

EVALUACIÓN DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D₄ EN EL NÚCLEO ACCUMBENS SOBRE LA MOTIVACIÓN POR EL ALIMENTO PALATABLE

EVALUATION OF DOPAMINE D₄ RECEPTORS BLOCKADE IN THE
NUCLEUS ACCUMBENS ON MOTIVATION FOR PALATABLE FOOD

—

Refugio Cruz Trujillo¹
refugio.cruz@unach.mx

Juan Gabriel Tejas Juárez²
jgtejas@gmail.com

Juan Manuel Mancilla Díaz³

Rodrigo Erick Escartín Pérez³
escartin@campus.iztacala.unam.mx

1 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS. ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS
SEDE OCOZOCAUTLA, MÉXICO

2 UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO. DIVISIÓN ACADÉMICA
MULTIDISCIPLINARIA DE COMALCALCO, MÉXICO

3 UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA. UNIDAD DE INVESTIGACIÓN INTERDISCIPLINARIA EN
CIENCIAS DE LA SALUD Y EDUCACIÓN, MÉXICO



Para citar este artículo:

Cruz T., Refugio, Tejas J., Juan, Mancilla D, Juan, Escartín P., Rodrigo. (2020). Evaluación del bloqueo de los receptores dopaminérgicos D4 en el núcleo accumbens sobre la motivación por el alimento palatable. *Espacio I+D, Innovación más Desarrollo*. IX(22), 22-34. doi: <http://dx.doi.org/10.31644/IMASD.22.2020.a02>

RESUMEN

A nivel central, la regulación del procesamiento de la información de las propiedades motivacionales y reforzantes del alimento dependen principalmente de estructuras cerebrales como la Corteza del Núcleo Accumbens (CNA), donde la transmisión dopaminérgica juega un papel preponderante al activar receptores dopaminérgicos relacionados con el fenómeno de la recompensa. Estudios anatómicos y neuroquímicos indican que los receptores dopaminérgicos D4 (RD4) se encuentran de forma presináptica y regulan la liberación de glutamato hacia las neuronas GABAérgicas de la CNA. La presente investigación tuvo como objetivo estudiar los efectos del bloqueo farmacológico de los RD4 en la CNA sobre la regulación de la motivación por el alimento palatable (MAP) en ratas macho Sprague Dawley, utilizando un programa de reforzamiento de razón progresiva (PR). De acuerdo con nuestros resultados, el bloqueo de los RD4 con el antagonista L-745,870 (1 µg) en la CNA disminuye el número de palanqueos, el número de reforzadores obtenidos y los puntos de ruptura. Acorde a lo anterior, el bloqueo de los RD4 en la CNA disminuye la MAP, por lo cual podría ser un blanco farmacológico en el tratamiento de patología alimentaria al disminuir las propiedades reforzantes de los alimentos palatables.

Palabras Clave

Núcleo Accumbens Shell; Receptor D4 dopaminérgico; L-745,870; motivación; alimento palatable.

— Abstract—

At the central level, regulation of information processing of the motivational and reinforcing properties of food depends principally on brain structures such as the nucleus accumbens shell (NACS), where dopaminergic transmission plays a preponderant role in activating dopamine receptors related to reward. Anatomical and neurochemical studies indicate that D4 dopamine receptors (D4R) are presynaptically expressed and regulate the release of glutamate to GABAergic neurons in the NACS. The purpose of this study was to evaluate the effects of the pharmacological blockade of D4R in the NACS on the regulation of motivation for palatable food (MPF) in male Sprague Dawley rats using a progressive ratio (PR) reinforcement program. According to our results, blockade of the RD4 with the antagonist, L-745,870 (1 µg), in the NACS decreases the number of levers presses, the number of reinforcers obtained and the breakpoints. Accordingly, the blockade of RD4 in the NACS decreases the MPF, so it could be a pharmacological target in the treatment of feeding pathology by decreasing the reinforcing properties of palatable food.

Keywords

Nucleus Accumbens Shell; Dopamine D4 receptor; L-745,870; Motivation; palatable food.

