



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

Efecto de la Naltrexona sobre los patrones de
consumo de alimento en presencia y ausencia de etanol
bajo diferentes condiciones de privación alimentaria
en la rata

Tesis
que para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO
(OPCIÓN NEUROCIENCIAS)

Presenta
Eliana Barrios De Tomasi

Comité tutorial
Dr. Jorge Juárez González (Director)
Dr. Héctor Martínez Sánchez
Dra. Marisela Hernández González
Dr. Carlos Aparicio Naranjo

A mis hijos por ayudarme a ser una mejor mujer en todos los aspectos, apoyarme en los momentos en que más los necesitaba con su amor incondicional.

A Rodolfo por darle una chispa especial a mi vida, por las alegrías y las infinitas pláticas. Gracias!!! por acompañarme en este proceso.

A mis padres y hermanas que a pesar de estar lejos siempre están cerca. Por los buenos momentos que disfrutamos estando juntos.

Con todo mi amor, esfuerzo y dedicación para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge por su amistad, confianza, apoyo y por los conocimientos que me ha compartido durante este tiempo que han servido para mi formación académica y personal.

Al Dr. Héctor por haberme brindado en tan poco tiempo su confianza y su apoyo incondicional

A la Dra. Marisela por compartir conmigo sus conocimientos y su amistad

A la Dra. Julieta por su amistad y gracias por invitarme a este Instituto.

Al Dr. Aparicio por su dedicación y aportar sus conocimientos a esta tesis.

A Miguel Ángel y a Sergio, por los buenos momentos y las largas charlas.

A Cristy por ser como eres y siempre estar a mi lado. Mil gracias amiga!!!

Mario, Armando y Paty, por el tiempo que hemos compartido juntos y su ayuda en la realización de estos experimentos, gracias.

A todos ustedes, mis amigos y maestros del Instituto de Neurociencias que hicieron que cada día el conocimiento de las neurociencias fuera más apasionante

GRACIAS POR TODO

INDICE

Resumen.....	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Antecedentes	
Motivación y conducta alimentaria.....	11
Neurotrasmisores e ingestión alimentaria.....	11
Teoría del Set Point.....	13
Estructuras involucradas en la conducta alimentaria.....	14
Factores metabólicos: neuropeptidos, peptidos intestinales y hormonas.....	15
Consumo de alimento y alcohol: Evaluación diferencial.....	19
Restricción y privación de alimento.....	20
Opioides.....	22
Antagonistas opioides y consumo de alimento.....	24
Antagonistas opioides, consumo de alcohol y agua.....	25
Planteamiento del problema.....	27
Objetivo general.....	29
Hipótesis general.....	29
Variables.....	29
Diseño Experimental.....	30
Experimento 1	
Objetivo particular.....	33
Hipótesis particular.....	33
Diseño experimental.....	33
Resultados.....	34
Discusión.....	41
Experimento 2	
Objetivo particular.....	44
Hipótesis particular.....	44
Diseño experimental.....	44
Resultados.....	45

Discusión.....	53
Experimento 3	
Objetivo particular.....	57
Hipótesis particular.....	57
Diseño experimental.....	57
Resultados.....	58
Discusión.....	64
Experimento 4	
Objetivo particular.....	67
Hipótesis particular.....	67
Diseño experimental.....	67
Resultados.....	68
Discusión.....	75
Discusión general.....	78
Conclusiones.....	81
Referencias.....	82
Apéndice.....	91

Abreviaciones

Ntx	Naltrexona
Veh	Vehículo
Ntx-Alc	Tratamiento con Ntx con acceso continuo a alimento y alcohol
Veh-Alc	Vehículo con acceso continuo a alimento y alcohol
Ntx-P	Tratamiento con Ntx con privación parcial de alimento
Veh- P	Vehículo con privación parcial de alimento
Ntx-AlcP	Tratamiento con Ntx con privación parcial de alimento y alcohol
Veh-AlcP	Vehículo con privación parcial de alimento y alcohol

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La naltrexona (Ntx) un antagonista opioide, es utilizada en clínica para el tratamiento del alcoholismo, la dependencia a opiáceos y en menor medida en el control de la anorexia y la bulimia. Existen dos problemas en torno a los estudios de los efectos de la naltrexona sobre el alcohol y la conducta alimentaria: uno de ellos está relacionado con el tiempo en que se evalúan los efectos después de administrado el fármaco, ya que la mayoría de los estudios reportados en la literatura analizan los efectos del antagonista opioide en un máximo de 4 horas subsecuentes a su administración. El segundo problema está relacionado con las condiciones de disponibilidad alimentaria de los sujetos, ya que cuando se estudian los efectos de la Ntx sobre la conducta alimentaria, generalmente se recurre a la privación o restricción de alimento, al uso de alimento azucarado o dietas especiales en solución, así como el uso de inyecciones de sustancias con el fin de inducir el consumo de alimento; en cambio, son escasos los estudios en ratas en los cuales se analice qué sucede cuando la Ntx es administrada en condiciones de libre acceso al alimento. Con base en estos datos consideramos importante estudiar el efecto de la Ntx en el consumo diario de alimento en condiciones de libre demanda y de restricción de este incentivo, ante la presencia o ausencia de un incentivo no primario (alcohol), sobre el cual también se conoce, la Ntx tiene un efecto importante.

METODOLOGIA: Se utilizaron 80 ratas macho Wistar; 40 sujetos tuvieron acceso continuo a agua y alimento (Exp 1), 20 de ellos estuvieron adicionalmente expuestos a alcohol (Exp 2); a las 40 ratas restantes se les privó de alimento por 12hrs/día (Exp 3), 20 de las cuales fueron expuestas a alcohol (Exp 4) por 12hrs/día. Los sujetos pasaron por una semana de línea base (LB) seguido de un periodo de tratamiento que consistió en la inyección subcutánea de Ntx 10mg/kg/día/14días o solución salina 0.2ml/día/14 días (Veh); finalmente se evaluó una semana de postratamiento (PT) sin inyecciones. Para fines de análisis las dos semanas de tratamiento con Ntx o Veh se evaluaron de manera independiente (Ntx-s1, Ntx-s2). Se les midió el consumo de agua y alimento diariamente cada 2hrs por 12hrs durante el periodo de oscuridad y además el consumo de alcohol en los exp. 2 y 4.

RESULTADOS: Exp 1: El consumo de alimento se incrementó significativamente en el grupo Ntx al final del periodo de oscuridad en Ntx-s1 y Ntx-s2 y en la fase de luz en PT, con respecto al grupo Veh. Exp 2: en el consumo de alimento no se observaron cambios importantes en ninguno de los grupos, pero el consumo de alcohol se incrementó en las últimas horas posteriores a la inyección de Ntx en Ntx-s2. Exp 3: Se encontró un decremento significativo en el consumo de alimento durante las 2hrs posteriores a la administración del antagonista opioide en el grupo Ntx en los periodos Ntx-s1 y Ntx-s2. Exp 4: el consumo de alimento se decremento significativamente a las dos hrs posteriores a la administración de Ntx; en el consumo de alcohol no se observaron diferencias significativas. El consumo de agua fue más afectado que el consumo de alimento en las horas siguientes a la administración de Ntx en la mayoría de los experimentos.

CONCLUSIONES: Parece ser que el espacio temporal entre la administración del antagonista opioide y las condiciones de privación al alimento o al alcohol en los modelos animales, pueden afectar el consumo de incentivos primarios y no primarios de manera diferencial, lo cual se pudo reflejar tanto en la cantidad consumida como en el patrón de consumo.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Naltrexone (Ntx) an opioid antagonist, is used in clinic for alcoholism and dependency to opiate treatment; at the same time has been used to control of obesity, anorexia and bulimia. Two problems around the studies of the effects of naltrexone on the alcohol and food consumption are detected in the literature: one of them is related with the time elapsed after the Ntx administration and the assessment of the effects of its effects, since in most of studies reported in literature, the effects of the opioid antagonist are analyzed in a maximum of 4 hours subsequent to the Ntx administration. The second problem is related to deprivation conditions of the subjects, since in the studies oriented to assess the effects of the Ntx on the alimentary behavior generally deprivation or food restriction is used; sweetened food or special liquid diets as well as injections of substances with the purpose of inducing the food consumption also are implemented; however, the studies assessing what happens when the Ntx is administered in conditions of free access to the food are very scarce. With base in these data we considered important to study the effect of Ntx in the daily food consumption in conditions of food ad libitum and food deprivation, as well as in presence or absence of alcohol.

METHODS: 80 male Wistar rats were used, 40 subjects had continuous access to food and water (Exp 1), 20 out them were additionally exposed to alcohol (Exp 2); the 40 remaining rats were food deprived for 12hrs/day, 20 out them were not exposed to alcohol (Exp 3) and the other 20 were exposed to alcohol 12hrs/day (Exp 4). One week of base line (BL) was recorded followed of a period of treatment that consisted of the subcutaneous injection of Ntx 10mg/kg/day/14days or saline solution 0.2ml/day/14 days; finally one week of post treatment was evaluated (PT). For analyses purposes, the two weeks of treatment with Ntx or Veh were evaluated separately (Ntx-w1, Ntx-w2). Consumption of water, food and alcohol was measured daily each 2hrs by 12hrs during the dark cycle.

RESULTS: Exp 1: The food intake decrement significantly at final of the dark period during Ntx-s1 y Ntx-s2 and in the light phase only in the Ntx group

Exp 2: There were not important changes in the food intake in any group in this experiment, but alcohol intake increased significantly during the last hours of the dark phase, after 8 hours of the Ntx administration and only in the second week of treatment. Experiment 3: There was a significantly decrement at 2hrs after the opioide antagonist administration in the Ntx group in the periods Ntx-w1 and Ntx-w2. There were not differences in LB, PT or in the total food consumption in any of these periods. Exp 4: Food intake decrement significantly at 2hrs after Ntx administration. In alcohol intake there was not significant differences observed. Water consumption was more affected during the following hours after the Ntx administration than foof intake in most experiments.

CONCLUSIONS: The temporary period between the opioid antagonist administration and the deprivation or alimentary restriction of food or alcohol in animals models, can affect the consumption of primary and no primary incentives in a differential way, which was evident in both, the amount of intake and the consumption pattern.

INTRODUCCION

La alimentación es necesaria para la sobrevivencia de todos los seres vivos. Como cualquier especie animal, los humanos comen para proveer los requerimientos básicos del metabolismo del cuerpo. Sin embargo, muchas veces el consumo va más allá de estos requerimientos, en un sentido o en otro. La preferencia o la aversión por el alimento tienen mayor impacto en esta conducta. El tamaño, la frecuencia y la preferencia por el alimento son variables importantes en nuestros hábitos alimenticios (Shepherd, 1994). En las sociedades modernas los hábitos alimentarios se ven influenciados por factores sociales y hedónicos, esto ha producido un incremento en el peso resultando en la obesidad de las personas. El valor social atribuido a la alimentación, a la salud y a la belleza física ha aumentado constantemente a lo largo de la segunda mitad del siglo XX (Contreras, 1999).

Últimamente, el núcleo de la investigación sobre el consumo alimentario se ha dirigido hacia los problemas de alimentación y salud relacionados con las condiciones de vida propias de las sociedades modernas industrializadas. Se ha intentado prevenir y tratar la obesidad mediante diversas estrategias muchas de las cuales se han relacionado con medicamentos para decrementar el consumo de alimento y el peso corporal, como son los antagonistas opioides. Estos medicamentos ya se han usado en clínica para decrementar el consumo del alcohol, la dependencia a opiáceos y también para decrementar el peso o para controlar la anorexia y la bulimia. Hasta el momento los antagonistas opioides son más utilizados en el tratamiento del alcoholismo y en menor medida en el tratamiento de trastornos alimentarios.

Por otro lado, existe evidencia de que hay un vínculo bioquímico entre el alcoholismo y los opiáceos induciendo la respectiva dependencia. Este vínculo está basado en las observaciones de que el producto del metabolismo del alcohol, puede interactuar con un receptor opioide (Hamilton & Hirst, 1980).

Otros estudios reportan que los niveles normales de opioides en la sangre de alcohólicos son un factor que ayuda a discriminar la adicción al alcohol o a la heroína debido a que los niveles de beta-endorfinas están suprimidos (Genazzani, Nappi, Facchinetti, Mazzella, Parrini, y Sinforiani, 1982). Esto conlleva a que haya un aumento de receptores para poder captar la poca cantidad de opioide existente en el cerebro. Todo esto juega un papel importante en la conducta de búsqueda de sustancias como el alcohol.

Existen dos problemas en torno a los estudios de los efectos de la naltrexona (Ntx) sobre el consumo de alcohol y la conducta alimentaria: uno de ellos está relacionado con el

tiempo en que se evalúan los efectos después de administrado el fármaco, ya que la mayoría de los estudios reportados en la literatura analizan los efectos del antagonista opioide en un máximo de 4 horas subsecuentes a su administración. Si consideramos que la vida media de la Ntx es de 2.7 ± 1.0 hrs, es posible que durante las primeras horas posteriores a su administración el efecto sea más evidente que posteriormente, cuando la sustancia activa ya ha sufrido un proceso de metabolización. Con esta base consideramos conveniente estudiar el patrón de consumo del incentivo evaluado a lo largo del día.

El segundo problema está relacionado con las condiciones de restricción de los sujetos, ya que cuando se estudian los efectos de la Ntx sobre la conducta alimentaria generalmente se recurre a la privación o restricción de alimento, al uso de alimento azucarado o dietas especiales en solución, así como el uso de inyecciones de sustancias con el fin de inducir el consumo de alimento; en cambio, son escasos los estudios en ratas en los cuales se analice qué sucede cuando la Ntx es administrada en condiciones de libre acceso al alimento. El valor incentivo del alimento varía dependiendo del estado motivacional, de tal manera que el sustrato neurobiológico subyacente puede ser diferente en estados de libre alimentación de aquellos de estados privados de alimento (Rudski, Billington y Levine, 1994; Nader y van der Kooy, 1997).

Con base en estos datos consideramos importante estudiar el efecto de la Ntx en el consumo diario de alimento en condiciones de libre demanda y de privación parcial, así como su efecto cuando la rata consume el incentivo primario (alimento) en presencia o ausencia de un incentivo no primario (alcohol).

ANTECEDENTES

ASPECTOS MOTIVACIONALES DE LA CONDUCTA ALIMENTARIA

La conducta alimentaria se realiza a través de la conducta motora la cual tiene 2 fases: una fase apetitiva, durante la cual el animal presenta una conducta de búsqueda o procuración de un incentivo y la fase consumatoria, en el cual la meta es alcanzada y el apetito es satisfecho (Shepherd, 1994).

Por otro lado, la ingesta de alimento se controla a dos niveles: uno opera a corto plazo, cesan las reservas de carbohidratos del organismo, e impulsa a la búsqueda de calorías cuando las reservas de glucógeno o los niveles de glucemia descienden; el otro está más relacionado con los depósitos grasos del tejido adiposo, y regula la ingesta de alimento a mediano y largo plazo (Díaz y Vázquez, 2002).

El patrón conductual de ingestión de comida constituye un ciclo en el que los organismos alternan los estados de hambre y de saciedad. El hambre se considera a la fuerza que motiva a los organismos a iniciar la búsqueda e ingestión del alimento, y por saciedad se entiende la terminación de la ingestión provocada por la comida, en la que desaparece la motivación por comer (Escobar y Aguilar, 2002). Por otra parte, se reconoce que los organismos muestran preferencias hacia cierta clase de alimentos, según sus necesidades fisiológicas. A esta preferencia selectiva de alimento se le denomina apetito (Díaz y Vázquez, 2002).

La saciedad, a su vez, se ha dividido en dos estados distintos: la saciedad preabsortiva, o a corto plazo, que se refiere al estado de satisfacción que lleva a la interrupción de la ingestión de alimentos y que sucede mucho antes de que los nutrientes se hayan absorbido del tracto digestivo; y la saciedad postabsortiva, que se refiere al periodo de ayuno entre dos comidas y que depende de la absorción y utilización de nutrientes (Escobar, 2002).

Entre los eventos que regulan la conducta alimentaria se encuentran los factores físicos (llenado gástrico, distensión, contracción y vaciado) y factores metabólicos (peptidos intestinales, neuropeptidos, hormonas, metabolismo del combustible como glucosa, amino ácidos, etc), (Melanson, 2004)

NEUROTRASMISORES e INGESTIÓN ALIMENTIARIA

Se sabe que los opioides juegan un rol importante en la modulación de los aspectos del sabor (Cooper y Kirkham, 1993) y en el control de los aspectos hedónicos de la ingestión tanto de líquidos como de alimentos (Yeomans y Gray, 2002) produciendo un incremento en su consumo. En contraste, otros autores han encontrado que, la ingestión de alimento cambia los niveles plasmáticos de opioides endógenos, como las β -endorfinas, las cuales presentan un incremento en su liberación después de ingerir un alimento poco apetecible pero no después de un alimento muy apetecible (Strand, 1999) también, los niveles plasmáticos de opioides endógenos se elevan como consecuencia de conductas de ingesta compulsiva o atracones (de Zwaan y Mitchell, 1992). Existe un vínculo entre el sistema opioide y los desórdenes alimentarios, como es en el caso de la bulimia y la anorexia, relación que se ha estudiado con poco éxito, aunque se sabe que los niveles de β -endorfinas son altos en plasma y en el SNC de pacientes obesos, y reducidos en pacientes anoréxicos (Strand, 1999).

Los opioides actúan a corto plazo en el control del consumo de alimento modulando las propiedades reforzantes del estímulo alimenticio mientras que los agonistas opioides lo incrementan el consumo de alimento y los antagonistas opioides lo reducen. Tal acción corresponde al control del sabor del alimento o, en humanos, al control del placer/displacer sensorial asociado con el estímulo alimenticio (Fantino, 1988). Por otro lado, parece ser que el sistema opioide no actúa directamente en la regulación del peso corporal (Fantino, 1988).

