeda González C.J.; Aguilar-Roblero R. (enviado): Diurnal variations of extrapyramidal effects produced by haloperidol in schizophrenic subjects. Enviado a *Neuropsychopharmacology*. En revisión.

Uriarte V, y Rüther E. (1976): Diferencias psicopatológicas entre dos esquemas de tratamiento con un neuroléptico (haloperidol). *Psiquiatría* 6(3): 3-6.

Uriarte V. (1988): Antipsicóticos. En el libro: *Neuropsicofarmacología*. Edit: Trillas, México, pp. 39-56.

Ushijima Y, Mizuki Y, y Yamada M. (1995): Development of tolerance and reverse tolerance to haloperidol- and SCH23390- induced cataleptic effects during withdrawal periods after long term treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 50: 259 - 264.

Van Cauter E, Linkowski P, Kerkhofs M, Hubain P, L'Hermite-Balériaux M, Leclercq R, Brasseur M, Copinschi G, y Mendelewicz J. (1991): Circadian and sleep-related endocrine rhythms in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 48: 348-353.

Wandenberg ML. (1996): Serotonergic mechanisms in neuroleptic-induced catalepsy in the rat. *Neuroscience & Behavioral Reviews* 20(2): 325 - 339.

Wirz-Justice A, Kafka M, Naber D, Campbell IC, Marangos PJ, Tamarkin L, and Wehr TA. (1982): Clorgyline delays the phase-position of circadian neurotransmitter receptor rhythms. *Brain Research* 241: 115-122.

Wirz-Justice A, Krakeuchi K, Morimasa T, Willener R, y Feer H. (1983): Circadian rhythm of [³H]-imipramine binding in the rat suprachiasmatic nuclei. *Eur J Pharmacol* 87: 331-333.

Wirz-Justice A. (1986): Circadian rhythms of receptors. *Chronobiol Int (Special Issue)* 3:87-146.

Wirz-Justice A. (1987): Circadian rhythms in mammalian neurotransmitter receptors. *Progress in Neurobiology* 29: 219 - 259.

Zumárraga M, Andía Y, Bárcena B, González-Torres MA, y Dávila R. (1993): Morning variations of plasma homovanillic acid in untreated schizophrenic patients. *J Psychiat res* 27(1): 11-16.

Diurnal Variations of Striatal D2 Dopaminergic Receptors and its Relation with Haloperidol-induced Catalepsy

Carlos Torner, Luis Sánchez-Hurtado and Raúl Aguilar-Roblero

Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. México

ABSTRACT

In spite of the clear evidences for the blockade of dopaminergic D2 receptors as the mechanism of action for haloperidol-induced catalepsy, the contribution of pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects on the diurnal modulation of haloperidol-induced catalepsy is controversial. We studied the diurnal variations of striatal dopamine receptors and its relation with catalepsy diurnal variations. The [³H]-spiperone binding to dopamine receptors had a clear rhythm with a peak at 00:00 to 03:00 h, and a trough at 12:00 to 18:00 h. Haloperidol-produced catalepsy measured with the four-cork test, also showed a clear rhythm, with a peak at 00:00 h and trough at 9:00 h. The dose-response curves at peak and trough of catalepsy had the same ED₅₀ (0.12 mg), with time-related changes in the maximal effect. Similar diurnal variations between catalepsy and dopamine receptor binding, indicate a relevant role of temporal pharmacodynamics of haloperidol on the modulation of its behavioral effects.

KEYWORDS: Circadian rhythms, dopamine receptors, neuroleptics, haloperidol, catalepsia, extrapyramidal effects.