El consumo de alimentos palatables está asociado al aumento de la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (NA) (Hajnal *et al.*, 2004), región del cerebro que forma parte del circuito de la recompensa y que es el principal sitio de acción de algunas drogas de abuso como la cocaína, la metanfetamina y el alcohol (Kelley *et al.*, 2005). La dopamina puede unirse a cinco subtipos de receptor (D1, D2, D3, D4 o D5), mismos que pueden señalar por proteínas Gs (D1 y D5) o Gi (D2, D3, D4) (Missale *et al.*, 1998). Particularmente el subtipo de receptor D4 (RD4) ha sido vinculado con alteraciones en el procesamiento de los estímulos reforzantes (Ducci & Goldman, 2012), por lo que este receptor es de interés en el presente estudio.

El ARNm que codifica para el RD4 se ha localizado en varias regiones cerebrales como la corteza frontal, la amígdala y el hipocampo (entre otras áreas), núcleos que envían proyecciones glutamatérgicas al NA. De acuerdo con la evidencia experimental, en el NA los RD4 están presentes en los axones y terminales presinápticas que no expresan tirosina hidroxilasa, lo que sugiere que su principal función es la modulación de la liberación de neurotransmisores no catecolaminérgicos (Svingos *et al.*, 2000).

En estudios de liberación de neurotransmisores marcados radioactivamente en explantes de cerebro de rata, se encontró que la activación de los RD4 en el NA disminuye la liberación de glutamato tritiado pero no de GABA y ni dopamina (González *et al.*, 2012). En consistencia con lo anterior, existe evidencia que muestra que la activación de los RD4 produce inhibición de la liberación de glutamato en otras áreas del cerebro como el núcleo paraventricular del hipotálamo (Tejas-Juárez *et al.*, 2014). Asimismo, Bonaventura y colaboradores (2017) encontraron que los RD4 juegan un papel clave en la modulación de la neurotransmisión glutamatérgica corticoestriatal. Adicionalmente, se ha reportado que los ratones *knockout* del RD4 tienen una liberación basal de glutamato estriatal mayor a la de los ratones silvestres (Thomas *et al.*, 2009), por lo que en condiciones fisiológicas, el bloqueo de los RD4 presinápticos en las terminales glutamatérgicas podría explicar el aumento de la liberación no sólo de glutamato hacia las neuronas GABAérgicas, sino también de GABA en las áreas del cerebro a las cuales proyectan estas últimas, entre ellas la corteza del NA (CNA). El aumento de la concentración extracelular de GABA en la CNA induce una intensa hiperfagia de latencia corta (Reynolds & Berridge, 2002). Dado lo anterior, la participación de los RD4 parece ser fundamental para la regulación de la actividad en el circuito de la recompensa y, en consecuencia, en el presente estudio se propone la hipótesis de que la transmisión dopaminérgica mediada por los D4R constituye un elemento clave para que aumente el consumo de alimento palatable vía el aumento de sus propiedades reforzantes. Así, el objetivo del presente estudio consiste en evaluar, por medio de un procedimiento operante (programa de reforzamiento de razón progresiva),

los efectos del bloqueo farmacológico de los RD₄ presentes en la CNA sobre la motivación por el alimento palatable (MAP, puntos de ruptura) en ratas.

MÉTODO

Animales de estudio

Se emplearon 10 ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 80-120 gramos de peso corporal al inicio del experimento. Una vez llegadas al laboratorio tuvieron una semana de habituación al ciclo de luz/oscuridad de 12x12 horas (las luces se apagaban a las 9:00 am). Las ratas tuvieron acceso *ad-libitum* al agua y alimento estándar (Formulab-Diet 5008®). Los animales fueron proporcionados por el Bioterio de la FES-Iztacala. Los procedimientos empleados en el presente estudio están apegados a las Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Fármacos

En este estudio se empleó el antagonista selectivo de los RD₄, L-745870 (3-(4-[chlorophenyl]piperazin-1-yl)-methyl-1H-pyrrolo[2,3-B]pyridine trihydrochloride, Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V., México), el cual tiene una $k_i=0.43$ nM (Patel *et al.*, 1997). Se preparó una solución stock de L-745,870 disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) y posteriormente se tomaron alícuotas que se diluyeron con solución salina 0.9% para obtener una concentración final de 1 µg, el volumen de inyección fue de 0.5 µL infundido a una velocidad de 0.1 µL/min, esta solución fue preparada justo antes de ser administrada.