En general, los agonistas opioides estimulan el consumo de alimento. La estimulación de receptores μ y δ , pero no los κ , en el núcleo accumbens (NAcc), producen un gran incremento en el consumo de croquetas de laboratorio y en la bebida de soluciones azucaradas en roedores (Bakshi y Kelley; 1993a, 1993b; Zhang y Kelley, 1997). Se sabe que los receptores opioides en esta área son abundantes. (Mansour, Khachaturian, Lewis, Akil y Watson, 1988). Por otro lado la administración paraventricular de agonistas μ , delta y kappa estimulan el consumo de una solución salina hipotónica (Gosnell y Majchrzak, 1990b; Gosnell, Majchrzak y Krahn, 1990c)

El rol de la dopamina (DA) en la recompensa del alimento se ha descrito como un mediador de los aspectos anticipatorio, activador o incentivo de la conducta. (Berridge y Robinson, 1998; Stratford y Kelley, 1997). Más específicamente, inyecciones sistémicas o

intra-núcleo accumbens de drogas dopaminérgicas y opioides a bajas dosis facilitan el consumo de alimento (Vaccarino, 1995). Existe evidencia que indica que estos efectos reflejan las propiedades reforzantes de los opioides y de las drogas dopaminérgicas (Gosnell, Crahn y Majchrzak, 1990a; Evans y Vaccarino 1990; Sills y Vaccarino 1991).

Los neurotransmisores, glutamato (excitador) y GABA (inhibidor) se producen en varias zonas hipotalámicas y son los neurotransmisores más abundantes en esta área (Díaz y Vázquez, 2002; Meister y Hökfelt, 1988; van den Pol, Wuarin y Dudek, 1990; van den Pol, 1991). Ambas sustancias estimulan el consumo de alimento en la rata. El agonista GABA_A, muscimol administrado en la corteza del NAcc incrementa la ingesta de alimento, lugar de preferencia y reacciones hedónicas positivas (Khaimova, Kandov, Israel, Cataldo, Hadjimarkou y Bodnar, 2004) Por otro lado las microinyecciones de GABA en el área tegmental ventral (ATV) altera la conducta apetitiva, (Ikemoto y Panksepp, 1996) y la administración del agonista GABA_A, muscimol, en el ATV produce potentes respuestas a comer y beber (Klitenick, y Wirtshafter, 1988)

TEORIA DEL “SET POINT”

Cada individuo parece regular el consumo de alimento y así mantener el peso corporal alrededor de un punto de regulación óptimo. Los individuos pueden regular los hábitos alimentarios en periodos largos de tiempo así como el mantenimiento del peso corporal en un nivel particular alrededor de unas cuantas libras. Este nivel es denominado punto de regulación óptimo (Set Point). Sin embargo, este punto cambia en periodos largos de tiempo, con el estado funcional, nivel de ejercicio u otros factores (Steward, 2000). Las lesiones hipotalámicas pueden alterar el “Set Point” para la regulación del peso corporal. Lesiones bilaterales en el hipotálamo ventromedial producen obesidad mientras que lesiones en el hipotálamo lateral producen pérdida de peso corporal, en ambas situaciones las ratas defienden su nuevo peso corporal causado por la restricción o el exceso de alimentación (Hoebel, y Teitlebaum, 1966; Keesey, Boyle, Kemnitz, y Mitchel, 1976). Si el crecimiento es inhibido por una restricción temporal, hay un periodo subsecuente de crecimiento compensatorio en el que los animales alcanzan la composición control ya sea por el incremento en el consumo de alimento o utilizando eficazmente la energía (Wilson y Osbourn, 1960) El cuerpo está gobernado por señales de retroalimentación que controlan el consumo de nutrientes y el metabolismo. En el

caso de los humanos solemos mantener el mismo peso corporal por muchos años, hasta que un pequeño incremento o decremento del consumo diario de calorías puede eventualmente resultar en un cambio substancial del peso que con el paso del tiempo se ajusta nuevamente.

ESTRUCTURAS INVOLUCRADAS EN LA CONDUCTA ALIMENTARIA

El hipotálamo juega un rol importante en la regulación de consumo de alimento. Se piensa que diferentes regiones del hipotálamo están involucradas en la iniciación y la supresión de la ingesta del alimento, principalmente bajo el control de dos regiones del hipotálamo: la región ventromedial y la lateral (Hoebel y Teitelbaum, 1962). En 1942 Hetherington y Ranson descubrieron que la destrucción del núcleo ventromedial produce un incremento en la ingesta de alimento (hiperfagia) y obesidad severa. En contraste, las lesiones bilaterales del hipotálamo lateral producen un severo decremento en el consumo de alimento (hipofagia) por lo que el animal muere a menos que se encuentre bajo alimentación forzada. La estimulación eléctrica produce efectos opuestos a las lesiones. Esto dio la pauta de que en el hipotálamo lateral se encuentra un “centro de ingesta” y en el hipotálamo medial el “centro de saciedad” (Kupfermann, Kandel e Iversen, 2000). Dentro del hipotálamo, neuronas que residen en el núcleo paraventricular se sujetan a la influencia de varios factores periféricos, incluyendo la leptina y la insulina (Abhiram, 2004).

Otra de las estructuras cerebrales involucradas en el consumo de alimento es el NAcc el cual es considerado un substrato neural importante en la regulación de conductas motivadas y apetitivas así como también en las propiedades reforzantes del abuso de drogas (Koob y Bloom, 1988; Robbins, Cador, Taylor y Everitt, 1989; Robbins y Everitt, 1996). Basso y Kelley (1999) al inyectar 20 y 50ng de muscimol (agonista GABA_A) a través de cánulas en diferentes regiones del NAcc, encontraron que la inducción de alimento por muscimol es altamente circunscrita y específica a la región medial del NAcc, ya que las infusiones de este agonista en el área ventral y lateral de dicha estructura no activa el consumo de alimento. El NAcc despliega conexiones neuroanatómicas con diversas regiones cerebrales que se sabe están involucradas en el control de conductas alimentarias, como son el hipotálamo lateral, la amígdala y el núcleo del tallo cerebral autónomo (Kelley y Domesick, 1982; Heimer Zahm, Churchill, Kalivas y Wohltmann, 1991). Las células en el hipotálamo lateral parecen ser activadas por la aplicación de un agonista GABA en las neuronas del NAcc, por lo que al

excitar eléctricamente las neuronas del hipotálamo lateral se sabe que inducen intensamente la alimentación en ratas saciadas (Stratford y Kelley; 1999). Esta evidencia sugiere que las proyecciones neurales del núcleo medial del accumbens al hipotálamo lateral juegan un rol importante en el control de la conducta alimentaria.

FACTORES METABÓLICOS: NEUROPEPTIDOS, PÉPTIDOS INTESTINALES Y HORMONAS.

En el tracto digestivo, principalmente en estómago y duodeno, se codifica información de distensión, contracción, así como de la concentración y composición química del contenido gástrico (Escobar-Briones, 2002). Diversos péptidos secretados en el tracto gastrointestinal o inducidos por señales alimenticias indican el contenido energético o el flujo de energía al cerebro. Dichos péptidos incluyen la leptina, la colesistoquinina, factor liberador de corticotropina, somastostatina, enterostatina, bombesina, glucagon y GLP (glucagón like peptide) los cuales son hipofágicos (inhiben el consumo de alimento). El neuropéptido Y (NPY), orexina, galanina y opioides endógenos tiene efectos hiperfágicos (estimulan el consumo de alimento) (Melanson, 2004).

A partir del descubrimiento de la leptina, hormona secretada por el tejido adiposo blanco, la cual esta involucrada en la regulación del alimento, del gasto energético, y el nivel de reserva de grasa, se describieron receptores para la leptina en el hipotálamo lateral, con la capacidad de participar en el control del equilibrio energético y funcionar como un censor de las reservas lipídicas del organismo. Este péptido esta completamente ausente en el fenotipo ob/ob de ratas obesas. La administración crónica de leptina corrige este fenotipo de los ratones mutantes (Díaz y Vázquez, 2002).

De manera general, se reconocen 3 acciones principales de la leptina: disminución de la ingestión de alimento, control de la diabetes resistente a insulina e impedimento de la infertilidad (Díaz y Vázquez, 2002). Ha sido demostrado que la secreción de leptina es regulada por otras hormonas como la insulina, glucocorticoides y otros esteroides (Sabath, 2002). Ausencia total de leptina o insensibilidad causa hiperfagia, obesidad mórbida, diabetes, una variedad de anormalidades neuroendocrinas y disfunción automática e inmune (Friedman y Halaas, 1998).

La interacción de la leptina con sus receptores en el SNC puede canalizarse por varias vías diferentes. La vía del neuropeptido Y y la vía de las melanocortinas son las 2 más estudiadas y de las que se conoce más detalle (Fariñas, et al., 2005).

Vía del NPY

El neuropeptido Y (NPY) producido por el hipotálamo ejerce un efecto estimulante directo sobre la conducta, e indirecto sobre la secreción de insulina y el almacenamiento de energía. En un sujeto normal, la leptina inhibe la secreción del NPY (Díaz y Vázquez, 2002) actuando sobre receptores hipotalámicos produciendo una disminución del consumo de alimento y un incremento en la actividad metabólica (Kalra y Kalra, 2003). En condiciones relacionadas con la pérdida de peso o con un balance negativo, como el ejercicio intenso, la restricción calórica y la lactancia, la vía del NPY se activa provocando un incremento del apetito, respuesta mediada por la reducción de la retroinhibición negativa de la leptina y la insulina (Flier y Maratos-Flier, 1998). Con el aumento de peso o con la ingestión de comida, el incremento de los niveles de leptina suprime la actividad de la vía del NPY (Horvath, Diano, y Tschöp, 2004). El papel del NPY actúa a través de distintos receptores: Y1 a Y5, siendo Y5 los más selectivos para estimular la ingesta (Gerald, Walker, Criscione, Gustafson, Batzl-Hartmann, Smith, Vaysse, Durkin, Laz, Linemeyer, Schaffhauser, Whitebread, Hofbauer, Taber, Branchek, Weinshank, 1996; Berglund, Wiemann, Clifton, Huhtaniemi y Steiner, 2003). Por otro lado se sabe que el NPY está implicado en la modulación del consumo de etanol en ratas con preferencia al alcohol. Las ratas P (ratas con preferencia al alcohol) y las HAD (ratas con consumos altos de alcohol) tienen bajos niveles de NPY en la amígdala comparadas con las controles (Ehlers, Li, Lumeng, Hwang, Somes, Jimenez y Mathe, 1998). La primera indicación de que el NPY puede influenciar la autoadministración de alcohol viene de un estudio realizado con hamsters dorados el cual demuestra un incremento en el consumo de alimento, agua y etanol después de la infusión intracerebroventricular de NPY (Kulkosky, Glazner, Moore, Low y Woods, 1988). Por otro lado Rojdmarm, Calissendorff y Brismar, (2001), encontraron que la ingestión moderada de alcohol tiene un efecto inhibitorio en la secreción de leptina en sujetos normales. Kiefer, Jahn, Otte, Demiralay, Wolf y Wiedemann, (2005) midieron la concentración de leptina en plasma de 160 adictos alcohólicos en abstinencia durante el tratamiento con Ntx vs Acamprosato (calcio acetilhomotaurinato, que

posee efectos sedantes semejantes a los del neurotransmisor GABA) y Ntx con Acamprosato, observaron un incremento de la concentración de leptina en plasma durante el placebo, mientras que durante el tratamiento individual o combinado con Ntx y Acamprosato, la leptina decremataba significativamente con respecto al placebo. De lo cual deducen que hay una asociación de la concentración de leptina con la duración de la abstinencia mientras que el incremento de leptina está relacionado con la recaída en el consumo del alcohol.

La acción del NPY sobre los receptores Y5 puede afectarse por otros neurotransmisores como el GLP-1, que inhibe la ingesta y disminuye el efecto orexigénico del NPY (Turton, O'Shea, Gunn, Beak, Edwards, Meeran, Choi, Taylor, Heath, Lambert, Wilding, Smith, Ghatei, Herbert y Bloom, 1996).

El sistema opioide posiblemente está involucrado en la sobre-alimentación y en la ganancia de peso corporal inducido por NPY, por otro lado se sabe que los antagonistas opioides como la naltrexona y la naloxona administrada periférica e intracerebroventricularmente reducen el consumo de alimento inducido por dicho neuropéptido (Levine, y Morley, 1984; Levine, Grace, y Billington, 1990). Las neuronas productoras de NPY están sinápticamente unidas con neuronas que secretan β -endorfinas (Chen, Li, Haskell-Luevano, Cone y Smith, 1998). Los efectos bien documentados del NPY como son la inhibición de la liberación de gonadotropinas pituitarias en ratas gonadectomizadas y la estimulación de la alimentación puede estar mediado, en parte por la estimulación de β -endorfinas (Kalra, Norlin y Kalra, 1995).

Kotz, Grace, Briggs, Billington y Levin (1996), realizaron dos experimentos, en el primero utilizaron dos grupos de ratas, uno de ellos privado de alimento por 48 horas y otro con libre acceso al alimento, cada grupo a su vez se dividió en dos sub-grupos, tratados con Ntx (70 μ g/h por minibombas) o con salina. El peso corporal y el consumo de alimento fueron medidos a las 0, 24 y 48 horas, inmediatamente después las ratas se decapitaron y se analizó el tejido (arcuato (ARC) del núcleo paraventricular (PVN) y la corteza (CTX)). El segundo experimento consistió en un grupo tratado con Ntx (70 μ g/h) y otro grupo que solo recibió salina, amáoslos dos grupos estuvieron privados de alimento por 48 horas. Después de la privación se les presentó el alimento y se midió su consumo en la 1^a, 2^a y 4^a horas después de que terminó la privación de alimento. las minibombas liberaban Ntx durante el periodo de privación y las 4hrs siguientes. Kotz y cols encontraron que la administración periférica de Ntx incrementa los

niveles de NPY en el ARC en ratas privadas de alimento y con libre acceso a este. La privación de alimento produjo un incremento de los niveles de NPY hipotalámico y un incremento de mRNA para NPY en las tratadas con Ntx. La privación de alimento estuvo asociada con bajos niveles de insulina en suero y altos niveles de NPY en ARC y PVN. Los cambios en la expresión génica debido a la Ntx fueron independientes del consumo de alimento y la insulina plasmática, estos resultados disminuyen la probabilidad de la influencia de las señales periféricas en la neuroactividad del NPY e incrementa la probabilidad de una conexión neural entre los sitios neurales opioidérgicos y la expresión génica.

Vía de las melanocortinas

La hormona estimulante de los melanocitos (MSH) es un potente péptido anorexigénico que juega un papel importante en la homeostasis energética, primeramente, por medio de acciones en los receptores MC4-R (Huszar, Lynch, Fairchild-Huntress, Dunmore, Fang, Berkemeier, Gu, Kesterson, Boston, Cone, Smith, Campfield, Burn y Lee, 1997).

Los receptores MC4-R presentan dos tipos de ligandos opuestos que actúan sobre ellos, estableciendo un sistema de regulación específica: efectores agonistas (α MSH) con acción anorexigénica y los efectores antagonistas (AgRP o proteínas análogas a la codificadas por el gen *Agouti*, con acción antagonista) (Foster, Joppa, Markison, Gogas, Fleck, Murphy, Wolff, Cismowski, Ling, Goodfellow, Chen, Saunders y Conlon, 2003). El péptido *Agouti* también es un antagonista específico de los receptores de melanocortinas MC4-R, acción que sería la causante de la obesidad (Fariñas, Meléndez, Martínez, Travieso, Posada y Dujarric, 2005).

La α MSH se forma a partir de la proopiomelanocortina (POMC), cuya expresión puede regularse por la leptina (Bjorbaek y Hollenberg, 2002; Zimanyi y Pelleymounter, 2003), la cual estimula la expresión de POMC en las neuronas del núcleo arqueado, donde un tercio de estas contiene el receptor de leptina, esas neuronas pueden proyectar sus axones que contienen α MSH a las neuronas que contienen receptores MC4-R de otra parte del hipotálamo. El sistema de melanocortinas tiene un antagonista endógeno AgRP, el cual es co-expresado en la misma población neuronal, como el NPY. AgRP actúa como un antagonista (o un agonista inverso) en MC3-R y MC4-R para aumentar el consumo de comida y la disminución del gasto de energía (Horvath, Diano, y Tschöp, 2004; Zimanyi y Pelleymounter, 2003).

Los opioides y el sistema MSH interactúan de tal forma que la naltrexona reduce los efectos estimulantes de AgRP en el proceso de ingesta incrementando el número de células MSH que activan c-fos en el núcleo arcuato del hipotálamo (Hagan, Rushing, Benoit, Woods y Seeley, 2001). La naltrexona reduce el consumo de alimento inducido por AgRP, pero no después de 24hrs de la administración de AgRP (Olszewski, Wirth, Grace, Levine y Giraud, 2001).

Como se sabe el NPY y la Pro-opiomelanocortina (POMC), están involucrados en la conducta alimentaria, por otro lado se sabe que el ayuno incrementa la expresión de estos dos neuropéptidos en el núcleo arcuato (Gautron, Mingam, Moranis, Combe y Laye, 2005) así como de AgRP (Hahn, Breininger, Baskin y Schwartz, 1998) causando un incremento en la ingestión.

También se ha encontrado que, desde hace mucho tiempo las orexinas juegan un papel importante en múltiples procesos fisiológicos incluyendo, el control del consumo de alimento. La administración central de orexinas estimula la ingesta y su producción aumenta con el ayuno (Fariñas, Meléndez, Martínez, Travieso, Posada, y Dujarric, 2005).

CONSUMO DE ALIMENTO Y ALCOHOL: EVALUACIÓN DIFERENCIAL

Las ratas que consumen alcohol reducen su ingesta de alimento casi en una proporción directa al consumo de energía obtenida del alcohol (Mitchell y Curzon, 1940). Cuando el consumo de alcohol es la única fuente de fluido, por lo menos 3 sistemas reguladores están involucrados: el sistema regulador del fluido, la regulación calórica, y la capacidad para el metabolismo del alcohol (Larue-Achagiotis, Poussard y Louis-Sylvestre, 1990).

El índice de masa corporal es positivamente correlacionado con el consumo del alcohol (Wannamethee y Sharper, 2003; Lahti-Koski, Pietinen, Heliövaara y Vartiainen, 2002) aumenta el consumo de alcohol, aumenta el índice de masa corporal, dando un soporte adicional a que el alcohol es un factor de riesgo para la obesidad. No obstante, no todos los estudios epidemiológicos encuentran relación entre el alcohol y el índice de masa corporal.

El consumo de alcohol afecta muchos neurotransmisores, hormonas y otras señales aferentes, incluyendo leptina, neuropéptido Y (NPY), serotonina (5-HT), ácido γ -aminobutírico (GABA), opioides y GLP-1 (glucagón-líke peptide de sus siglas en inglés). Cambios en cualquiera o en todos puede producir la carencia de la compensación en la reducción del

consumo de alimento seguida de la ingestión de alcohol o la estimulación a corto plazo del apetito por el alcohol (Yeomans, Caton, y Hetherington, 2003).