INTRODUCTION

Catalepsy has been considered an accurate predictive behavioral test in animals to evaluate the collateral extrapyramidal symptoms (Parkinsonism) produced by neuroleptic drugs in humans (Duvoisin, 1976; Hoffman & Donovan, 1995; Lorenc-Koci et al., 1996). Symptoms common for catalepsy and Parkinsonism are hypomotility and muscular rigidity. Both are produced by similar doses of neuroleptics, and furthermore, present a similar tolerance phenomena after several weeks of treatment with the same drug (Wolffgramm et al., 1990; Ushijima et al., 1995). A high correlation has been reported between catalepsy and binding of typical neurolep-

Address correspondence to: Raúl Aguilar-Roblero, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-253, México, D.F. C.P. 04510. Fax: +(525) 622-5607; e-mail raguilar@ifisiol.unam.mx

tics to striatal D2 dopaminergic receptors (Kanes et al., 1993; Hitzemann et al., 1994). Also, catalepsy correlates with c-Fos expression in the striatum (Miller, 1990; Robertson & Fibiger, 1992; Coppens et al., 1995). These evidences have lead to the conclusion that catalepsy (and probably Parkinsonism) may depend on the blockade of striatal dopaminergic D2 receptors by typical neuroleptics.

On the other hand, rhythmic variations in the dopaminergic systems have been described, such as brain levels, turnover, and dopamine release from synapses (Perlow et al., 1977; Owasoyo et al., 1979; Carlsson et al., 1980; O'Neill et al., 1982). Naber et al., (1980) and Kafka et al. (1982) reported diurnal variations of D2 dopamine receptor binding in striatal membranes of rats. Time-dependent variations have also been found in the effect of drugs that modify dopaminergic transmission. Nagayama et al. (1979, 1988) described a circadian rhythm in haloperidol-induced sedation, and suggested that the effect depends on the pharmacodynamic of the neuroleptic, since no time-related changes in the plasmatic concentration of haloperidol were found. Notwithstanding, Campbell et al. (1982) reported diurnal variations in catalepsy produced by haloperidol in rats, which were related to changes in the brain concentration of haloperidol. However, they did not find changes in D2 dopamine receptors related with catalepsy rhythmicity, which was ascribed to pharmacokinetic rather than pharmacodynamic aspects of haloperidol. Hence, it is not clear the contribution of pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects on the diurnal modulation of haloperidol-induced catalepsy.

The present work was aimed: (1) to characterize diurnal variations of striatal D2 dopaminergic receptors, (2) characterize diurnal variations of haloperidol-induced catalepsy, (3) establish wheter the rhythm of catalepsy was due either to changes in the potency or the efficacy of haloperidol, and 4) to establish the temporal relation between the rhythm of haloperidol-induced catalepsy and the rhythm of D2 receptors.

MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats (180–200 g) were housed in groups of four, at controlled conditions of temperature and light–dark (LD) cycles ($20 \pm 1^\circ\text{C}$; 12:12; lights on at 07:00 h, 350 lux), with free access to food and water. Rats were maintained in these conditions at least 3 weeks before the experiments in order to allow synchronization of all animals to the LD cycle.

For the measurement of diurnal variations of dopaminergic D2 receptors, animals were sacrificed at 3 h intervals, starting at 00:00 h ($n = 6$ at each time point), to complete a 24 h cycle. Rats were decapitated, the brains were quickly removed and each striatum was carefully dissected maintaining the tissue at 4°C . Dissected blocks of tissue were dry stored at -70°C until use (not longer than 3 months).