Cirugía

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina y xilazina (112.5 y 22.5 mg/kg de peso corporal, respectivamente) y posteriormente fueron colocadas en el aparato estereotáxico para la implantación de una cánula guía de 1.5 cm en el área suprayacente a la CNA. Las coordenadas estereotáxicas con relación a bregma fueron las siguientes: +1.5 mm antero-posterior; -0.6 mm latero-medial y -6.0 mm dorso-ventral (Paxinos, Watson, Pennisi, & Topples, 1985). La cánula guía fue fijada al cráneo con un tornillo de acero inoxidable y cemento acrílico dental. Los animales fueron tratados con enrofloxacin (25 mg/kg al finalizar la cirugía y 48 h después) para prevenir infecciones y tuvieron 7 días de recuperación.

Inyecciones intracanales

Las microinyecciones se aplicaron con una jeringa Hamilton de alta precisión adaptada a un microinyector de 1.53 cm de longitud, el cual permaneció insertado en la cánula guía un minuto adicional para asegurar la correcta difusión del fármaco. En todos los casos, las microinyecciones se aplicaron 10 minutos antes de iniciar el programa de razón progresiva.

Todas las ratas recibieron dos inyecciones intracanales (L-745,870 y Vehículo). La dosis del fármaco utilizada (1 µg) se basó en estudios previos de nuestro grupo de trabajo, donde se observó un efecto significativo sobre la ingestión de alimento (Tejas-Juárez *et al.*, 2014).

Evaluación de la motivación por el alimento palatable (MAP)

Al inicio de la fase de oscuridad (09:00 horas), se les retiró de las cajas habitación el alimento para facilitar la emisión de la respuesta operante (palanqueo) durante las sesiones de entrenamiento. Noventa minutos después, las ratas fueron introducidas a las cajas de condicionamiento operante (Med Associates Inc., St. Albans, VT., USA), que estaban equipadas con luz de iluminación general (panel posterior) y estímulos discriminativos (panel frontal, arriba de las palancas), dos palancas retráctiles y en medio de éstas, un comedero adjunto a un dispensador de pellets de 45 mg. Las cajas (con dimensiones de 30 x 23 x 20 cm, las caras laterales y superior de plexiglas transparente) se encontraban en cámaras sonoamortiguadas con un ventilador para suministrar aire fresco y ruido blanco.

Los eventos y contingencias dentro de la caja de condicionamiento operante fueron monitoreados y controlados a través de una interfaz Smart Control Panel SG-716B (Med Associates Inc., St. Albans, VT., USA) conectada a una PC con el software Med-PC (Med Associates Inc., St. Albans, VT., USA) y programas personalizados construidos en lenguaje MedState Notation.

Entrenamiento. Inicialmente, los animales fueron sometidos a un programa de reforzamiento de razón fija 1 (RF1) en sesiones diarias de 30 minutos. Al presionar 1 vez la palanca se producía la entrega de un pellet de 45 mg como reforzador (pellets de sacarosa con sabor a chocolate de 45 mg, Bio Serv, Frenchtown, NJ, USA). El criterio de cambio de RF1 a RF5 consistió en que se alcanzara una tasa de respuesta de palanqueo estable (variación no mayor al 20% en promedio durante 3 días consecutivos, cada rata fue su propio control). En el programa de reforzamiento de RF5, al presionar 5 veces la palanca se producía la entrega de 1 reforzador, esta fase del entrenamiento duró 3 días consecutivos. Posteriormente, se les implantó la cánula de microinyección en la CNA y después de la recuperación operatoria, se sometieron nuevamente al programa de reforzamiento RF5. La duración

de las sesiones de entrenamiento (RF1 y RF5) fue de 30 minutos. Después de que se alcanzó estabilidad de la respuesta de palanqueo en el programa RF5 (no más del 20% de variación promedio por 3 días consecutivos, cada animal fue su propio control), se aplicaron las microinyecciones del vehículo o L-745,870 y se sometieron a un programa de reforzamiento de razón progresiva (RP) 10 minutos después de la inyección para evaluar la MAP.