El NPY se sabe tiene efectos hiperfágicos, los cuales son atenuados por la presencia de leptina (Wang, Bing, Al-Barazanji, Mossakowaska, Wang, McBay, Neville, Taddayon, Pickavance, Dryden, Thomas, McHale, Gloyer, Wilson, Buckingham, Arch, Trayhurn y Williams, 1997). Se ha mostrado en animales que la ingestión de alcohol conduce al incremento en los niveles de NPY central (Clark, Keaton, Sahu, Kalra, Mahajan y Gudger, 1998). A su vez, moderadas cantidades de alcohol producen un efecto inhibitorio en la secreción de leptina (Yeomans, Caton, y Hetherington, 2003) incrementando por ende la liberación de NPY, y así induciendo la conducta alimentaria. También se sabe que la administración central de antagonistas opioides decrementa el consumo de alimento inducido por NPY (Kotz, Grace, Billington, y Levine, 1993; Lambert, Wilding, Al-Dokhayel, Gilbey, y Bloom, 1993; Levine, Grace, y Billington, 1990).

La Ntx administrada en el núcleo del tracto solitario (NTS) decrementa el consumo de alimento inducido por NPY inyectado en el núcleo paraventricular (NPV) indicando que el consumo producido por NPY en NPV es un relevo en la vía funcional de los receptores opioides en el NTS (Kotz, Glass, Levine y Billington, 2000).

Muchas de las acciones fisiológicas y farmacológicas del alcohol han sido atribuidas a los efectos sobre el sistema GABAérgico (Chester y Cunningham, 2002), este sistema también juega un papel en el control normal del alimento. La estimulación de los receptores GABA_A hipotalámicos incrementa el consumo de alimento y el peso corporal (Woods y Seeley 2006). El agonista GABA_A, muscimol administrado en la corteza del NAcc incrementa la ingesta de alimento, lugar de preferencia y reacciones hedónicas positivas (Khaimova, Kandov, Israel, Cataldo, Hadjimarkou y Bodnar, 2004) Por otro lado las microinyecciones de GABA en el área tegmental ventral (ATV) altera la conducta apetitiva, (Ikemoto y Panksepp, 1996) y la administración del agonista GABA_A, muscimol, en el ATV produce potentes respuestas a comer y beber (Klitenick, y Wirtshafter, 1988)

El alcohol también induce la liberación de opioides endógenos (Widdowson y Holman, 1992) y esto ha sido implicado en la mediación de los efectos reforzantes del alcohol. Los opioides también están implicados en los componentes de la recompensa orosensorial del alimento. La liberación opioide inducida por alcohol modifica subsecuentemente la liberación

opioide inducida por el alimento, aunque no ha sido probado, pero es otro componente potencial neural de la estimulación del apetito por el alcohol (Yeomans, Caton, y Hetherington, 2003).

RESTRICCIÓN O PRIVACIÓN DE ALIMENTO

Se sabe que la restricción o privación de consumo de alimento afecta la liberación de opioides hipotalámicos, generalmente decrementándolos. Similarmente, los niveles de β -endorfinas disminuyen en el núcleo arqueado de las ratas después de una restricción prolongada (16 días) restricción de alimento (Knuth y Friesen, 1983) y es menor en el plasma de sujetos obesos después de la restricción calórica (Scavo, Barletta, Buzzetti, y Vagiri, 1988). En contraste, los niveles de dinorfinas inmunoreactivas se elevan en regiones hipotalámicas de animales restringidos crónicamente (Berman, Devi y Carr 1994). Se sabe que la privación de alimento decrementa los niveles de mRNA POMC hipotalámicos (Bergendahl, Wiemann, Clifton, Huhtaniemi y Steiner, 1992; Brady, Smith, Gold y Herkenham, 1990; McShane, Petersen, McCrone, y Keislerl, 1993) y también el mRNA para prodinorfinas (Chua, Brown, Kim, Hennessey, Leibel y Hirsch, 1991). Los estudios encontrados son inconsistentes ya que por un lado se sabe que la privación alimentaria reduce los niveles hipotalámicos de β -endorfinas (Gambert, Garthwaite, Pontzer y Hagen, 1980; McLaughlin, Baile y Della-Fera, 1985) y dinorfinas (Vaswani y Tejwani, 1986), y por otro lado se ha reportado un incremento de estos péptidos en respuesta a la privación de alimento en ciertas regiones del cerebro (Majeed, Lason, Przewlocka y Przewlocki, 1986; Mitev, Almeida y Patchev, 1993).

Existe un papel fisiológico del NPY en el control del consumo de alimento después de un periodo de privación. Stanley, Magdalin, Seirafi, Nguyen, y Leibowitz, (1992) utilizaron anticuerpo de NPY para examinar el papel del NPY en el control del consumo de alimento inducido por el ayuno en ratas que se mantuvieron en una dieta altamente apetitosa. Los animales que consumieron dicha dieta incrementaron el consumo de alimento, con el tiempo se volvieron obesos y tuvieron un incremento de los niveles de NPY hipotalámicos (Wilding, Gilbey, Mannan, Aslam, Ghatei y Bloom, 1992). Lambert, Wilding, Al-Dokhayel, Bohuon, Comoy, Gilbey, y Bloom, (1993) ampliaron estas observaciones demostrando el papel del NPY en el control central de consumo de alimento después de la privación de alimento.

Con respecto al consumo de agua se sabe que al mismo tiempo que las ratas son expuestas a la restricción de alimento, aún cuando el agua esta disponible en todo momento, dejan de beber mientras dura el periodo de restricción de alimento (Martínez, 2007). López Espinosa y Martínez (2001) utilizaron dos programas de privación alimentaria. Al primero se le privó por 24hrs y al segundo grupo por 12hrs de restricción, por 12hrs de acceso libre. Encontraron que el consumo de alimento se modificó en los periodos de privación, mostrando un consumo elevado al término de la restricción y decreciendo gradualmente los días subsecuentes. El consumo de agua mostró efectos diferenciales dependiendo del programa de privación. Durante la privación alimentaria de 24hrs el consumo de agua decreció y en los periodos de libre demanda mostró aumentos en el consumo mayores al de la línea base.

OPIOIDES

Opioide, es el término utilizado para referirse únicamente a los compuestos endógenos con acciones semejantes a la morfina, pero esta distinción ha desaparecido gradualmente y ahora es utilizada tanto para los opioides endógenos como para los exógenos (Olson, Olson y Kastin, 1991). El sistema opioide está involucrado en tres funciones principales: 1) modulación de la respuesta a estímulos dolorosos y estresantes, (Fernández-Guardiola, 1994), 2) en el reforzamiento de conductas ante estímulos percibidos como gratificantes, y 3) en funciones homeostáticas de adaptación, como la regulación de la temperatura corporal, consumo de agua y alimento (Gianoulakis, 2001).

Los opioides endógenos están divididos en 3 grupos: las endorfinas, encefalinas y las dinorfinas. Las endorfinas surgen de la β -lipotropina, la cual se une a la Pro-opiomelanocortina (POMC). La β -lipotropina, actúa como una pro-hormona para diversos y largos fragmentos de aminoácidos, α , β y γ -endorfinas. La proencefalina es el precursor de las encefalinas y la prodinorfina el precursor de las dinorfinas.

Las tres familias de neuropéptidos opioides son diferencialmente expresadas a lo largo del SNC. El núcleo arqueado del hipotálamo es una de las regiones donde se sintetizan principalmente las endorfinas; ahí se encuentran en todas las células del lóbulo intermedio y de las células pituitarias que contienen ACTH.

La proencefalina fue inicialmente descubierta en las glándulas adrenales y posteriormente en el cerebro. Las neuronas que contienen proencefalina están más

ampliamente distribuidas en el cerebro que las neuronas que contienen POMC. Se localizan especialmente en el diencéfalo y el tronco encefálico.

El pálido ventral esta densamente innervado con células y fibras de dinorfinas, mientras que el globo pálido está enriquecido con encefalinas.

Se sabe que en ratones obesos se ha encontrado que los niveles de β -endorfinas y dinorfinas se encuentran elevados en el núcleo hipotalámico dorsomedial (Balon-Perin, Kolanowski, Berbinschi, Franchimont y Ketelslegers, 1991) mientras que en humanos obesos los niveles de β -endorfinas están elevados en plasma (Khawaja, Chattopadhyay, y Green, 1991) y se encontró que se correlacionaban positivamente con el peso corporal.

Clasificación de los receptores opioides

Los receptores opioides son miembros de la familia de receptores transmembranales acoplados a proteínas G: μ , δ y κ .

Los receptores μ muestran alta afinidad a morfina y menor a encefalina. Se encuentran altamente distribuidos en el cerebro y en la médula espinal, principalmente postsináptica y ocasionalmente presinápticamente (Ding, Kaneko, Nomura, y Mizuno, 1996). Altos niveles de mRNA para receptores μ se encuentran en el tálamo, estriado, locus ceruleus y el núcleo del tracto solitario y en menor cantidad en el cerebro y en la médula espinal. Se dividen en: μ_1 y μ_2 , estos intervienen en la analgesia, euforia, sensación placentera, junto con el decremento de la respiración, tono muscular, movimiento del tracto digestivo y cambios hormonales (Villarejo, 1998).

Los receptores κ muestran gran afinidad a las dinorfinas. Representan aproximadamente el 10% del total de las uniones a opioides en el cerebro de la rata y se localizan en altas concentraciones en el núcleo accumbens, sustancia nigra, área ventral tegmental y el núcleo del tracto solitario. Se encuentran predominantemente en el hipotálamo y están presentes en el lóbulo neural e intermedio de la pituitaria (Mansour, Burke, Pavlic, Akil y Watson, 1996). Los receptores κ se dividen en κ_1 y κ_2 . La actividad de estos receptores produce analgesia, sedación, sueño, producción de orina y miosis (Villarejo, 1998).

Los receptores δ tienen alta afinidad para las encefalinas y mínima afinidad a endorfinas y morfina. Se encuentran distribuidos en la corteza, estriado y el área reticular lateral. Incluye 2 subgrupos δ_1 y δ_2 . La actividad de estos receptores tiene un impacto

en el reforzamiento de drogas, respiración, humor y también pueden intervenir en la analgesia (Villarejo, 1998).

Los receptores mu y kappa juegan un importante papel en la integración sensorial, tanto en la regulación de la secreción de hormonas del eje hipotálamo-pituitaria y de las conductas homeostáticas como consumo de alimento y agua, conducta sexual y regulación de la temperatura.

La activación de los receptores mu y delta suelen producir patrones semejantes en la liberación de neurotransmisores, mientras que la activación de receptores kappa suelen producir patrones opuestos (Oswald y Wand, 2004).

ANTAGONISTAS OPIOIDES Y CONSUMO DE ALIMENTO

La naltrexona (Ntx) un antagonista opioide inespecífico, tiene una vida media de 2.7 ± 1.0 hrs (González y Brogden, 1988). La naltrexona es utilizada en clínica para decrementar el consumo del alcohol, dependencia a opiáceos, aunque también se han encontrado estudios en los que se le utiliza para decrementar el peso o para controlar la anorexia y la bulimia. Spiegel, Stunkard, Shrager, O'Brien, Morrison y Stellar (1987), encontraron que al incrementar en 4 días consecutivos la dosis de naltrexona de 25 a 200 mg se reduce en un 30% el consumo de comida en hombres obesos aunque el peso corporal y el consumo de agua no se vieron afectados con la droga. Sugieren que una prueba de aversión condicionada o anorexia condicionada se puede desarrollar en algunos sujetos.

Jones y Corp (2003) al administrar Ntx ($73\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{h}$) crónicamente a hamsters machos por medio de minibombas en un periodo de 6 días, observaron un incremento en el consumo de alimento. En contraste, estos autores no encontraron diferencias entre los grupos control y experimental cuando la administración de Ntx fue aguda ($3\text{mg}/\text{kg}$ i.p.) y se hizo 30 minutos antes de la exposición al alimento con una hora previa a la privación.

La potencia de los agonistas y antagonistas opioides en el consumo de alimento es asociada fuertemente con el sabor del alimento y sus características nutricionales. Los diversos antagonistas opioides causan diferentes efectos en el consumo diferencial de carbohidratos, grasas, proteínas y el total de nutrientes. Los resultados de su administración dependen del sabor de la dieta, de la especie bajo estudio y la ruta de administración del antagonista, todos afectan los resultados (Strand, 1999). Yeomans y Gray (1996) encontraron que en los humanos

la administración de 50 mg de Ntx reduce significativamente el consumo de grasas y proteínas pero el consumo de alimentos salados y dulces no es afectado por la Ntx.

Se sabe que los antagonistas opiáceos actúan bloqueando los receptores a opioides decrementando el consumo de alimento y disminuyendo el peso en ratas obesas (Marin-Bivens y Olster, 1999; Jarosz y Metzger, 2002). La administración icv de beta-endorfinas o dinorfinas incrementan el consumo de alimento, un proceso que es reducido por naloxona o naltrexona. Los roedores genéticamente obesos paran de comer cuando son tratados con antagonistas opioides (Margules, Moisset, Lewis, Shibuya y Pert, 1978).

ANTAGONISTAS OPIOIDES, CONSUMO DE ALCOHOL Y AGUA

Se ha descrito que el efecto de la Ntx sobre el consumo de alcohol es independiente de la dosis, a mayor dosis mayor efecto (Gardell, Hubbell y Reid, 1996; Coonfield, Hill, Kaczmarek, Ferraro y Kiefer, 2002; Hill y Kiefer, 1997; Phillips, Wenger y Dorow, 1997). Por ejemplo, Hill y Kiefer, (1997) encontraron que la naltrexona produce un mayor decremento en la respuesta de ingestión de alcohol al 10%, así como un cambio en su valor hedónico con 3mg/kg que con 1mg/kg. En el caso del alimento se ha encontrado el mismo efecto dependiente de la dosis por ejemplo Kanarek, Mathes, Heisler, Lima y Monfared (1997), encontraron con ratas Long-Evans que tenían acceso a croquetas de alimento o croquetas y una solución de sacarosa al 32%, que las inyecciones de Ntx (0.3 ó 3mg/kg) causaron efectos mínimos en el consumo de los animales que consumieron únicamente croquetas. En contraste, la Ntx produjo un decremento dependiente de la dosis en el consumo de croquetas en las ratas que consumieron previamente sacarosa.

Por otro lado, también se ha estudiado el efecto de la Ntx sobre la liberación de β -endorfinas. Por ejemplo Zalewska-Kaszubska, Gorska, Dyr y Czarnecka (2008) encontraron que la administración i.p. de 2mg/kg de Ntx por 10 días causó un incremento significativo de β -endorfinas en plasma de un grupo de ratas Warsaw High Preferring, con libre acceso a alcohol, esto con respecto al grupo control y un grupo salina con acceso a agua. Estos hallazgos sugieren que la Ntx puede operar por dos mecanismos diferentes, un mecanismo principal que actúa bloqueando los receptores opioides, causando un decremento en el efecto de reforzamiento positivo del incentivo, y otro mecanismo que se basa en el tratamiento repetido con Ntx, produciendo un incremento de las concentraciones de β -endorfinas. Este

incremento en la liberación de β -endorfinas pituitaria puede probablemente restablecer la distribución del balance en el sistema mesolímbico de recompensa, los cambios en la liberación de β -endorfinas en la pituitaria podrían reflejar cambios similares en la liberación de β -endorfinas a nivel central (Dai, Thavundayil y Gianoulakis 2005)

Se sabe que, la naltrexona puede reducir el consumo de agua mientras este antagonista es administrado. Goodwin, Campisi, Babinska, y Amit, (2001) midieron el consumo de 24hrs de alcohol al 10%, sacarina al 0.1%, quinina al 0.0006%, sacarina 0.4% + alcohol al 10%, y sacarina 0.4% + quinina 0.04% cuando se les administraba diariamente 10mg/kg de Ntx (i.p) 1hr antes de que se apagara la luz a ratas machos Long-Evans y Wistar, encontrando que el consumo de agua disminuía con respecto a la LB durante la fase de tratamiento en todos los grupos, excepto en aquel que bebió cuando se tenía acceso al agua junto con la solución de sacarina al 0.1%. La reducción en el consumo de agua fue probablemente el resultado en el incremento del consumo de las sustancias saborizadas a las cuales los sujetos tenían acceso voluntario y no hubo recuperación aún cuando la Ntx se suspendió. Estos datos no se confirman en otros estudios realizados por diferentes autores, los efectos de la Ntx dependen de las condiciones experimentales es decir, de la dosis y del consumo de otras sustancias. Por otro lado, se sabe que la Ntx reduce selectivamente el consumo de fluidos que mantiene la mayor cantidad de respuestas (Williams y Woods, 1999).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Naltrexona (Ntx) es un antagonista opioide utilizado en clínica para decrementar el consumo del alcohol, la dependencia a opiáceos y también para decrementar el peso o para controlar la anorexia y la bulimia. Por otro lado, se sabe que el consumo de alcohol puede ser un factor de riesgo para la obesidad (Suter, Hasler y Vetter, 1997), ya que en dosis bajas a moderadas aumenta el consumo de alimento. Esto podría deberse, en parte, a que el alcohol reduce la liberación de leptina, encargada de inhibir la liberación del neuropéptido Y (NPY). El NPY es un neurotransmisor orexigénico que al liberarse aumenta el consumo de alimento. También se sabe que las calorías ingeridas por el consumo de alcohol, son adicionadas a las del consumo de alimento (Yeomans, Hails y Nesic, 1999) lo cual puede tener repercusión tanto en la ingesta alimentaria como en el peso corporal del sujeto.

Por otro lado se ha sugerido que la liberación opioide inducida por alcohol pudiera modificar subsecuentemente la liberación opioide inducida por el alimento y esto pudiera ser otro componente potencial neural de la estimulación del apetito producido por el consumo de alcohol. Los antagonistas opioides se han utilizado para reducir el consumo de alimento tanto en el área clínica como en la experimental. En este último caso los estudios coinciden en el hallazgo de un decremento en la ingestión de alimento en sujetos bajo este tratamiento. Por otro lado son pocos los estudios donde se investigue el efecto diferencial de la Ntx entre un estímulo primario como es el agua y el alimento y un estímulo no primario como es el alcohol.

Estudios en nuestro laboratorio muestran que si se administra una dosis de 10mg de Ntx a ratas que tienen acceso libre al alcohol las 24hrs el consumo de alimento incrementa significativamente el consumo de alimento pero la droga no afectó el consumo del alcohol (Juárez y Barrios De Tomasi, 2007), este resultado discrepa de los hallazgos reportados en la literatura que indican la Ntx reduce tanto el consumo de alimento como el del alcohol.