Binding assays were performed according to Seeman et al. (1984). Briefly, the striatum from each animal was mechanically disrupted with a Teflon-glass homogenizer (650 r.p.m., 10 strokes), in Triz-HCl 50 mM, pH 7.4 at 0 to 4°C. Homogenates were centrifuged twice at $48,000 \times g$ at 0 to 4°C in the same buffer solution. The final pellet was resuspended in a solution containing Triz-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 2 mM, pH 7.4. The binding assays were performed incubating striatal membrane suspensions (final concentration of 300 μg of protein/ml) in the presence of [^3H]-spiperone 0.1 nM (Amersham; specific activity 125 Ci/mM). Incubations were performed during 30 min at 37°C and stopped by filtration through GF/B filters, using an automated cell harvester (Brandel-Beckman). The filters were rinsed 3 times with a Triz-HCl 50 mM pH 7.4 solution at 4°C. The radioactivity was counted with tritosol cocktail in a scintillation counter apparatus (Beckman LS 6000SE). Proteins were determined by the technique of Löwry et al. (1951). The total [^3H]-spiperone binding was the radioactivity bound to membranes incubated in the presence of 1 μM of [-]-butaclamol and 40 nM of Ketanserine. The unspecific binding was determined by the incubation in the presence of 1 μM of [+]-butaclamol instead of the levo-isomer ([+]-butaclamol, [-]-butaclamol and ketanserine were purchased at ICN Biomedicals Inc.). The stereospecific binding was calculated by subtracting the radioactivity of the unspecific binding to the total binding, expressed as fMol/mg protein.

Catalepsy was measured with the four-cork method according to Morelli and DiChiara (1985). Briefly, one hour after the subcutaneous injection of haloperidol in the neck (Haldol, Janssen Pharmaceutica, México), each rat was placed in an acrylic cage that has four corks of 2 cm diameter, 2.5 cm high, situated 12 cm large and 9 cm wide. Each paw was gently placed on the cork surface, setting the rat in a hyper-extended position and the chronometer was started. Catalepsy was considered finished when any of the paws or the head moved. If the animal did not move, it was left to remain for 120 s in the cataleptic position (maximal score). Four attempts were done with each animal with 30 s intervals. The average duration of catalepsy for each animal was used for further analysis. Control rats received an injection of a similar volume of physiological saline solution. Rats received both saline-diluted haloperidol and saline solution in a counterbalanced design, with an interval of at least one week.

First we obtained a catalepsy dose-response curve by injecting at 15:00 h different doses of haloperidol diluted with physiologic saline solution, ranging from 0.07 to 1.2 mg/kg b.w. ($n = 3$ for each dose). Then, diurnal variations of catalepsy were measured with the ED_{50} dose estimated from the previous dose-response curve (0.13 mg/kg b.w.). Catalepsy was measured at 3 h intervals starting at 00:00 h ($n = 8$ at each time point) to complete a 24 h cycle. Finally, dose-response curves were obtained as described above at 00:00 and 12:00 h ($n = 8$ at