Sesión experimental. En el programa de reforzamiento de RP, el requerimiento de respuestas para obtener un reforzador se incrementaba de acuerdo a la siguiente serie de valores: 1, 2, 4, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, 268 y 328. Los valores anteriores se obtienen mediante la ecuación: Razón= $[5e (0.2 \times \text{número de ensayo})] - 5$ (Richardson & Roberts, 1996). La sesión del programa de RP terminó cuando la rata no obtenía al menos un reforzador en 30 minutos y se consideró como punto de ruptura la razón de palanqueos completada antes de que la sesión terminaba. De los procedimientos operantes se obtuvieron los siguientes valores: 1) Número de palanqueos, 2) reforzadores obtenidos, y 3) puntos de ruptura.

Histología

Al finalizar las sesiones experimentales, las ratas fueron sacrificadas con una dosis letal de pentobarbital sódico intraperitoneal, se extrajo el cerebro y se fijó en una solución de formaldehído al 10 % durante 24 horas. Se cortaron secciones coronales de 300 μm de grosor con un vibrátomo (Campden) y, con base en el atlas de Paxinos y Watson (1986), se ubicó el sitio de inyección del fármaco. En el presente reporte sólo se incluyeron los datos de las ratas que fueron correctamente inyectadas en la CNA.

Análisis estadístico

Todos los valores del número de palanqueos, reforzadores obtenidos y puntos de ruptura, fueron expresados como la media de las observaciones \pm el error estándar de la media (EM) y analizados con un ANOVA de medidas repetidas (datos obtenidos durante el entrenamiento) seguido de la prueba post hoc de Tukey o una prueba t de student para datos relacionados (para las comparaciones entre 2 condiciones). Se empleó el programa GraphPad Prism5® para los cálculos de la significancia de las diferencias con un α de 5%.

RESULTADOS

En la presente investigación se evaluaron los efectos del bloqueo farmacológico de los RD4 de la CNA sobre la MAP en ratas por medio de procedimientos

conductuales. Para alcanzar dicho objetivo, se estableció un paradigma operante para la evaluación de la MAP, inicialmente sometiendo a los animales a programas de reforzamiento de razón fija (RF1 y RF5, entrenamiento), para posteriormente administrar el fármaco directamente a la CNA y evaluar los puntos de ruptura en un programa de reforzamiento de RP. En la figura 1 se muestra el número de palanqueos (A) y el número de reforzadores obtenidos (B) en los programas RF1 y RF5 (entrenamiento). En RF1 sólo se requirieron 4 sesiones para alcanzar la estabilidad del 80% en su tasa de respuestas sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas. Posteriormente, fueron sometidas a tres sesiones en RF5 (cinco palanqueos, un reforzador) y al día siguiente se les sometió a cirugía estereotáxica. Después que las ratas se recuperaron de la cirugía, en cuatro sesiones en RF5 se alcanzó la estabilidad del 80% en los palanqueos y se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en las sesiones 7, 9, 10 y 11 con respecto a las sesiones en RF1 [$F(7, 4) = 8.502$; $p < 0.001$]. En los reforzadores obtenidos no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las sesiones en RF1 y RF5 [$F(7,4) = 10.83$; $p > 0.05$]. Con lo que se puede establecer que las ratas se adaptaron apropiadamente al paradigma operante establecido. Una vez lograda la estabilidad en RF5, se procedió a la administración intracanalicular del fármaco en la CNA.

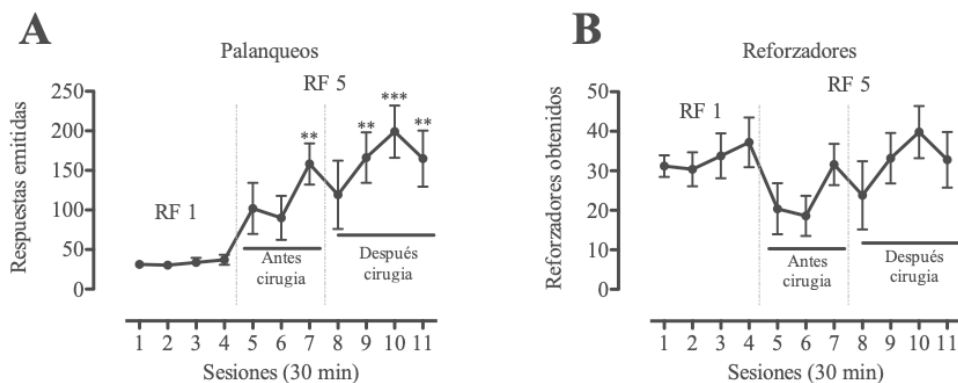


Figura 1. Respuestas emitidas por las ratas sometidas a los programas RF1 y RF5 antes y después de la cirugía (entrenamiento). Palanqueos emitidos (A) y reforzadores obtenidos (B) en cada sesión de 30 minutos tanto en RF1 y RF5, antes y después de la cirugía estereotáxica. Datos expresados en términos de medias \pm el EEM. Entre las sesiones 8, 9, 10 y 11 de los palanqueos y reforzadores no hubo diferencias estadísticamente significativas