Considerando que el alcohol pudiera tener alguna interacción con la Ntx en sus efectos sobre la conducta alimentaria, otro estudio en nuestro laboratorio en el que se administró la misma dosis de Ntx (10mg) a ratas que no tuvieron acceso al alcohol. En este caso, la Ntx no redujo el consumo de alimento.

Existen dos problemas entorno a los estudios de los efectos de la naltrexona sobre el alcohol y la conducta alimentaria: uno de ellos está relacionado con el tiempo en que se evalúan los efectos después de administrado el fármaco, ya que la mayoría de los estudios

reportados en la literatura analizan los efectos del antagonista opioide en un máximo de 4 horas subsecuentes a su administración. Si consideramos que la vida media de la Ntx es de 2.7 ± 1.0 hrs, es posible que durante las primeras horas posteriores a su administración el efecto sea más evidente que posteriormente, cuando la sustancia activa ya ha sufrido un proceso de metabolización. Con esta base consideramos conveniente estudiar el patrón de consumo de alimento evaluado a lo largo del día.

El segundo problema está relacionado con las condiciones de privación o restricción de los sujetos, ya que cuando se estudian los efectos de la Ntx sobre la conducta alimentaria generalmente se recurre a la privación o restricción de alimento, al uso de alimento azucarado o dietas especiales en solución, así como el uso de inyecciones de sustancias con el fin de inducir el consumo de alimento; en cambio, son escasos los estudios en ratas en los cuales se analice qué sucede cuando la Ntx es administrada en condiciones de libre acceso al alimento. El valor incentivo del alimento varía dependiendo del estado motivacional, de tal manera que el sustrato neurobiológico subyacente puede ser diferente en estados de libre alimentación de aquellos de estados privados de alimento (Rudski, Billington y Levine, 1994; Nader y van der Kooy 1997).

Para atender a esta problemática consideramos que es importante estudiar el efecto de la Ntx en el consumo diario de alimento en condiciones de libre acceso y bajo privación parcial. También, es importante estudiar qué efecto tiene la Ntx en el consumo del alimento en presencia o ausencia de acceso libre al alcohol.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar el efecto de la Naltrexona (Ntx) en los patrones de consumo de alimento en ratas con libre acceso y bajo privación parcial de alimento, en presencia y ausencia de etanol, en la rata.

HIPÓTESIS GENERAL

- El efecto de la naltrexona en los patrones alimentarios de la rata, será diferente dependiendo del estado de privación parcial alimentaria y de la presencia o ausencia de disponibilidad al alcohol.

El análisis de las hipótesis planteadas requirió de la realización de cuatro experimentos, los cuales pueden ser analizados individualmente, ya que cada uno de ellos proporciona información que contribuyen parcialmente a la solución del problema general anteriormente planteado. Para facilitar la presentación de los resultados, primero se describirán los métodos que son comunes a todos los experimentos y luego se presentaran cada uno de los experimentos por separado, con sus resultados y su discusión. Finalmente se discuten los resultados de todos los experimentos de manera integral.

MÉTODO GENERAL

VARIABLES

Independientes

- Tratamiento con Ntx con acceso continuo a alimento.
- Tratamiento con Ntx con acceso continuo a alimento y alcohol.
- Tratamiento con Ntx con previa privación parcial de alimento.
- Tratamiento con Ntx con previa privación parcial de alimento y alcohol.

Dependientes

- Consumo de alimento
- Consumo de alcohol
- Ganancia de peso corporal
- Consumo de agua
- Porcentaje de grasa

DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL

Se utilizaron 8 grupos de 10 ratas macho Wistar adultos cada uno. Considerando que las ratas tienen hábitos nocturnos, la medición periódica de las variables dependientes se hizo en esta etapa, para lo cual se les invirtió el ciclo de luz-oscuridad. Una semana antes del inicio de cada experimento, los sujetos fueron colocados en cajas individuales. Se registraron los valores de línea base de todas las variables dependientes correspondientes a cada experimento y posteriormente se evaluaron en dos semanas de tratamiento (Ntx-s1 y Ntx-s2), y una de postratamiento (PT). Los detalles se explicarán posteriormente en cada uno de los apartados correspondientes a cada experimento.

Se realizaron cuatro experimentos con dos grupos cada uno, los cuales fueron denominados de la siguiente manera: Experimento 1 administración de Ntx (10mg/kg) con acceso a alimento y agua en condiciones de no privación (Grupos: Ntx y Veh) (Fig 1); Experimento 2 administración de Ntx (10mg/kg) con acceso a alimento, agua y alcohol en condiciones de no privación (Grupos: Ntx-Alc y Veh-Alc), (Fig 2); Experimento 3 Administración de Ntx (10mg/kg) con acceso a alimento y agua en condiciones de privación parcial alimentaria (12hrs/día) (Grupos: Ntx-P y Veh-P) (Fig 3) y Experimento 4 administración de Ntx (10mg/kg) con acceso a alimento, agua y alcohol en condiciones de privación parcial de alimento (12hrs/día) (Grupos: Ntx-AlcP, Veh-AlcP) (Fig 4). En todos los grupos durante las horas del periodo de oscuridad se midió el consumo de alimento y líquidos (agua sola y agua con etanol) cada 2hrs después de la inyección del antagonista opioide o el vehículo, hasta cumplir 12hrs de medición (6 registros), posteriormente, la siguiente medida se realizó 12 horas más tarde hasta cumplir las 24hrs diarias (1 registro). En el caso de los grupos con privación parcial alimentaria (Experimento 3) y alcohol (Experimento 4), se les retiró el alimento/alcohol durante 12 horas en el período de luz para la rata, es decir, de las 8:00 PM a las 8:00 AM, después a las ratas se les inyectó la Ntx o el vehículo y se midió el consumo de las diferentes variables dependientes cada dos horas hasta cumplir 12 horas (6 registros) y empezar un nuevo ciclo. Todos los grupos tuvieron acceso a agua por 24hrs.

Los grupos con acceso a alcohol (Ntx-Alc, Veh-Alc, Ntx-AlcP, Veh-AlcP) pasaron por un período de inducción al alcohol en el cual se les iba aumentando paulatinamente la

concentración de etanol (6%, 8%, 10%) cada concentración se les dio por dos días. Cuando tuvieron acceso al 10% y los consumos se estabilizaron, se registró la LB siguiendo la metodología de cada experimento según fue el caso.

Los valores de consumo medidos a las 08:00 hrs correspondieron al consumo de las doce horas de la fase de luz y se analizaron por separado del resto de las horas de la fase de oscuridad donde se obtuvieron valores cada 2 horas.

Tratamientos

A los grupos Ntx (Ntx, Ntx-Alc, Ntx-P, Ntx-AlcP) se les inyectó Ntx 10mg/kg/día y a los grupos Veh (Veh, Veh-Alc, Veh-P, Veh-AlcP) suero fisiológico; los sujetos del Experimento 1 y los del Experimento 2, fueron inyectados a las 10:00 AM y permanecieron con acceso al alimento (Experimento 1) o a alimento y alcohol (Experimento 2) a libre demanda por 24 horas. En el caso de los Experimento 3 y 4 la inyección (Ntx o Vehículo) se administró a las 08:00 AM después de 12 horas de privación parcial de alimento (Experimento 3) o alimento y alcohol (Experimento 4); inmediatamente después de la inyección a unos grupos se les dio acceso al alimento o a otros alimento y alcohol por las siguientes 12 hrs. Al término de este período a unos grupos se les privó de comida y a otros de comida y alcohol por 12 horas de uno o ambos estímulos, esto de acuerdo al experimento en curso, para iniciar al siguiente día un nuevo ciclo de tratamiento.

Durante el periodo de PT a todos los sujetos se les suspendió el tratamiento con naltrexona o vehículo y siguieron con el mismo esquema realizado para la LB.

Análisis estadísticos

Se aplicaron análisis de varianza, los cuales fueron de dos factores, mixtos y se usó la prueba de Tukey para análisis a posteriori, tomando en cuenta un nivel de significación de $p \leq 0.05$, en todos los casos. Los valores obtenidos de las 20:00 a las 08:00 hrs, como se mencionó, representaron los consumos de 12 horas de la fase de luz y se analizaron con una prueba t de Student por separado de las horas del periodo de oscuridad. Todos los análisis corresponden a los promedios de 10 sujetos en 7 días en cada hora para todos los periodos

El factor B que representa las fases experimentales independientemente del tratamiento no es muy relevante para los objetivos de los diferentes experimentos por lo cual sólo se hará énfasis en él cuando se haya observado algún cambio en el patrón de consumo.

Porcentaje de grasa

Considerando que pudiese haber un efecto importante sobre el consumo de alimento y por ende del peso, se decidió analizar el porcentaje de grasa corporal como una variable dependiente secundaria. Este valor se determinó para los 4 experimentos por separado (n=8 para cada grupo). Se sacrificaron los sujetos y posteriormente se separó del cuerpo, la piel, las vísceras, las extremidades, la cabeza, la carne magra y la grasa. Únicamente se consideró el porcentaje de grasa de la carcaza del animal y de las vísceras.

El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de grasa} = PG (100) / PC,$$

en donde PC= promedio de peso corporal (3 días) y PG= peso grasa corporal.

Consideraciones éticas

Todas las manipulaciones y cuidados de los animales de este experimento siguieron los lineamientos especificados por la guía de uso y cuidado de animales de laboratorio, Instituto Nacional de Salud (Instituto de Recursos para Animales de Laboratorio, Commission on Life Sciences, National Research Council, 1996).

EXPERIMENTO 1

Administración de Ntx (10mg/kg) con acceso a alimento y agua en condiciones de no privación.

OBJETIVO PARTICULAR

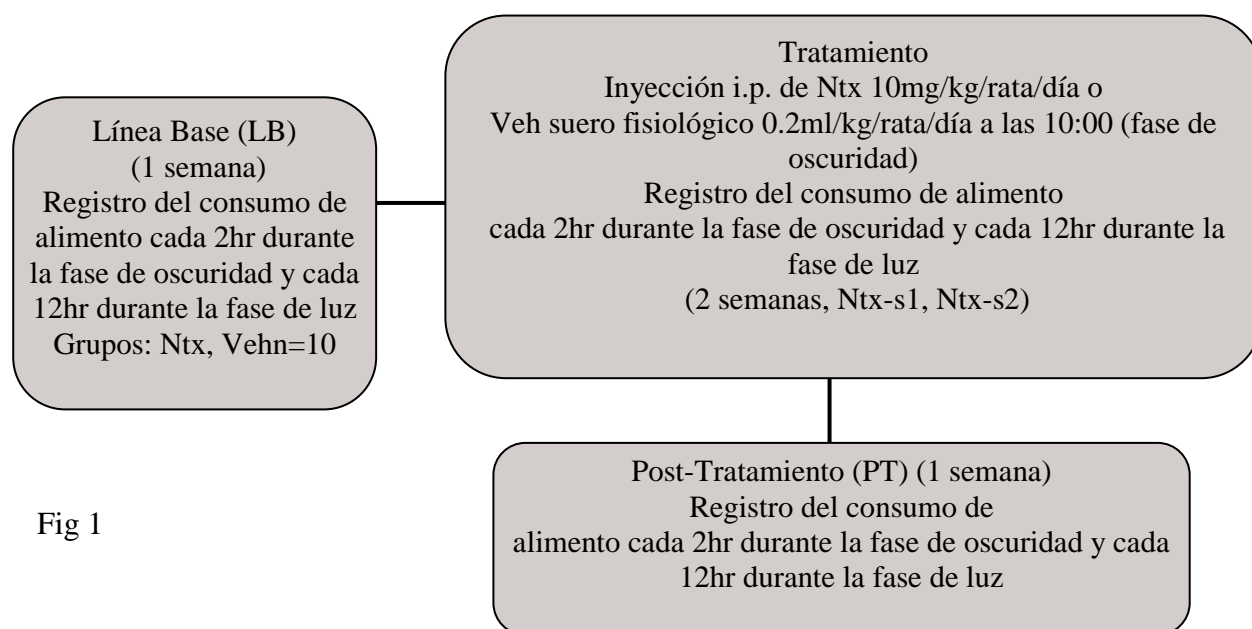
- Estudiar el efecto de una sola dosis de Ntx sobre la distribución del consumo de alimento durante 24hrs en ausencia de etanol bajo un esquema de libre acceso al alimento.

HIPÓTESIS PARTICULAR

En las horas subsecuentes a su administración, la Ntx causará un decremento significativo en el consumo de alimento, pero ese decremento se recuperará gradualmente y en 24 horas no será significativamente diferente al consumo de alimento del grupo control.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Este experimento 1 (Figura 1), participaron dos grupos (Ntx, Veh) que tuvieron acceso libre al alimento las 24 horas (Figura 1). Los grupos fueron expuestos a una semana de línea base (LB) (7 días), seguida por 14 días de tratamiento (Ntx-s1 y Ntx-s2) en las cuales al grupo Ntx se les inyectó s.c. 10mg/kg de Ntx y al grupo Veh 0.2ml/kg de suero fisiológico. Finalmente se analizó una semana de postratamiento (PT).



RESULTADOS

CONSUMO ALIMENTO

En el consumo total de alimento, el ANDEVA grupo (Ntx -Veh) X periodo (LB, Ntx-s1, Ntx-s2, PT) no mostró diferencias significativas ni en el factor grupo ni en la interacción (Fig 1.1). Se encontraron diferencias en el factor periodo ($F(3,54)=6.92$, $p=0.0005$) donde se observa que la LB fue significativamente mayor al resto de los periodos independientemente del grupo.

Con el fin de conocer el patrón de consumo de alimento posterior a la inyección de Ntx, se aplicó, para cada período, un ANDEVA de dos factores: grupos (Ntx, Veh) X hrs, (10, 12, 14, 16, 18, 20). En el consumo de alimento en gr/kg para la LB, no se encontraron diferencias significativas entre grupos, ni en la interacción. Sin embargo, para el factor horas se observaron diferencias ($F(5,90)=3.62$, $p = 0.0050$), indicando que a las 20hrs el consumo de alimento fue significativamente mayor que a las 10, 16 y 18 horas (Fig 1.2).

Debido a que el horario de las 20:00 a las 8:00 horas correspondía al periodo de de 12 horas luz, este se analizó por separado en todos los experimentos. En el Experimento 1, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

El tratamiento se administró durante 14 días divididos en dos bloques de 7 días cada uno, (Ntx-s1 y Ntx-s2) para poder evaluar claramente el efecto de la Ntx a lo largo de esos bloques.

El análisis de grupo (Ntx, Veh) X hrs (10, 12, 14, 16, 18, 20 y 8) para el consumo de alimento en el período Ntx-s1, indicó ausencia de diferencias para el factor grupo. El factor B, horas ($F(5,90)=11.15$, $p \leq 0.0000$), indicó que el consumo de alimento a las 20hrs es significativamente mayor que a las 10, 12, 14, 16 y 18 horas; a su vez, las 14hrs es significativamente mayor que las 12hrs. En la interacción ($F(5,90)=7.58$, $p \leq 0.0000$), se observa que las 20hrs de Veh es significativamente menor a las 20hrs de Ntx en Ntx-s1 (Fig 1.2). En el análisis del consumo de alimento de la fase de luz (20:00 a 08:00hrs) no se encontraron diferencias significativas entre grupos.

Durante la semana 2 de tratamiento (Ntx-s2) no se observaron diferencias significativas en el factor grupos. El factor horas ($F(5,90)=4.17$, $p= 0.0019$), mostró que a las 20hrs el consumo de alimento es significativamente mayor que a las 10, 12, 16 y 18hrs. Con respecto a la interacción para Ntx-s2, se observaron diferencias significativas ($F(5,90)=6.15$, $p= 0.0001$)

en: 20hrs Ntx mayor a 20 hrs Veh (Fig 1.2). A pesar de que se observó un decremento en el consumo de alimento a las 4 horas posteriores a la inyección de naltrexona, las diferencia con el grupo Veh no alcanzó el criterio de significación estadístico. No se encontraron diferencias entre grupos en el consumo de las 20:00 a las 08:00 hrs.

En el periodo de PT no se observan diferencias significativas en el factor A, ni en la interacción (Fig. 1.2). En el factor hrs ($F(5,90)=8.33$, $p= 0.0000$), se observaron diferencias significativas que indicaron que las 20hrs el consumo fue significativamente menor que el observado en el resto de las horas del período de oscuridad. Para el análisis de las 20-8hrs de un solo factor (grupos) se observan diferencias significativas ($F(1,18)=7.02$, $p\geq 0.0000$), las cuales indicaron un consumo mayor de alimento en el grupo Ntx con respecto al grupo Veh en este período de luz-oscuridad

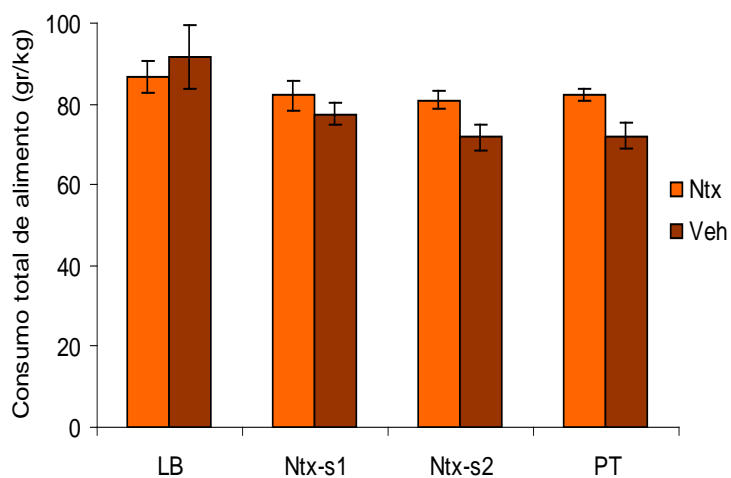


Fig. 1.1. Consumo total de alimento (gr/kg) en 24hs ($M \pm ES$), para el grupo Ntx y Veh durante los diferentes periodos.