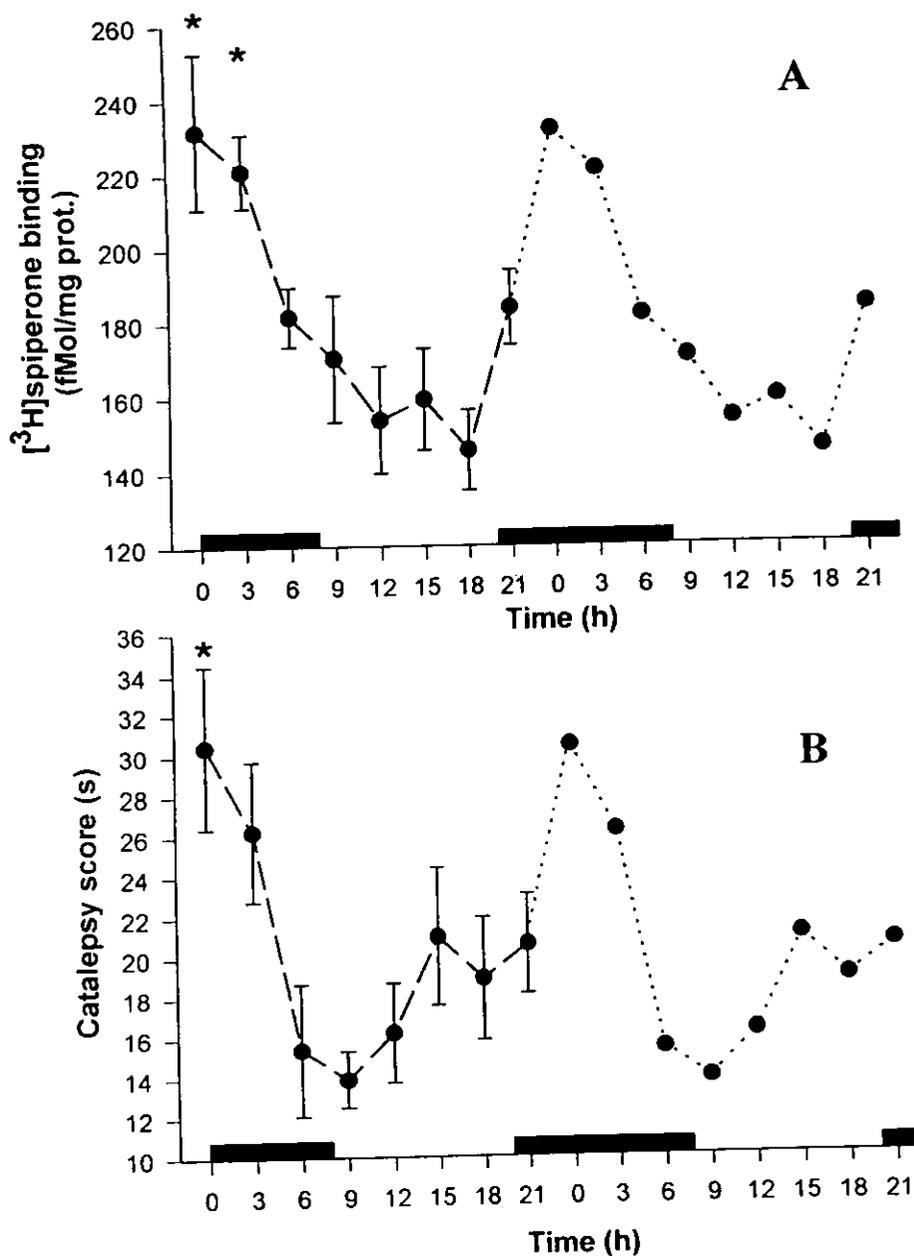


Fig. 1. Diurnal variations of (A) [^3H]-spiperone stereospecific binding to dopamine D2 receptors ($\bar{x} \pm \text{s.e.m.}$; $n = 6$ at each time point), and (B) haloperidol-induced catalepsy scores ($\bar{x} \pm \text{s.e.m.}$; $n = 8$ at each time point). To facilitate visual inspection, the data are repeated on a second cycle (dotted line). The asterisk (*) indicates significant differences to the trough values (Student-Newman-Keuls; $p < 0.05$).

each dose and time point), which correspond to the peak and trough values of the diurnal variations found for haloperidol-induced catalepsy.

In order to determine whether the spiperone binding showed a rhythmic pattern, comparison among the different time points was made by a one way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls *post hoc* test. The same procedure was achieved to determine time-dependent variations of catalepsy. Differences between the dose-response curves were analyzed with one way ANOVA by ranges, and *post hoc* Duncan test. Statistical analysis was performed with the Jandel SigmaStat software (Jandel Corporation).

RESULTS

Stereospecific [^3H]-spiperone binding to D2 dopamine receptors showed a clear and significant diurnal rhythm (Fig. 1A ; ANOVA: $F_{(7,40)} = 3.81, p < 0.005$). A single peak is present during the night from 00:00 to 03:00 h, and the lowest values occur during the day from 12:00 to 18:00 h. The peak (00:00 h) to nadir (18:00 h) amplitude was of 97 fMol/mg of protein. ANOVA *post hoc* analysis with Student-Newman-Keuls procedure showed differences ($p < 0.05$) between the peak and trough values.