En la figura 2 se muestran los efectos de la administración intracanalicular del antagonista selectivo de los RD4, el L-745,870 (1 μ g en la CNA) sobre el desempeño de los animales en el programa de RP. De acuerdo con los resultados obtenidos, la administración local de L-745,870 disminuyó significativamente el número de palanqueos ($t = 3.450$; $p < 0.05$) y el número

de reforzadores conseguidos ($t= 4.700$; $p<0.05$) en una tarea conductual caracterizada por el aumento progresivo de la demanda operante.

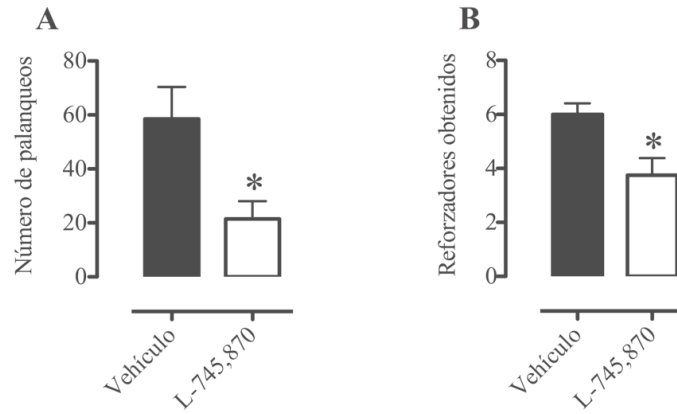


Figura 2. Número de palanqueos (A) y reforzadores obtenidos (B) por las ratas sometidas al programa de RP que recibieron la inyección del antagonista de los RD4 (L-745,870, 1 μ g) o vehículo en la CNA. Datos expresados en términos de medias \pm el EEM (n= 4 por grupo)

Para determinar los efectos del bloqueo de los RD4 de la CNA con L-745,870 (1 μ g) sobre la MAP, se evaluaron los puntos de ruptura, mismos que son una medida válida que refleja la fuerza del reforzador y el estado motivacional del animal (Zhang *et al.*, 2003). En el presente estudio encontramos que la administración de L-745,870 disminuyó significativamente los puntos de ruptura ($t= 4.071$; $p<0.05$; $n=4$). Lo anterior indica que al impedir la transmisión dopaminérgica mediada por los RD4, la MAP disminuye. En la figura 3B se muestra la histología de las inyecciones correctamente administradas en la CNA.

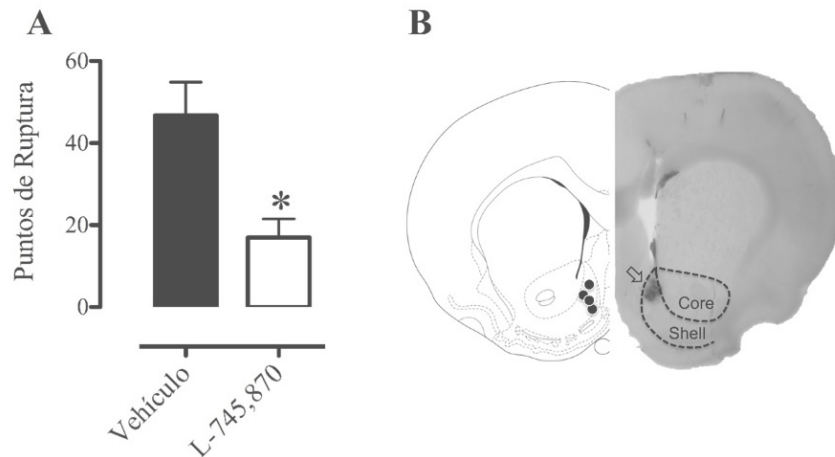


Figura 3. Número de palanqueos (A) y reforzadores obtenidos (B) por las ratas sometidas al programa de RP que recibieron la inyección del antagonista de los RD4 (L-745,870, 1 μ g) o vehículo en la CNA. Datos expresados en términos de medias \pm el EEM (n= 4 por grupo)