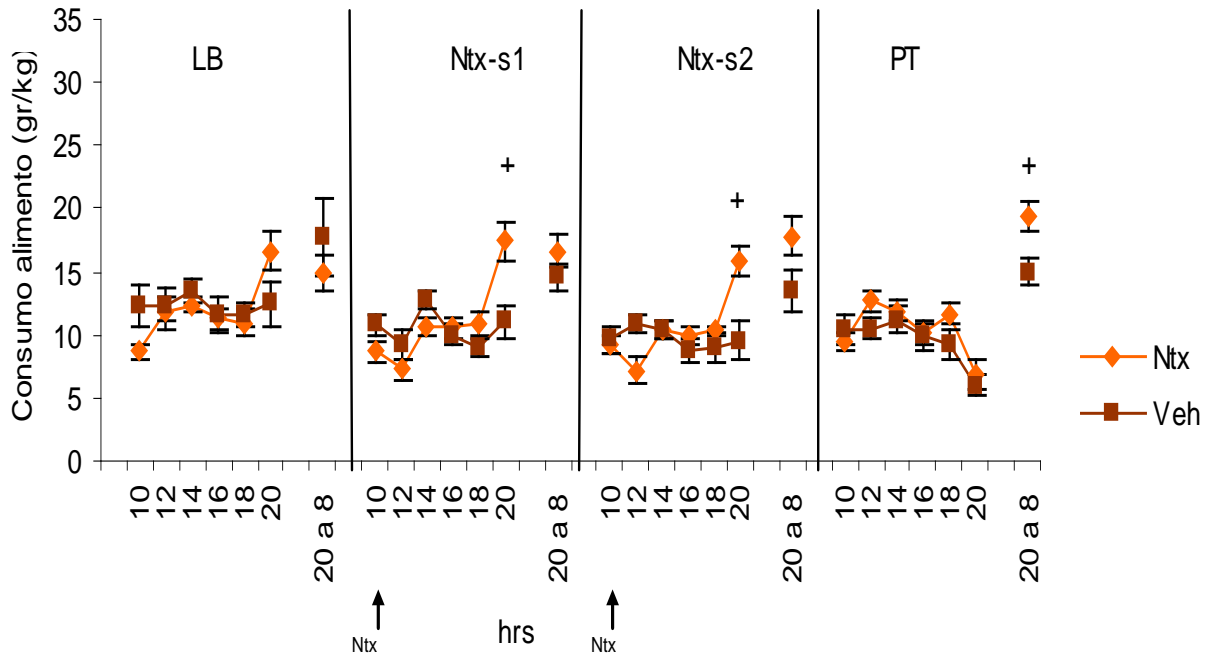


Fig. 1.2. Consumo de alimento en gr/kg ($M \pm ES$) para el grupo Ntx y Ctrl. medido cada 2hs durante 12hs. De las 10 a las 20hrs corresponde al periodo de oscuridad y de las 20 a las 8 al de luz. + Ntx > Veh

CONSUMO DE AGUA

En el análisis de consumo total de agua, grupo (Ntx-Veh) X periodo (LB, Ntx-s1 Ntx-s2, PT) no mostró diferencias en el factor grupos ni en la interacción (Fig 1.3), sin embargo sí se observaron diferencias en el factor periodo ($F(3,54)=6.05$, $p=0.0012$) donde PT es significativamente mayor a Ntx-s1 y Ntx-s2 independientemente del grupo.

En el análisis de grupos (Ntx, Veh) X hrs (10, 12, 14, 16, 18, 20) para el consumo de agua en la línea base (LB), no presentó diferencias significativas entre grupos, ni en la interacción, sin embargo para el factor hrs si se encontraron diferencias ($F(5,90)=17.88$, $p=0.0000$), indicando que a las 20 hrs, el consumo de agua es significativamente mayor que a las 10, 12, 16 y 18hrs; las 14 y 16hrs son mayores a las 10 y 12hrs; y a su vez las 18hrs es mayor a

las 10hrs. (Fig. 1.4). En el análisis de las 20:00 a las 8:00hrs no se encontraron diferencias significativas entre grupos.

Para el caso de Ntx-s1 (semana 1 de tratamiento), el análisis para el consumo de agua, grupo X hrs no mostró diferencias significativas en el factor grupos. En el factor hrs, ($F(5,90)=25.15$, $p= 0.0000$), se encontraron diferencias significativas con respecto a que las 20hrs, fue significativamente mayor a las demás horas del periodo de oscuridad; las 14, 16 y 18 a las 10 y 12hrs. El análisis mostró diferencias significativas en la interacción ($F(5,90)=7.69$, $p= 0.0000$), en donde se observa que las 20hrs del grupo Ntx es significativamente mayor a las respectivas horas del grupo Veh (Fig 1.4). En la fase de luz (20:00 a las 8:00) no se encontraron diferencias significativas entre grupos.

Para el análisis de dos factores de la semana 2 de tratamiento (Ntx-s2), grupo X hrs se observa que el factor grupo no fue significativo. En el caso del factor hrs, se encontraron diferencias significativas ($F(5,90)=24.15$, $p= 0.0000$), en donde las 16, 18 y 20 hrs son significativamente mayores a las 10, 12 y 14hrs; a su vez las 14hrs son mayor a 10 y 12hrs. En la interacción, se encontraron diferencias significativas ($F(5,90)=11.11$, $p=0.0000$), en donde las 12hrs y 14hrs del grupo Ntx son significativamente menores a las respectivas hrs del grupo Veh; las 20hrs del grupo Ntx es significativamente mayor a las mismas hrs del grupo Veh (Fig 1.4). No se encontraron diferencias significativas entre grupos en el consumo de agua entre las 20:00 y las 8:00hrs.

En el consumo de agua durante el post tratamiento (PT) se encontró en el análisis de grupos X hrs, que no hay diferencias significativas entre grupos. Sin embargo, en las horas ($F(5,90)=23.17$, $p= 0.0000$), se observa que las 14, 16 y 18hrs son significativamente mayores a las 10, 12 y 20hrs. Para la interacción, ($F(5,90)=2.74$, $p= 0.0239$), se muestran diferencias significativas entre e intra grupos que no son de nuestro interés (Fig 1.4).

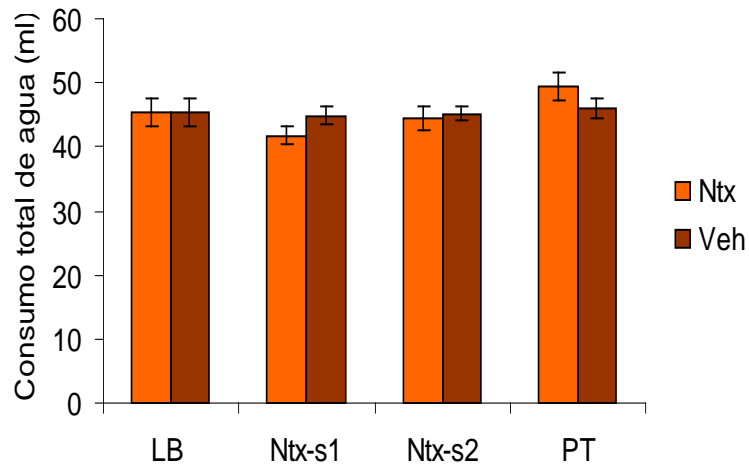


Fig. 1.3 Consumo total de agua en 24hs ($M \pm ES$), para el grupo Ntx y Veh durante los diferentes periodos.

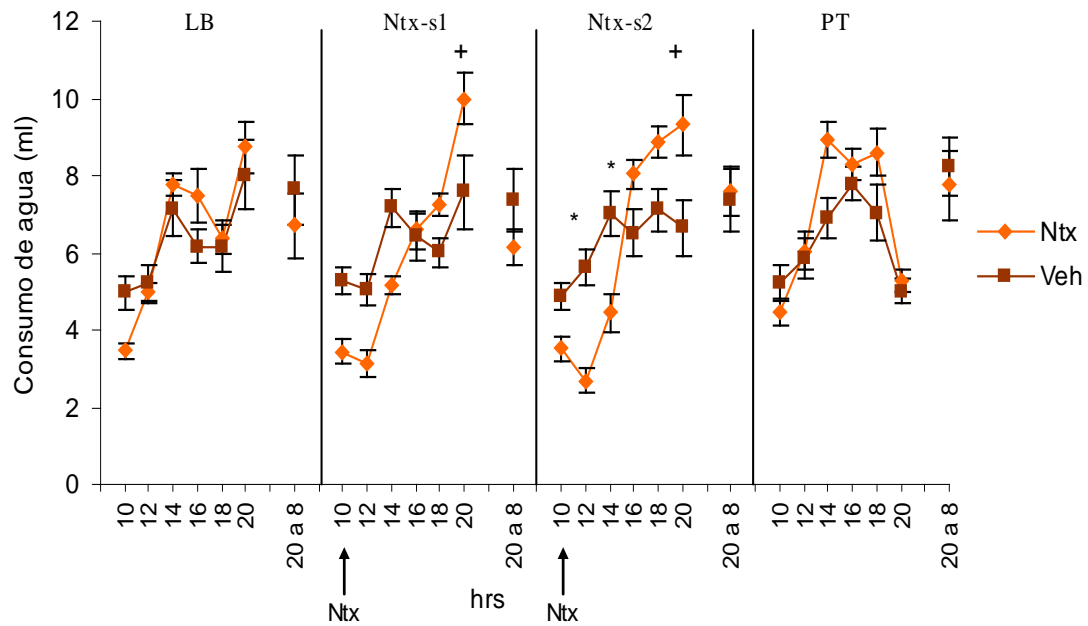


Fig 1.4. Consumo de agua en ml ($M \pm ES$) para el grupo Ntx y Ctrl. medido cada 2hs durante 12hs * Ntx < Veh + Ntx > Veh

GANANCIA DE PESO CORPORAL

Con respecto al peso corporal se calculó la ganancia por semana de cada sujeto por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{P_f - P_i}{D}$$

donde P_f es el peso final del sujeto, P_i el peso inicial para cada periodo y D el número de días que trascurrieron entre P_i y P_f .

En el análisis de grupo (Ntx-Ctrl) X periodo (LB, Ntx-s1, Ntx-s2, PT) no mostró diferencias significativas entre grupos. En el factor B, periodo ($F(3,54)=5.17$, $p= 0.0032$), se observa que PT es significativamente mayor a Ntx-s1. En la interacción del mismo análisis ($F(3,54)=10.28$, $p=0.0000$) (Fig. 1.5) encontramos que el periodo de PT para el grupo Ntx es significativamente mayor que el respectivo periodo de Veh

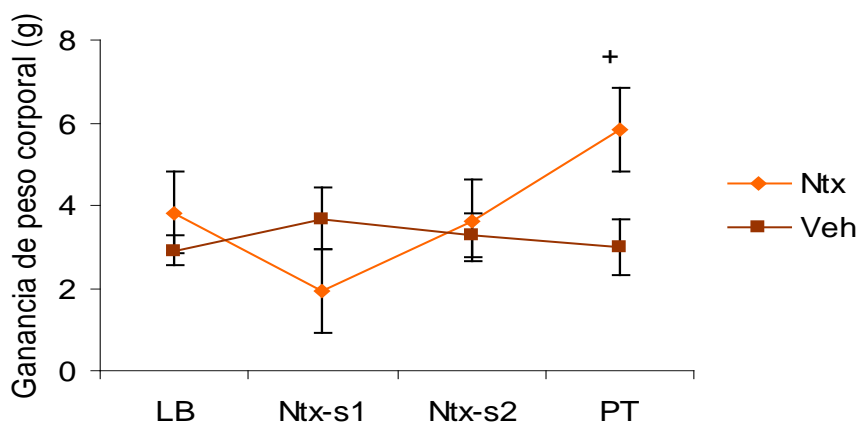


Fig. 1.5. Media \pm ES de la ganancia del peso corporal en los cuatro periodos (LB, Ntx-s1, Ntx-s2, PT) para Ntx y Veh. + Ntx > Veh.

PORCENTAJE DE GRASA

Este valor se obtiene determinando el porcentaje a partir del promedio del peso corporal.

$$\frac{Pg * 100}{PC_f}$$

En donde Pg= peso de la grasa corporal; PC_f= Promedio del peso corporal (3 días)

A pesar de que se observó un aumento de la grasa corporal para el grupo Ntx, las diferencias entre grupos no resultaron significativas (Fig. 1.6)

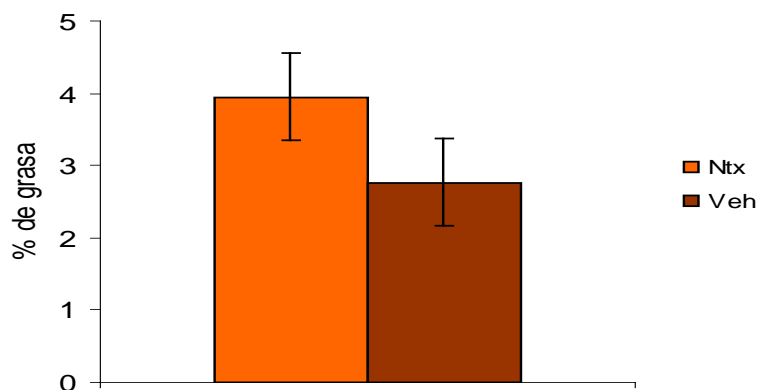


Fig 1.6.- Media \pm ES del porcentaje de grasa para Ntx y Veh

DISCUSIÓN

Sabemos que los opioides producen un incremento en el consumo de alimento y los antagonistas decremantan el consumo influyendo en las propiedades reforzantes de este. En el Experimento 1 “Administración de Ntx (10mg/kg) con acceso a alimento y agua en condiciones de no privación”, el consumo de alimento mostró una tendencia a decremantar a las 2hrs de haberse administrado la Ntx y a partir de las 16hrs el consumo empieza a aumentar hasta las 20hrs donde es significativamente mayor con respecto a los valores del grupo vehículo. Durante las dos semanas de tratamiento, las diferencias no fueron significativas en el consumo registrado durante el período de luz, de las 20:00 a las 08:00 hrs. En el consumo total diario no hay diferencias significativas entre los grupos, aunque se observa una tendencia del grupo Ntx a ser mayor que el grupo Veh en Ntx-s1 y Ntx-s2. Habíamos planteado la hipótesis que dado que la Ntx tiene una vida media de 2.7 ± 1.0 hrs (González y Brogden, 1988) el decremento en el consumo de alimento se produciría inmediatamente después de la inyección de Ntx, lo cual sólo ocurrió como una tendencia; en cambio, al final del período de oscuridad (20hrs), el consumo fue significativamente mayor en el grupo Ntx. Este resultado sugiere que en condiciones de no privación de alimento, los sujetos no se vuelven inapetentes con la naltrexona, más bien, al parecer se incrementa el valor reforzante del alimento cuando la acción de la Ntx ha decremantado. Al suspender las inyecciones (PT) se observó que el patrón de consumo cambia y es muy semejante en ambos grupos en las horas de oscuridad; sin embargo, en el período de luz, de las 20:00 a las 8:00hrs, se observa un incremento del consumo de alimento significativamente mayor para el grupo Ntx. Esto pudiera deberse a una sobre regulación de receptores; Parkes y Sinclair (2000) al administrar 2mg/kg/ de naltrexona por 8 días a ratas AA (línea desarrollada selectivamente para un consumo alto de alcohol) y posteriormente analizando histológicamente los cerebros, reportaron un incremento de receptores a opioides producto de la sobre-regulación de los mismos. Por su parte, Juárez y Barrios De Tomasi, (2007) encontraron un incremento en el consumo del alcohol inmediatamente después de que este fármaco es suspendido, lo cual es interpretado como una respuesta a la sobre-regulación causada por el antagonista opioide. De esta manera los presentes resultados sugieren que al estar sobre-regulados los receptores a opioides después de dos semanas de tratamiento con Ntx, se produce un mayor efecto gratificante del alimento y como consecuencia un mayor consumo en ausencia del bloqueo de receptores. Para lo que no

tenemos explicación es porqué este incremento en el consumo de alimento sólo se hace significativo en el período de luz y se mantiene igual en el de oscuridad. A pesar de que el consumo de alimento total del promedio diario no es significativamente diferente entre los grupos, las diferencias durante el tratamiento con naltrexona y posteriores a él se presentaron a favor de un mayor consumo en el grupo tratado con el antagonista opioide, diferencias que al parecer fueron suficientes para producir un peso significativamente mayor en estos sujetos al final del estudio, es decir, en el período de pos-tratamiento. Aún más, aunque las diferencias en el porcentaje de grasa no fueron significativamente diferentes, éste mostró un promedio superior al 25% en el grupo naltrexona comparado con el grupo vehículo. Si las causas de este efecto son de índole metabólico o bien ocasionadas por una afectación en los niveles de actividad que faciliten la acumulación de grasa, están por determinarse. Se ha descrito que la Ntx produce un decremento en el peso corporal en sujetos obesos (Marin-Bivens y Olster, 1999; Jarosz y Metzger, 2002); en el caso de sujetos no obesos como los utilizados en el presente estudio, este hallazgo no es apoyado.

En relación al consumo de alimento en el factor B (horas independientemente del grupo) se observó que durante la LB, Ntx-s1 y Ntx-s2, el consumo a las 20hrs muestra un incremento significativo que es más evidente durante las dos semanas de tratamiento; el período de PT este efecto no sólo desaparece sino que se invierte, es decir, a las 20:00 hrs el consumo es menor que en las horas previas del período de oscuridad. Este cambio en el patrón está asociado obviamente a la interrupción del tratamiento, pero no tenemos una explicación fisiológica para él.

Con respecto al consumo de agua, la Ntx produjo un decremento en las siguientes 4 horas posteriores a su administración, lo cual fue significativo en la segunda semana de tratamiento. Esta reducción en el consumo de agua muestra una clara recuperación a las 10 horas posteriores a la inyección de Ntx, es decir, al final del período de oscuridad. Nuevamente este efecto es más evidente en la segunda semana de tratamiento. La hipótesis planteada para el consumo de alimento en el sentido de un decremento inicial y una recuperación posterior en el curso de las horas posteriores a la administración de Ntx, parece cumplirse más para la ingestión de líquidos que para la de alimento, lo cual podría sugerir una mayor participación del sistema opioide en los mecanismos de regulación de ingestión de líquidos que de alimento. Se tienen antecedentes de que la naltrexona puede reducir el consumo de agua mientras este

antagonista es administrado y que el sistema opioide esta involucrado en funciones de regulación en la ingestión de líquidos, aparentemente a través de la atenuación de las propiedades reforzantes de la misma (Gardell, Hubbell y Reid, 1996; Gonzalez, y Weiss, 1998; Goodwin, Campisi, Babinska y Amit, 2001); sin embargo, en algunos casos el factor de palatabilidad está involucrado y la interpretación de los datos se vuelve más compleja.

EXPERIMENTO 2

Administración de Ntx (10mg/kg) con acceso a alimento, agua y alcohol en condiciones de no privación

OBJETIVO PARTICULAR

- Estudiar el efecto de una sola dosis de Ntx sobre la distribución del consumo de alimento durante 24hrs en presencia de etanol, sin ningún tipo de privación alimentaria o de líquidos.