Catalepsy response to haloperidol also showed a clear and significant diurnal rhythm (Fig. 1B), with a peak at 00:00 h and its lowest values early in the light phase (9:00 h). The ANOVA analysis showed significant time-dependent variations ($F_{(7,56)} = 2.38; p < 0.01$). The dose-response curves for haloperidol-induced catalepsy showed that the time-related fluctuation was mainly due to changes in the maximal effect produced by the drug ($F_{(7,46)} = 5.25, p < 0.001$; Fig. 2A). The ED_{50} were of 0.12 mg at both times (Fig. 2B). All animals injected with physiological saline solution (control) scored zero in all experiments.

DISCUSSION

Diurnal variations were found in the [^3H]-spiperone stereospecific binding to D2 dopamine receptors, similar to those reported by Naber et al. (1980) and Kafka et al. (1982). The highest [^3H]-spiperone binding activity to dopamine receptors occurred at the middle of the dark hours. This is in agreement with other reported circadian changes of dopaminergic systems in rats, such as dopamine levels (Owasoyo et al., 1979) and nocturnal dopamine release in the striatum and nucleus accumbens of rats (O'Neill et al., 1982).

Haloperidol-produced catalepsy also showed diurnal variations, with a peak at the middle of the dark hours. According to the dose-response curves, these varia-