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El presente estudio tuvo como objetivo obtener evidencia de que la transmisión dopaminérgica mediada por RD4 en el circuito de la recompensa, particularmente en la corteza del núcleo accumbens, es parte importante del procesamiento de la información de las propiedades reforzantes del alimento palatable. Así, encontramos que el bloqueo local y específico de los RD4 en la CNA con el antagonista L-745870 disminuyó significativamente la motivación por el alimento palatable.

Nuestros resultados son compatibles con la hipótesis que la administración central del antagonista selectivo de los RD4 en la CNA bloquea a los receptores D4 presinápticos que se encuentran localizados en las terminales glutamatérgicas (Svingos *et al.*, 2000), desinhibiendo esta vía estimuladora e incrementando consecuentemente la actividad de las neuronas GABAérgicas de la CNA asociadas al aumento de la motivación por el consumo de alimento palatable. En concordancia con lo anterior, la activación de los RD4 presinápticos se ha asociado con una inhibición en la liberación de glutamato en otras regiones del cerebro (debido a su acople a proteínas Gi), por lo cual el bloqueo de los RD4 incrementaría la liberación de glutamato. Al respecto, se ha mostrado que el bloqueo de los RD4 con el antagonista selectivo de los RD4 (A-381393) produce aumento de la expresión de la inmunoreactividad contra c-fos en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Bitner *et al.*, 2006). De tal forma, el incremento de la actividad de las neuronas GABAérgicas de la CNA mediada por la desinhibición en la liberación de glutamato vía el bloqueo de los RD4 alcanzaría diversas áreas cerebrales, entre ellas, aquellas relacionadas con la ingesta de alimento como el hipotálamo lateral (HL) el cual expresa diferentes neuropéptidos orexigénicos como la hormona concentradora de melanina (MCH) y orexina (Ox) (Suyama & Yada, 2018; Stuber & Wise, 2015). El incremento del tono GABAérgico en el LH tendría un efecto inhibitorio de las neuronas que expresan MCH y Ox, lo que explicaría en buena parte la disminución en la ingesta de alimento palatable, ya que estos péptidos tienen un efecto hipofágico.

Por otro lado, el antagonista selectivo de los RD4 (L-745,870) ha mostrado que puede producir la disminución en la severidad de las discinecias en el modelo de Parkinson inducido en ratas cuando se co-administra con L-DOPA, el medicamento de elección en la enfermedad de Parkinson (Huot *et al.*, 2015). Adicionalmente otros antagonistas selectivos de los RD4 se han estudiado en cáncer y adicciones (Lindsley & Hopkins, 2017). Actualmente, no se ha publicado información referente a la utilidad de este fármaco en la regulación de la ingesta de alimento, por lo que el presente estudio proporciona información que sustenta el potencial uso de este compuesto

como coadyuvante en el tratamiento de patología alimentaria caracterizada por el consumo excesivo de alimento palatable.

A pesar de que los resultados del presente estudio tienen implicaciones en el entendimiento de la relación entre la transmisión dopaminérgica y la regulación de los procesos de la motivación por el alimento palatable, se deben considerar sus limitaciones. La principal es que se mostró el efecto de una dosis única del antagonista de los RD4 que, aunque tuvo un efecto claro y estadísticamente significativo, será necesario validar que dichos cambios en el comportamiento siguen un patrón dependiente de la concentración, como evidencia farmacológica de la especificidad de la acción del compuesto sobre receptor. Adicionalmente, sería necesario demostrar que el efecto reportado depende del aumento de la concentración del GABA en la CNA, por lo que se sugiere que en futuros experimentos no sólo se midan los niveles de GABA en la CNA, sino que también se muestre que el bloqueo de los receptores a GABA previenen el efecto del L-745,870.

Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que el bloqueo farmacológico de los RD4 en la corteza del núcleo accumbens con el antagonista específico (L-745,870) disminuye la ingesta de alimento palatable mediante la disminución de la motivación por el alimento. Futuros experimentos deberán realizarse para confirmar que el mecanismo neuroquímico por medio del cual el RD4 produce el efecto antes mencionado vía la regulación de las concentraciones de GABA en la CNA.

Agradecimientos

El presente estudio fue realizado con el apoyo financiero de la UNAM DGAPA, a través del PAPIIT con el proyecto IN217117.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bitner, R., Nikkel, A., Otte, S., Martino, B., Barlow, E., Bhatia, P., . . . Moreland, R.** (2006). Dopamine D4 receptor signaling in the rat paraventricular hypothalamic nucleus: evidence of natural coupling involving immediate early gene induction and mitogen activated protein kinase phosphorylation. *Neuropharmacology*, 521–531.
- Bonaventura, J., Quiroz, C., Cai, N.-S., Rubinstein, M., Tanda, G., & Ferré, S.** (2017). Key role of the dopamine D4 receptor in the modulation of corticostriatal glutamatergic neurotransmission. *Science Advances*, 1–8.
- Ducci, F., & Goldman, D.** (2012). The genetic basis of addictive disorders. *Psychiatric Clinics of North America*, 35:495–519.
- González, S., Rangel-Barajas, C., Pepper, M., Lorenzo, R., Moreno, E., Ciruela, F., . . . Ferré, S.** (2012). Dopamine D4 receptor, but not the ADHD-associated D4.7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain. *Molecular Psychiatry*, 650–662.
- Hajnal, A., Smith, G., & Norgren, R.** (2004). Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology*, R31–37.
- Huot, P., Johnston, T., Koprach, J., Espinosa, M., Reyes, M., Fox, S., & Brotchie, J.** (2015). L-745,870 reduces the expression of abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat. *Behavior Pharmacology*, 101–108.
- Kelley, A., Baldo, B., Pratt, W., & Will, M.** (2005). Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiology and Behavior*, 773–795.
- Lindsley, C., & Hopkins, C.** (2017). Return of D4 receptor antagonists in drug discovery. *The Journal of Medicinal Chemistry*, 1–11.
- Missale, C., Nash, S., Robinson, S., Jaber, M., & Caron, M.** (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiology Review*, 189–225.
- Patel, S., Freedman, S., Chapman, K., Emms, F., Fletcher, A., Knowles, M., . . . Ragan, C.** (1997). Biological profile of L-745,870, a selective antagonist with high affinity for the dopamine D4 receptor. *Experimental Therapeutics*, 636–647.
- Paxinos, G., & Watson, C.** (1998). *The brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press: 1998.
- Reynolds, S.M., & Berridge, K.C.** (2002). Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: bivalent rostrocaudal gradients for GABA-elicited eating, taste 'liking'/'disliking' reactions, place preference/avoidance, and fear. *Journal of Neuroscience*. 22, 7308–7320.
- Richardson, N. & Roberts, D.** (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *Journal of Neuroscience Methods*. 66, 1–11.

- Stuber, G., & Wise, R. (2015).** Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nature Neuroscience*, 198–205.
- Suyama, S., & Yada, T. (2018).** New insight into GABAergic neurons in the hypothalamic feeding regulation. *The Journal of Physiological Sciences*, 717–722.
- Svingos, L., PeriaSamy, S., & Pickel, M. (2000).** Presynaptic Dopamine D4 Receptor Localization in the Rat Nucleus Accumbens Shell. *Synapse*, 222–232.
- Tejas-Juárez, J., Cruz-Martínez, A., López-Alonso, V., García-Iglesias, B., Mancilla-Díaz, J., Floran-Garduño, B., & Escartín-Pérez, R. (2014).** Stimulation of dopamine D4 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats induces hyperphagia: Involvement of glutamate. *Physiology & Behavior*, 272–281.
- Thomas, T., Grandy, D., Gerhardt, G., & Glaser, P. (2009).** Decreased dopamine D4 receptor expression increases extracellular glutamate and alters its regulation in mouse striatum. *Neuropsychopharmacology*, 436–445.
- Zhang, M., Balmadrid, C., & Kelley, A. (2003).** Nucleus Accumbens Opioid, GABAergic, and Dopaminergic Modulation of Palatable Food Motivation. *Behavioral Neuroscience*, 202–211.