HIPÓTESIS PARTICULAR

Cuando se administre la Ntx con acceso continuo (24hrs) al alimento en presencia del alcohol se encontrará un decremento significativo en el consumo de alimento y alcohol en las horas inmediatas a la inyección el cual se recuperará a lo largo de 24hrs y el consumo global diario del consumo de alimento será significativamente mayor a su grupo control. El consumo total de alcohol en 24 horas no será significativo con respecto a su grupo control.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento 2 (Fig 2), estuvo formado por 2 grupos (Ntx-Alc, Veh-Alc). Ambos grupos, tuvieron libre acceso a alimento y alcohol por 24hrs. Pasaron por una semana de línea base (LB), dos semanas de tratamiento (T) en las cuales se les inyectó 10mg/kg de Ntx al grupo Ntx y 0.2ml/kg de suero fisiológico al grupo Veh y finalmente se analizó una semana de postratamiento (PT).

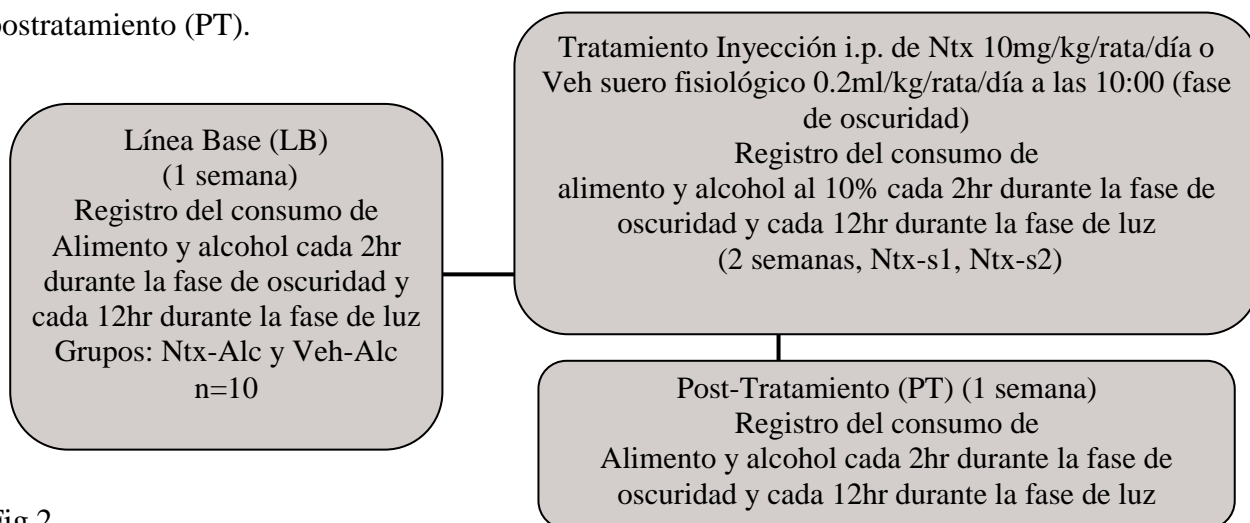


Fig 2

RESULTADOS

CONSUMO ALIMENTO

En el análisis de consumo total de alimento, grupo (Ntx-Alc-Veh-Alc) X periodo (LB, Ntx-s1 Ntx-s2. PT) no mostró diferencias en el factor grupos ni en la interacción (Fig 2.1), sin embargo sí se observan diferencias en el factor periodo ($F(3,48)=31.04$, $p=0.0000$) donde LB fue significativamente mayor a Ntx-s1 y Ntx-s2 y PT; Ntx-s1 mayor a Ntx-s2 y PT independientemente de los grupos.

En el análisis de grupos (Ntx-Alc, Veh-Alc) X hrs, (10, 12, 14, 16, 18, 20) en la LB el consumo de alimento, mostró que no hay diferencia significativa entre grupos, sin embargo para el factor hrs si se encontraron diferencias ($F(5,80)=22.72$, $p=0.0000$), indicando que a las 16hrs el consumo es significativamente mayor a 10, 12, 14, 18 y 20; 14 y 20hrs son significativamente mayores a 10, 12 y 18hrs. El ANOVA mostró la interacción (Fig. 2.2) no significativa.

El análisis de grupo (Ntx-Alc, Veh-Alc) X hrs (10, 12, 14, 16, 18, 20) para el consumo de alimento en la semana 1 (Ntx-s1), indicó ausencia de diferencias para el factor A, grupo. El factor B, hrs ($F(5,80)=8.04$, $p \leq 0.0000$), indicó que a las 16hrs se observa un incremento significativo comparado con las 10, 12 y 18; 14 y 20hrs son mayores a 12hrs. Para la interacción no se observaron (Fig. 2.2) diferencias significativas.

Durante la semana 2 de tratamiento (Ntx-s2) el análisis no mostró diferencias significativas en el factor grupos. En el factor hrs ($F(5,80)=4.31$, $p= 0.0016$), se encontró que las 14 y 16hrs son significativamente mayores a las 12 hrs. Con respecto a la interacción ($F(5,80)=6.27$, $p=0.0001$), se observaron diferencias significativas, las 18hrs del grupo Ntx-Alc es mayor a las 18hrs del grupo Veh-Alc (Fig. 2.2).

En el periodo de PT no se encontraron diferencias significativas en el factor grupo. Más sin embargo en el factor hrs ($F(5,80)=11.08$, $p= 0.0000$), se observó diferencias significativas en relación a que las 10 y 16hrs son significativamente mayores a las 20hrs; las 14hrs mayores a las 10,16, 18 y 20hrs; y finalmente las 12hrs mayor a las 18 y 20hrs.

El ANOVA mostró la interacción sin diferencias significativas (Fig. 2.2).

No se encontraron diferencias significativas en el análisis de un factor para el periodo de luz de las 20:00 a las 8:00hrs en ninguno de los periodos de consumo de alimento para el Exp 2.

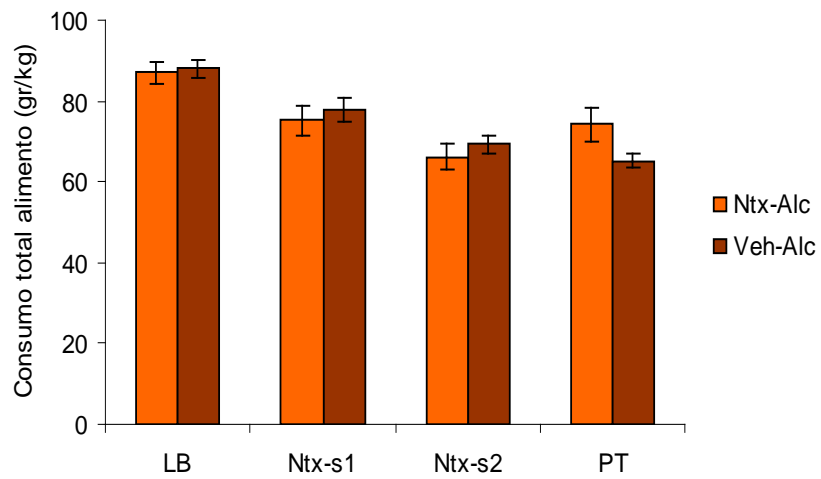


Fig. 2.1 Consumo total de alimento en 24hs ($M \pm ES$) para el grupo Ntx-Alc y Veh-Alc durante los diferentes periodos.

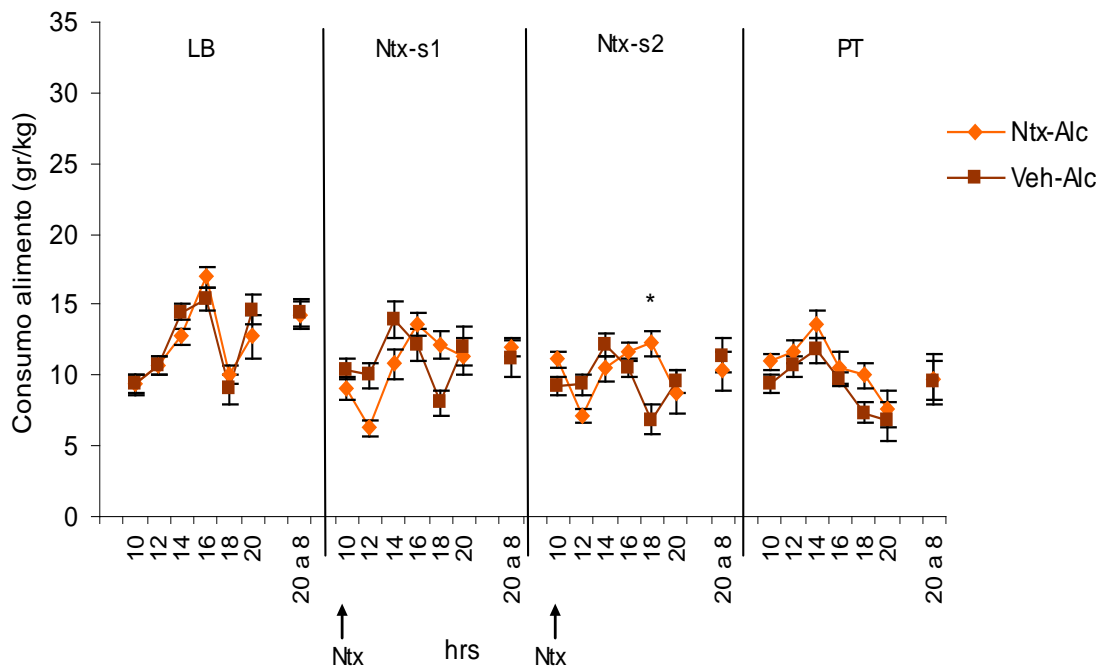


Fig 2.2. Consumo de alimento en gr ($M \pm ES$) para el grupo Ntx-Alc y Veh-Alc medido cada 2hs durante 12hs.
+ Ntx-Alc > Veh-Alc

CONSUMO DE ALCOHOL

En el ANOVA de consumo total de alcohol en gr/kg de peso, no se encontraron diferencias significativas ni en el factor grupos ni en la interacción (Fig 2.3), el factor periodos se encontró que PT es significativamente mayor a LB y a Ntx-s2; Ntx-s1 mayor a LB.

En el análisis de dos factores: grupos (Ntx-Alc, Veh-Alc) X hrs, (10, 12, 14, 16, 18, 20) en la LB el patrón de consumo de alcohol, se observó que no hay diferencia significativa entre grupos, sin embargo para el factor hrs si se encontraron diferencias ($F(5,80)=4.90$, $p=0.0006$), indicando que las 16 y las 20hrs son significativamente mayor a 10 y 12hrs; las 14 y 18hrs son significativamente mayores a las 10hrs. El ANOVA mostró la interacción no significativa (Fig. 2.4).

El análisis de grupo (Ntx-Alc, Veh-Alc) X hrs (10, 12, 14, 16, 18, 20) para el consumo de alcohol en la semana 1 de tratamiento (Ntx-s1), indicó ausencia de diferencias para el factor A, grupo. El factor B, hrs ($F(5,80)=19.91$, $p \leq 0.0001$), mostró que las 16 y 20hrs son significativamente mayores a las 10, 12, 14 y 18; 14 y 18hrs mayor a 10 y 12hrs. Para la interacción no se encuentran diferencias significativas (Fig. 2.4).

Durante la semana 2 de tratamiento (Ntx-s2) no se observaron diferencias significativas en el factor grupos. El factor hrs ($F(5,80)=12.90$, $p= 0.0000$), mostró que a las 20hrs el consumo de alcohol es significativamente mayor que a las 10, 12, 14 y 18 hrs; las 16hrs mayor a 10, 12 y 14; las 18hrs a las 10 y 12 y las 14hrs a las 10hrs. Con respecto a la interacción ($F(5,80)=4.03$, $p= 0.0026$), se observaron diferencias significativas en: 18hrs del grupo Ntx-Alc mayor a las respectivas hrs del grupo Veh-Alc (Fig 2.4).

En el periodo de PT, no se observaron diferencias significativas en el factor A. En el factor hrs ($F(5,80)=35.88$, $p= 0.0000$), se encontró diferencias significativas en relación a que las 16 y 20hrs el consumo de alcohol fue significativamente mayor a las 10, 12, 14 y 18; las 14 y 18hrs mayores a 10 y 12, y las 12 a las 10hrs. El ANOVA mostró la interacción sin diferencias significativas (Fig. 2.4).

No se observaron diferencias significativas entre grupos en el consumo de las 20:00 a las 8:00hrs en ninguno de los periodos.

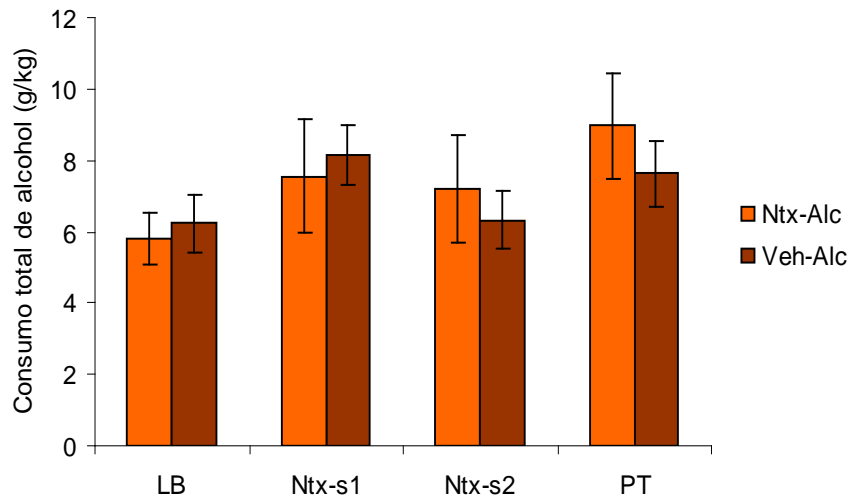


Fig 2.3. Consumo total de alcohol en 24hs ($M \pm ES$), para el grupo Ntx-Alc y Veh-Alc durante los diferentes periodos.

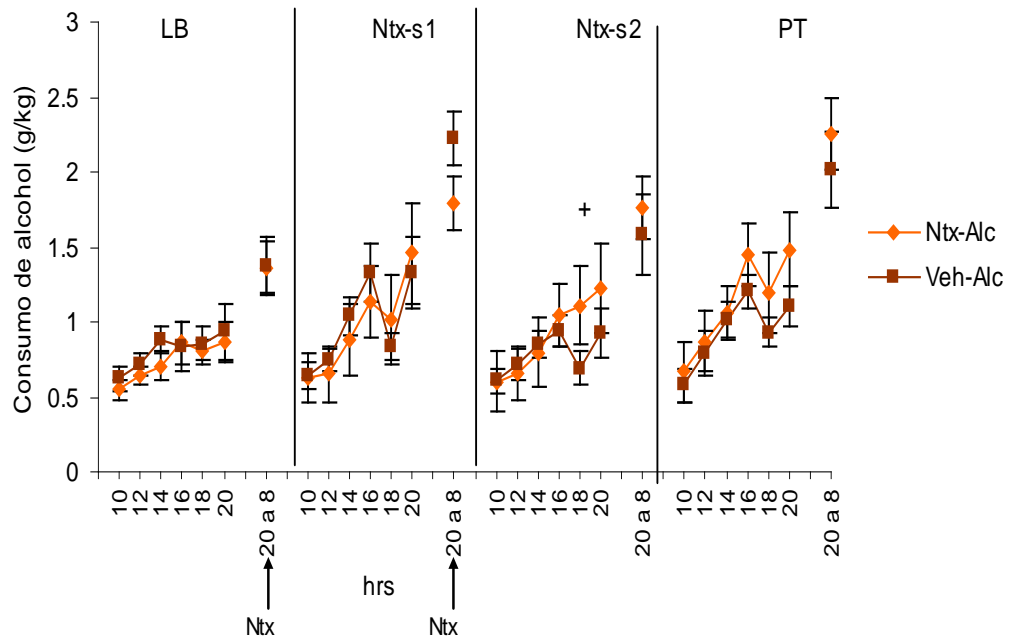


Fig 2.4. Consumo de alcohol en ml ($M \pm ES$) para el grupo Ntx-Alc y Veh-Alc medido cada 2hs durante 12hrs.

+ Ntx-Alc > Veh-Alc

CONSUMO DE AGUA

En el ANOVA de consumo total de agua (ml), grupo (Ntx-Alc, Veh-Alc) X periodo (LB; Ntx-s1, Ntx-s2, PT) encontramos únicamente el factor B significativo ($F(3,48)=7.42$, $p=0.0004$), en donde la LB es significativamente mayor a Ntx-s1 y Ntx-s2 (Fig 2.5) independientemente del grupo.

Para obtener el patrón de consumo de agua, el análisis de grupos (Ntx-Alc, Veh-Alc) X hrs (10, 12, 14, 16, 18, 20) en la línea base (LB), mostró que no hay diferencia significativa entre grupos, ni en la interacción (Fig. 2.6), sin embargo para el factor hrs si se encontraron diferencias ($F(5,80)=31.15$, $p= 0.0000$), indicando que las 20 hrs son significativamente mayores a 10, 12, y 14; 16 a 10, 12, 14, 18 y 20hrs; 14 y 18hrs son mayores a 10 y 12; y a su vez 12hrs es mayor a 10hrs.

Para el caso Ntx-s1 el análisis de grupo X hrs, no mostró diferencia significativa en el factor grupos, aunque hay una pequeña tendencia del grupo Ntx-Alc a ser menor que el grupo Veh-Alc. En el factor B, hrs, ($F(5,80)=24.70$, $p= 0.0000$), también se encontraron diferencias significativas con respecto a que las 20hrs fueron significativamente mayores a las 10, 12 y 18hrs; las 16hrs a las 10,12,14,18 y 20; y las 14 y 18hrs a las 10 y 12hrs. El análisis mostró diferencias significativas en la interacción ($F(5,80)=2.65$, $p= 0.0289$), en donde se observa que las 14 hrs del grupo Veh-Alc son significativamente mayor a las respectivas horas del grupo Ntx-Alc (Fig. 2.6).

Para la segunda semana de tratamiento (Ntx-s2), para el análisis de grupo X hrs, se observó en el factor A, grupos, que no fue significativo. En el caso del factor B, hrs, se observó diferencia significativa ($F(5,80)=11.02$, $p= 0.0000$), en donde las 18 y 20hrs son significativamente mayores a las 12hrs; a su vez 14hrs es mayor a las 10 y 12hrs; y 16hrs a 10, 12, 14, 18 y 20hrs. En la interacción, se encontraron diferencias significativas ($F(5,80)=6.61$, $p= 0.0000$), en donde las 12 y 14hrs del grupo Ntx-Alc son significativamente menor a las respectivas hrs del grupo Veh-Alc; (Fig. 2.6).