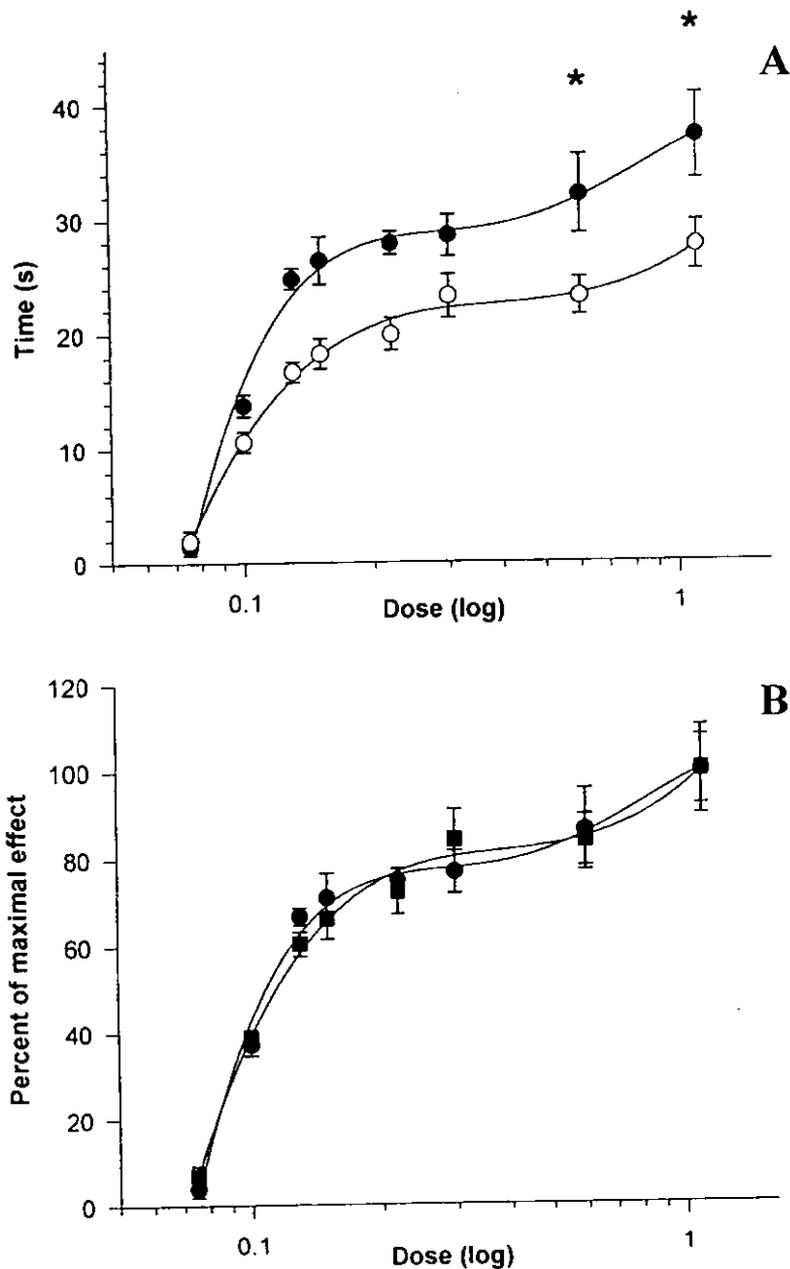


Fig. 2. Dose-response curve for haloperidol-produced catalepsy in rats, catalepsy was measured with different doses of haloperidol at 00:00 h (filled circles) and 12:00 h (open circles). (A) Absolute scores for catalepsy ($\bar{x} \pm$ s.e.m.). Differences in the maximal effect were found between the two times of administration (* = $p < 0.05$, Duncan *post hoc* test). (B) Catalepsy scores converted % of the maximal effect (for each curve) indicated that the ED_{50} at both times of administration were similar (0.12 mg/kg b. w.).

tions were due to changes in the maximal efficacy of haloperidol rather than to changes in its potency. This suggests that the underlying mechanisms may involve changes in the number of receptor rather than their affinity (Ross, 1990).

Campbell et al. (1982) previously reported that the peak of haloperidol-produced catalepsy occurs at the end of the light phase. The differing results may be due to the higher dose of haloperidol (0.5 mg/kg) and to a different behavioral model to assess catalepsy (the horizontal bar test) used by Campbell. In the present study we selected the four-cork test since it has the following advantages: control rats always score zero, it adequately assesses pronounced rigidity and akinesia (Morelli & DiChiara, 1985), and lacks of experience-induced increase in catalepsy scores found with the horizontal bar test (Sanberg et al., 1980).

The catalepsy rhythm found in the present study shows a maximal peak at the middle of the dark hours, similar to that observed in striatal D2 dopamine receptors. The aforementioned suggests that the mechanism of action involved could be related to the blocking of striatal dopamine receptors, and therefore the rhythm of catalepsy seems to be related to the pharmacodynamic of haloperidol, which is in agreement with previous findings of Nagayama et al. (1979). Furthermore, the lack of correlation between catalepsy and variations of DA receptors reported by Campbell et al. (1982) was probably due to the time points selected for receptor measurements: 4:00 a.m. and 4:00 p.m., which corresponded to the peak and trough times of their catalepsy scores. At these time points, neither we nor previous studies found major differences in D2 receptor binding activity (Naber et al., 1980; Kafka et al., 1982).

Our results provide evidence that time-related variations in dopamine D2 receptors are reflected in the behavioral effects elicited by haloperidol. The aforementioned is important for scheduling neuroleptic treatment, in order to prescribe the intake of the drug at the time with minor Parkinsonism side effects and highest antipsychotic effects. Further clinical studies are necessary to identify such time points in humans.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants IN206697 from DGAPA and LN0024-N9607 from CONACyT to RAR, and a fellowship from DGAPA to CT. Catalepsy measurements had the assistance of Alejandro Martínez-Juárez. We also thank José Luis Chavez for skillful technical assistance, and the comments and suggestions from Dra. Carolina Escobar.

REFERENCES

- Campbell A, Herschel M, Sommer B, Madsen JR, Cohen BM, Baldessarini RJ (1982): Circadian changes in the distribution and effects of haloperidol in the rat. *Neuropharmacology* 21: 663-669.