Durante el post tratamiento (PT) se encontró en el análisis de grupos X hrs, que no hay diferencias significativas para el factor A, grupos. Sin embargo para el factor B, hrs ($F(5,80)=13.00$, $p= 0.0000$), se encontró que las 14 y 16hrs son significativamente mayores a las 10, 12, 18 y 20hrs; y las 12hrs a las 10, 18 y 20. Para la interacción, no se observaron diferencias significativas (Fig. 2.6).

En la fase de luz, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los periodos de las 20:00 a las 8:00hrs, entre grupo

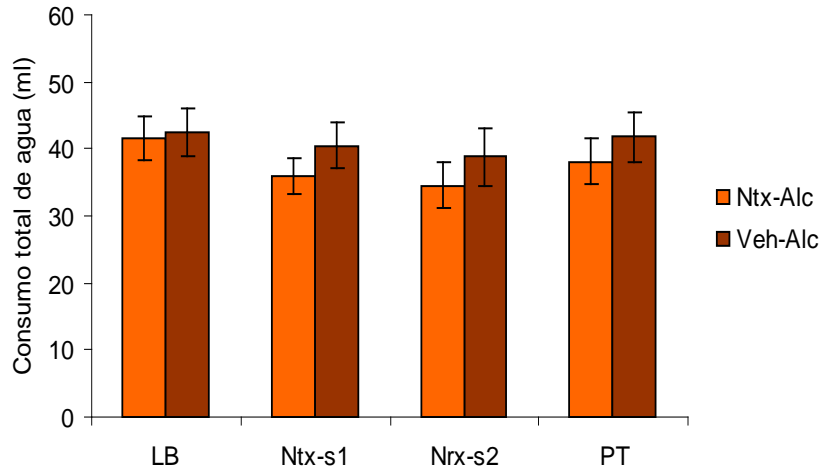


Fig 2.5. Consumo total de agua en 24hs ($M \pm ES$), para el grupo Ntx-Alc y Veh-Alc durante los diferentes periodos.

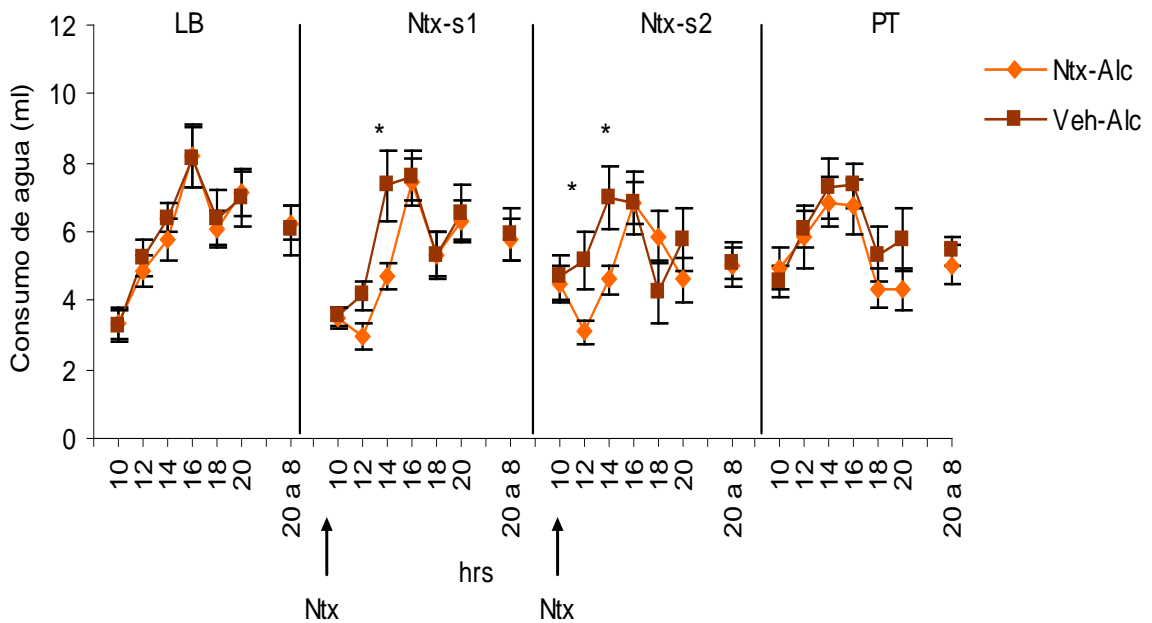


Fig 2.6. Consumo de agua en ml ($M \pm ES$) para el grupo Ntx-Alc y Veh-Alc medido cada 2hs durante 12h. * Ntx-Alc < Veh-Alc

GANANCIA DE PESO CORPORAL

El ANOVA de los dos factores, grupo (Ntx-Alc, Veh-Alc) X periodo (LB, Ntx-s1, Ntx-s2, PT) no mostró diferencias significativas en el factor grupos. El factor periodos sí fue significativo ($F(3,48)=11.15$, $p=0.0000$). La LB fue significativamente mayor a Ntx-s1, Ntx-s2 y PT.

También se encontró la interacción significativa ($F(3,48)=7.15$, $p=0.0005$) en donde Ntx-s1 del grupo Veh-Alc fue significativamente mayor a Ntx-s1 del grupo Ntx-Alc (Fig. 2.7)

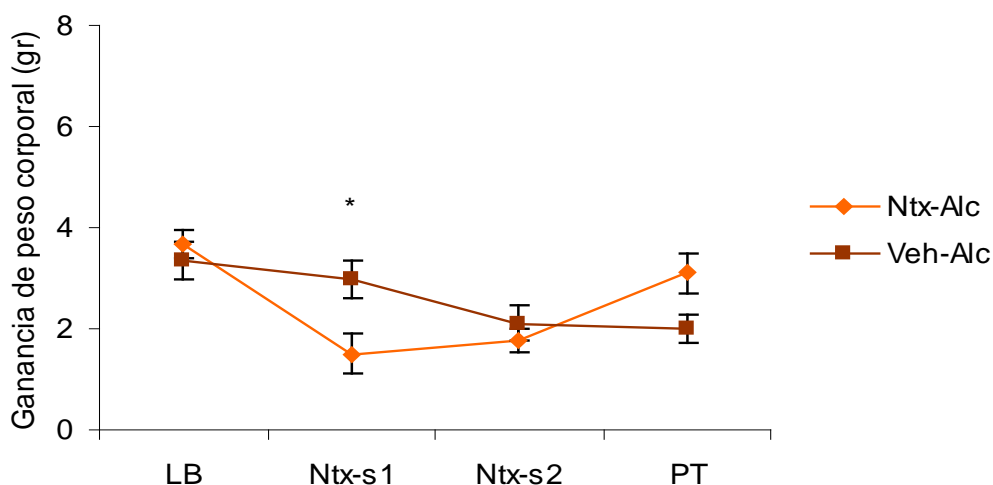


Fig. 2.7. Ganancia de peso corporal ($M \pm ES$) en los cuatro periodos

* Veh-Alc > Ntx-Alc

PORCENTAJE DE GRASA

Para el análisis de un factor respecto al porcentaje grasa corporal, no se encontraron diferencias significativas entre grupos (Fig 2.8)

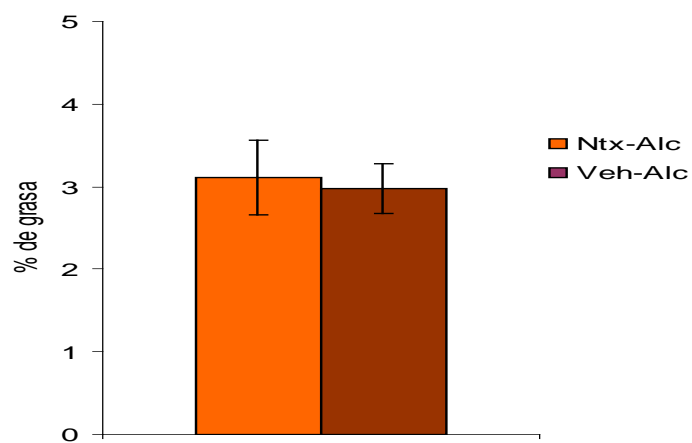


Fig 2.8.- Media \pm ES del porcentaje de carne magra para Ntx-Alc y Veh-Alc

DISCUSIÓN

En el Experimento 2 “Administración de Ntx (10mg/kg) con acceso a alimento, agua y alcohol en condiciones de no privación”, a las 2hrs inmediatamente después de administrarse la Ntx se observó un decremento aunque no significativo del consumo de alimento para el grupo Ntx-Alc el cual se recupera en las subsecuentes horas a la inyección, llegando a ser significativamente mayor a las 18hrs en la segunda semana de tratamiento con respecto al grupo Veh-Alc, en este sentido la hipótesis si se cumplió debido a que como ya sabemos la Ntx produce un decremento en el consumo de alimento (Spiegel, Stunkard, Shrager, O’Brien, Morrison y Stellar, 1987) y tiene una vida media de 2.7 ± 1.0 hrs (González y Brogden, 1988) por lo que esperábamos que el decremento en el consumo de alimento se produjera inmediatamente después de la inyección de Ntx. En PT se observó una tendencia del grupo Ntx-Alc a ser mayor tanto en el consumo total como en el patrón de consumo con respecto al grupo vehículo, este efecto pudiera deberse al aumento de receptores a opioides incrementando el consumo de alimento cuando el tratamiento es suspendido, produciendo que el alimento sea más reforzante. A pesar de que en el consumo de alimento sólo se observa una tendencia a decrementarse con el tratamiento de Ntx, parece ser suficiente para reflejarse en un decremento en el peso corporal, al menos en la primera semana de tratamiento. Cuando el antagonista opioide es suspendido la ganancia de peso corporal muestra una tendencia a incrementarse en el mismo sentido del consumo de alimento en el PT, no obstante, esta diferencia no se ve reflejada en una diferente distribución del porcentaje de grasa corporal.

En relación al consumo de agua podemos observar que en LB, existe una tendencia a incrementarse en las primeras 8 hrs de consumo y posteriormente se decrementa ligeramente. Este patrón de consumo se mantiene durante la primera semana de tratamiento; sin embargo, en el grupo tratado con Ntx el consumo de agua es significativamente menor a las 4 hrs posteriores a la administración del antagonista opioide, aunque ya existe una tendencia a decrementarse a las 2hrs inmediatas a la administración del antagonista. Este efecto es más evidente en la segunda semana de tratamiento donde se observa que el grupo Ntx-Alc decrementa el consumo de agua a las 2 y a las 4 hrs (12 y 14hrs) de la administración del tratamiento. Como en el Experimento 1, la hipótesis planteada para el consumo de alimento en el sentido de un decremento inicial y una recuperación posterior en el curso de las horas posteriores a la administración de Ntx, parece cumplirse más para la ingestión de líquidos que

para la de alimento, lo cual podría sugerir una mayor participación del sistema opioide en los mecanismos de regulación de ingestión de líquidos que de alimento. No obstante, en este experimento hay una recuperación, pero no un consumo superior que compense el decremento inicial, lo cual podría deberse a la disponibilidad en el consumo de la solución de alcohol, que aunque en poca cantidad, tiene un aporte adicional de líquidos. En PT no encontramos ninguna diferencia entre grupos en el consumo total de agua en los cuatro periodos, lo cual indica que la Ntx puede afectar el patrón de consumo de agua las horas subsecuentes a su administración debido al tiempo de vida media sin encontrarse efecto en el consumo total.

Con respecto al consumo total de agua, el factor B (períodos independientemente del grupo) mostró que LB es significativamente mayor a Ntx-s1 y Ntx-s2, lo cual con base en las diferencias significativas encontradas en la interacción parece deberse al decremento del consumo causado por el grupo tratado con Ntx en ambos periodos.

En el caso del alcohol observamos una tendencia de incremento a lo largo del día en la LB, patrón que se mantuvo de manera similar en las siguientes tres fases del experimento; no obstante, no se observó el decremento esperado posterior a la inyección con Ntx en las semanas uno y dos de tratamiento, lo cual sugiere que el efecto encontrado sobre el consumo de agua, no es un efecto indiscriminado sobre la ingestión de líquidos y posiblemente esté relacionado a las propiedades gustativas y al consumo preferido de un líquido sobre otro como ha sido descrito por Williams y Woods (1999). Esta ausencia de efecto sobre el alcohol difiere de los hallazgos encontrados en una gran cantidad de estudios, en los que la naltrexona sí decrementa el consumo de alcohol (Gardell, Hubbell y Reid, 1996; Gardell, Reid, Boedeker, Liakos y Hubbell, 1997a; Gardell, Whalen, Chattopadhyay, Cavallaro, Hubbell y Reid, 1997b; William y Woods, 1999; Hill y Kiefer 1997; Stromberg, Volpicelli y O'Brien, 1998; Stromberg, Sengpiel, Mackler, Volpicelli, O'Brien y Vogel 2002; Parkes y Sinclair 2000; Reid, Gardell, Chattopadhyay y Hubell, 1996; Goodwin, Campisi, Babinska y Amit, 2001; Coonfield Hill, Kaczmarek, Ferraro y Kiefer 2004) y de alimento (Hollister, Johnson, Boukhabza y Gillespie, 1981; Bertino, Beauchamp y Engelmanet, 1991; Spiegel, Stunkard, Shrager, O'Brien, Morrison y Stellar, 1987; Yeomans y Gray, 1997; Yeomans y Gray, 2002; Lang, Strahlendorf, Strahlendorf, Lutherer y Barnes, 1982; Tannenbaum y Pivorum, 1984; Marks-Kaufman, Balmagiya y Gross, 1984; Kirkham y Blundell, 1987; Hobbs, Koch y Bodnar, 1994; Kotz, Glass, Levine y Billington, 2000; MacDonald, Billington y Levine, 2003); no obstante en

estos casos se limitan a dar el alcohol unas cuantas horas después de la inyección con el antagonista opioide y en este experimento tenían acceso las 24hrs del día.

En el consumo total de alcohol se puede observar que no se encuentran diferencias significativas entre grupos aunque hay una tendencia del grupo Ntx-Alc a ser menor en la semana uno; en la semana dos de tratamiento y en PT se invierte el efecto y se observa una tendencia a incrementarse el consumo de dicho grupo con respecto al grupo Veh-Alc. En el patrón de consumo de alcohol no encontramos diferencias significativas hasta las 18 hrs de Ntx-s2 donde Ntx-Alc es significativamente mayor a Veh-Alc. En PT existe una tendencia del grupo Ntx-Alc a ser mayor que el grupo Veh-Alc sobre todo al final del día, pero sin ser significativamente diferente. Nuestros datos discrepan con la literatura ya que se sabe que la Ntx produce un decremento en el consumo de alcohol, y siendo esta una dosis alta, esperábamos que hubiera un decremento significativo entre grupos. Por lo que la hipótesis planteada en donde se menciona un decremento significativo en el consumo de alcohol en las horas subsecuentes a la inyección el cual se recupera a lo largo de las 24hrs no se cumplió. Sin embargo, la suposición de que el consumo total de 24 horas no sería significativo con respecto a su grupo control, si fue evidente.

Con respecto al consumo total de alcohol, el factor B (períodos independientemente del grupo) mostró que en el PT este fue significativamente mayor a la LB y Ntx-s2, esto pudiera deberse a que a pesar de que el incremento en el consumo de alcohol en el grupo Ntx-Alc no es significativo con respecto al grupo Veh-Alc, al parecer este cambio es suficiente para producir un efecto diferencial de este período con respecto a los ya mencionados.

Por otro lado, es posible que el decremento descrito en los niveles de opioides debido a la privación parcial de alimento minimice los efectos reforzantes del alimento y del alcohol debido posiblemente al mecanismo de sobre-regulación, en el periodo de PT.

La hipótesis planteada para el consumo de alimento en presencia del alcohol en el que se esperaba encontrar un decremento significativo en el consumo de alimento y de alcohol en las horas inmediatas a la inyección recuperándose a lo largo de las 24hrs es más evidente para la ingestión de agua que para el consumo de dichos incentivos lo cual podría sugerir que el sistema opioide tiene más efecto en los reforzadores primarios particularmente sobre el agua y ningún efecto en la ingestión de alcohol, ya que en el consumo agua se vio un decremento significativo por la administración de la Ntx que en el consumo de alcohol.

EXPERIMENTO 3

Administración de Ntx (10mg/kg) con acceso a alimento y agua en condiciones de privación parcial alimentaria (12hrs/día).

OBJETIVO PARTICULAR

- Estudiar el efecto de una dosis de Ntx en la distribución del consumo de alimento en ausencia de etanol bajo un esquema de privación parcial al alimento (12hrs/día).

HIPÓTESIS PARTICULAR

Cuando se administre la Ntx inmediatamente antes del acceso a 12 hrs de alimento y después de 12 hrs de privación del mismo, el consumo de alimento se decrementará con respecto a su grupo control en las horas subsecuentes a la inyección y posteriormente tenderá a recuperarse, de tal manera que el consumo global final diario no será significativo con respecto a su grupo control.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento 3, estuvo formado por 2 grupos (Ntx-P, Veh-P). Ambos grupos, tuvieron acceso a 12hrs de alimento. Pasaron por una semana de línea base (LB), dos semanas de tratamiento (T) en las cuales se les inyectó 10mg/kg de Ntx al grupo Ntx y 0.2 ml/kg de suero fisiológico al grupo Veh y finalmente se analizó una semana de postratamiento (PT) (Fig. 3).