- Carlsson A, Svennerholm L, Winblad B (1980): Seasonal and circadian monoamine variations in human brain examined post mortem. *Acta Psychiatr Scand (Suppl)* 280: 75-85.
- Coppens HJ, Sebens JB, Korf J (1995): Catalepsy, Fos protein, and dopamine receptor occupancy after long-term haloperidol treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 175-182.
- Duvoisin RC (1976): Parkinsonism: animal analogues to the human disorder. In: Yahr MD, ed., *The Basal Ganglia*. New York, Raven Press, pp. 293-303.
- Hitzemann B, Kanes DS, Hitzemann R (1994): Further studies on the relationship between dopamine cell density and haloperidol-induced catalepsy. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 969-271.
- Hoffman DC, Donovan H (1995): Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability. *Psychopharmacology* 120: 128-133.
- Kafka MS, Wirz-Justice A, Naber D, Moore RY, Benedito MA (1982): Circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors. *Federation Proc* 42: 2796-2801.
- Kanes SJ, Hitzemann BA, Hitzemann RJ (1993): On the relationship between D2 receptor density and neuroleptic-induced catalepsy among eight inbred strains of mice. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 538-547.
- Lorenc-Koci E, Wolfarth S, Ossowska K (1996): Haloperidol-increased muscle tone in rats as a model of Parkinsonian rigidity. *Exp Brain Res* 109: 268-276.
- Löwry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Miller JC (1990): Induction of c-fos mRNA expression in rat striatum by neuroleptic drugs. *J Neurochem* 54: 1453-1455.
- Morelli M, DiChiara G (1985): Catalepsy induced by SCH 23390 in rats. *Eur J Pharmacol* 117: 179-185.
- Naber D, Wirz-Justice A, Kafka MS, Wehr TA (1980): Dopamine receptor binding in rat striatum: Ultradian rhythm and its modification by chronic imipramine. *Psychopharmacology* 68: 1-5.
- Nagayama H, Takagi A, Sakurai Y, Yoshimoto S, Nishiwaki K, Takahashi R (1979): Chronopharmacological study of neuroleptics. III. Circadian rhythm of brain susceptibility to haloperidol. *Psychopharmacology* 63: 131-135.
- Nagayama H, Takagi A, Takahashi R (1988): Circadian fluctuation of susceptibility to haloperidol under constant conditions. *Experientia* 43: 625-626.
- O'Neill RD, Fillenz M, Albery WJ (1982): Circadian changes in homovanilic acid and ascorbate levels in the rat striatum using microprocessor-controlled voltammetry. *Neurosci Lett* 34: 189-193.
- Owasoyo JO, Waljer CA, Whitworth UG (1979): Diurnal variations in the dopamine level of rat brain areas: Effect of sodium phenobarbital. *Life Sci* 25: 119-122.
- Perlow MJ, Gordon EK, Ebert ME, Hoffman HH, Chase TN (1977): The circadian variation in dopamine metabolism in the subhuman primate. *J Neurochem* 28: 1381-1383.
- Robertson GS, Fibiger HC (1992): Neuroleptics increase c-Fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. *Neuroscience* 46: 315-328.
- Ross EM (1990): Pharmacodynamics: Mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effect. In: Goodman-Gilman A et al., eds., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed. New York, Pergamon Press, pp. 33-48.
- Sanberg PR, Pisa M, Faulks LJ, Fibiger HC (1980): Experiential influence on catalepsy. *Psychopharmacology* 69: 225-226.
- Seeman P, Ulpian C, Wregget KA, Wells J (1984): Dopamine receptor parameters detected by ³H-spiperone depend on tissue concentration: analysis and examples. *J Neurochem* 43: 221-235.
- Ushijima I, Mizuki Y, Yamada M (1995): Development of tolerance and reverse tolerance to haloperidol- and SCH 23390- induced cataleptic effects during withdrawal periods after long-term treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 50: 259-264.
- Wolffgramm J, Rommelspacher H, Buck E (1990): Ethanol reduces tolerance, sensitization, and up-regulation of D2-receptors after subchronic haloperidol. *Pharmacol Biochem Behav* 36: 907-914.