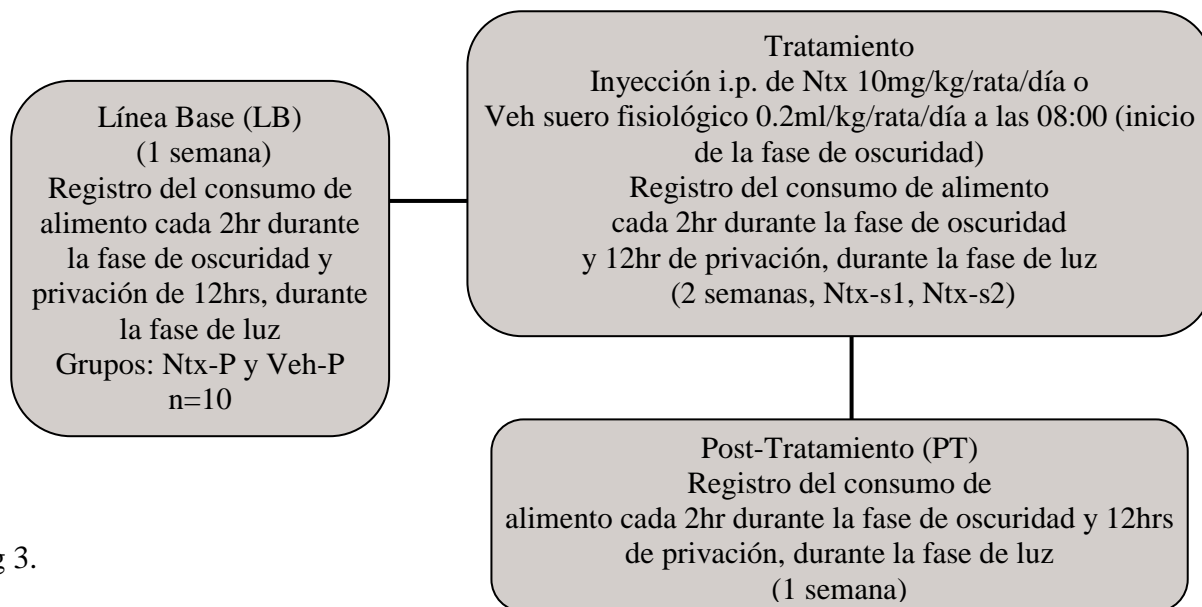


Fig 3.

RESULTADOS

CONSUMO DE ALIMENTO

El esquema de este experimento era que se les privaba por 12hrs de alimento por lo cual no se tienen los valores de las 20:00 a las 8:00hrs, correspondiente al periodo de luz.

En el análisis de consumo total de alimento grupo X periodo, no se encontraron diferencias significativas ni en el factor grupo, ni en la interacción (Fig 3.1) sin embargo, en el factor B, periodo, mostró diferencias ($F(3,54)=46.37$, $p=0.0000$) en el siguiente sentido, la LB es significativamente mayor a Ntx-s1, Ntx-s2 y PT; Ntx-s1 es mayor a Ntx-s2 y PT; y Ntx-s2 a PT.

Para obtener el patrón, el análisis de consumo de alimento, grupo (Ntx-P, Veh-P) X hrs (10,12, 14, 16, 18, 20) para la LB, mostró diferencias significativas en el factor hrs ($F(5,90)=109.55$, $p=0.0000$), en donde las 10hrs son significativamente mayores al resto de las hrs; las 18 y 20 significativamente menores a 12, 14 y 16; y las 16 hrs significativamente mayores a las 12, independientemente del grupo. No se encontraron diferencias ni en el factor grupos ni en la interacción (Fig 3.2) para el mismo análisis.

Para Ntx-s1 encontramos en el análisis grupo X hrs, el factor hrs, significativo ($F(5,90)=23.09$, $p=0.0000$), donde se observó que las 10hrs son significativamente mayores al

resto de las hrs del día; y las 12, 16 y 18hrs a las 20hrs. Para la interacción del mismo análisis (Fig 3.2) de consumo de alimento ($F(5,90)=4.71$, $p=0.0007$) se obtuvo que a las 10hrs hubo un decremento significativo en el consumo de alimento para el grupo Ntx-P con respecto a las mismas horas del grupo Veh-P .

En el caso de la segunda semana de tratamiento (Ntx-s2), se mostraron diferencias significativas en el factor grupos, y si se observaron diferencias significativas en el factor hrs ($F(5,90)=8.40$, $p=0.0000$), en donde las 10hrs son significativamente mayores a las 12 y 20hrs; las 14, 16 y 18hrs a las 12. Para la interacción (Fig 3.2) del análisis grupo X hrs, ($F(5,90)=9.02$, $p=0.0000$), se observa que las 10hrs del grupo Ntx-P son significativamente menor a las respectivas hrs del grupo Veh-P.

Con respecto al PT solo encontramos diferencias en el factor hrs ($F(5,90)=34.71$, $p=0.0000$), en donde las 10hrs son significativamente mayores al resto de las horas del día.

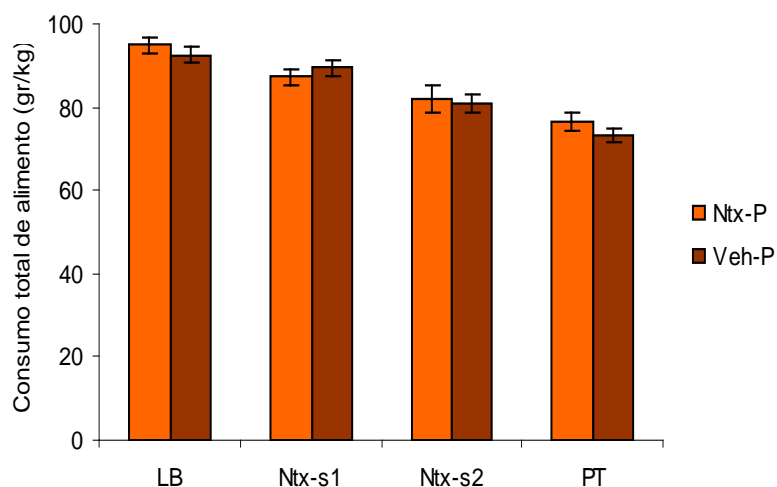


Fig. 3.1 Consumo total de alimento en 12hs ($M \pm ES$) para el grupo Ntx-P y Veh-P durante los diferentes periodos.

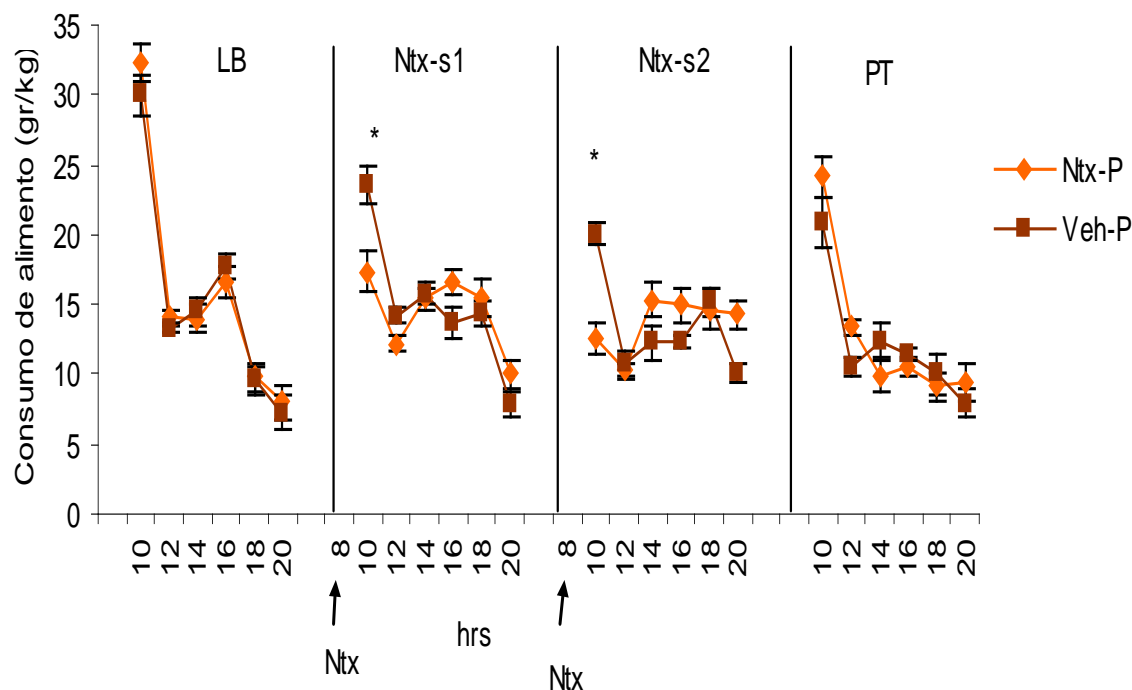


Fig 3.2. Consumo de alimento en gr ($M \pm ES$) para el grupo Ntx-P y Veh-P medido cada 2hs durante 12hs. * Ntx-P < Veh-P

CONSUMO DE AGUA

En el consumo total de agua, el ANDEVA grupo X periodo, observamos que hay diferencias significativas en el factor periodo ($F(3,54)=5.30$, $p=0.0028$) en donde LB es significativamente menor a Ntx-s2 y a PT. En la interacción (Fig 3.3) las diferencias ($F(3,54)=5.30$, $p=0.0296$) se encontraron en el siguiente sentido las 10hrs del grupo Veh-P son mayores a las respectivas horas del grupo Ntx-P.

En el análisis de grupos (Ntx-P, Veh-P) X hrs (10, 12, 14, 16, 18, 20) para el consumo de agua en la línea base (LB), mostró que no hay diferencia significativa entre grupos, ni en la interacción (Fig. 3.4), sin embargo, para el factor hrs se encontraron diferencias ($F(5,90)=125.5$, $p=0.0000$), indicando que las 10hrs es significativamente mayor al resto de las horas de oscuridad; las 12 a las 14, 16, 18 y 20hrs; las 14 y las 16hrs son mayores a las 18 y

20hrs. No se observaron diferencias significativas entre grupos en el consumo de las 20:00 a las 8:00hrs

Para el caso Ntx-s1 el análisis de grupo X hrs, no mostraron diferencia en el factor grupos, a pesar de que se observa un decremento en el consumo de agua para el grupo Ntx-P con respecto al grupo Veh-P, el resultado no es significativo. Las diferencias con respecto al factor B, hrs, ($F(5,90)=32.89$, $p= 0.0000$), fueron en este sentido: las 14hrs es significativamente mayor a las 10, 12, 16 y 20hrs; las 12, 16 y 18hrs a 10 y 20; y las 10 a las 20hrs. El análisis mostró diferencias significativas en la interacción ($F(5,90)=14.26$, $p= 0.0000$), en donde se observó que las 10 y 12 hrs del grupo Veh-P son significativamente mayores al grupo Ntx-P (Fig. 3.4). No se observaron diferencias significativas entre grupos en el consumo de las 20:00 a las 8:00hrs

En la semana 2 de tratamiento no se observaron diferencias significativas en el factor grupos. En el caso del factor B, hrs, mostró diferencias significativas ($F(5,90)=17.51$, $p= 0.0000$), en donde las 14, 16, 18 y 20hrs son significativamente mayores a las 10 y 12hrs; a su vez las 12hrs es mayor a las 10hrs. En la interacción, se encontraron diferencias significativas ($F(5,90)=12.28$, $p= 0.0000$), en donde las 10hrs del grupo Ntx-P es significativamente menor a las respectivas hrs del grupo Veh-P; las 20hrs de Ntx-P significativamente mayor a las mismas hrs del grupo Veh-P (Fig. 3.4). No se observaron diferencias significativas entre grupos en el consumo de las 20:00 a las 8:00hrs

Durante el post tratamiento (PT) se encontró en el análisis de grupos X hrs, que no hay diferencias significativas para el factor A, grupos. Sin embargo el factor B ($F(5,90)=11.62$, $p= 0.0000$), mostró que las 10hrs es significativamente mayor a las 12, 14, 16, 18 y 20hrs; las 12hrs a las 20. Para la interacción, no se observaron diferencias significativas (Fig. 3.4). Con respecto al análisis del periodo de luz de las 20:00 a las 8:00hrs encontramos diferencia significativa en donde el grupo Ntx-P es significativamente mayor al grupo Veh-P.

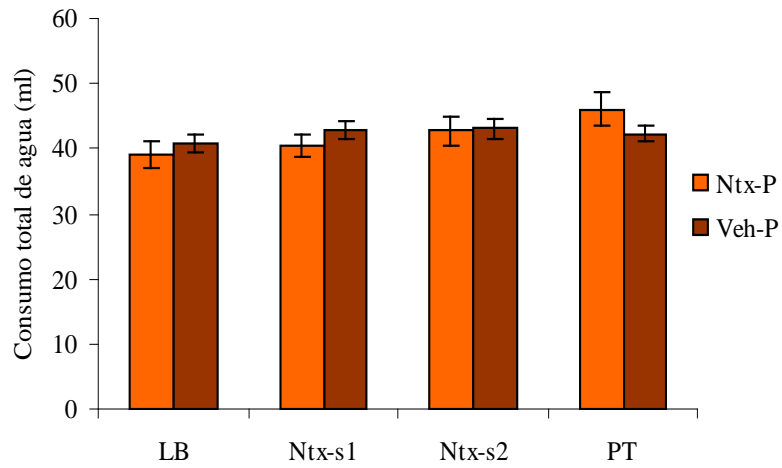


Fig 3.3. Consumo total de agua en 24hs ($M \pm ES$), para el grupo Ntx-R y Veh-R durante los diferentes periodos.

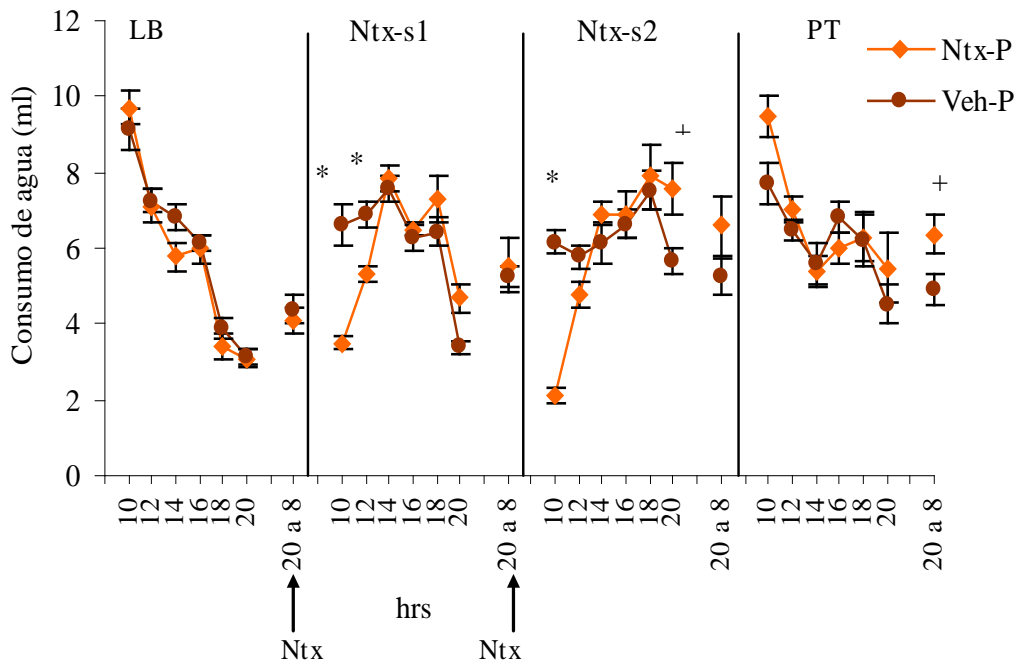


Fig 3.4. Consumo de agua en ml ($M \pm ES$) para el grupo Ntx y Veh medido cada 2hs durante 12h. * Veh-P > Ntx-P + Ntx-P > Veh-P

GANANCIA DE PESO CORPORAL

En el análisis de dos factores, grupo (Ntx-P, Veh-P) X periodo (LB, T1, T2, PT) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, ni en la interacción (Fig. 3.5). En el factor B ($F(3,54)=3.59$, $p=0.0193$), se observa que la LB es significativamente menor a Ntx-s1, Ntx-s2 y PT. Para la interacción no encontramos diferencias significativas.

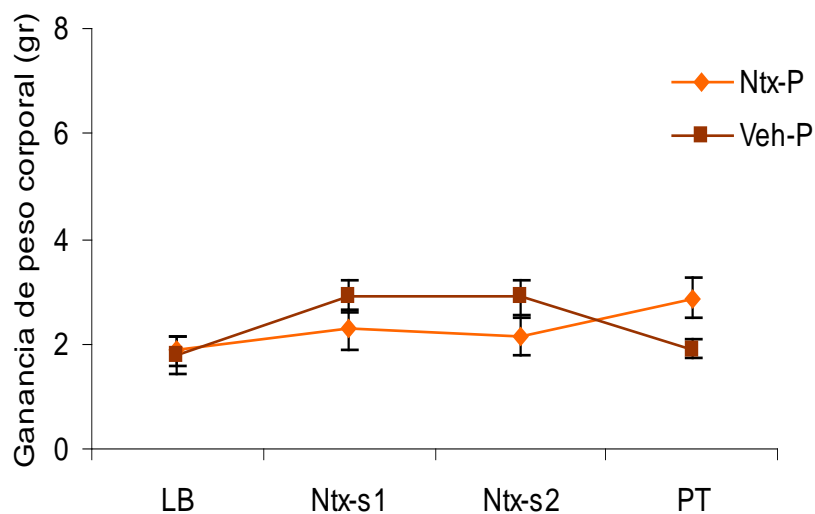


Fig. 3.5. Ganancia del peso corporal ($M \pm ES$) en los cuatro periodos

PORCENTAJE DE GRASA

En relación a la grasa, no se observan diferencias significativas entre grupos en el análisis de un factor (Fig 3.6).

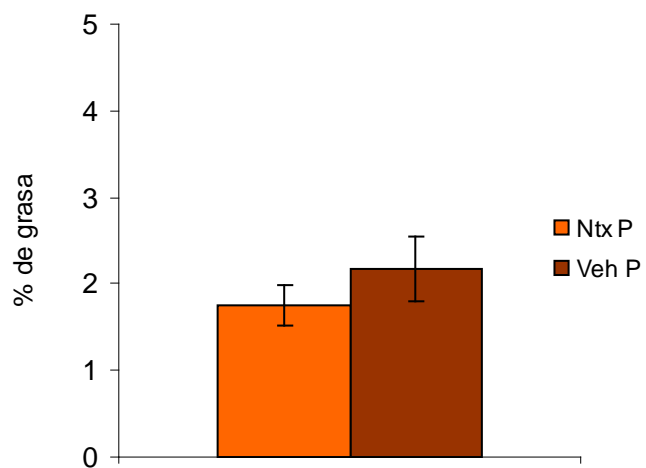


Fig 3.6. Media + ES del porcentaje de grasa para Ntx-P y Veh-P

DISCUSION

En el Experimento 3: “administración de Ntx (10mg/kg) con acceso a alimento y agua en condiciones de privación parcial alimentaria (12hrs/día)” mostró que en el consumo de alimento, las primeras 2hrs de acceso se produce un incremento el cual se va decrementando paulatinamente; este incremento inicial resulta obvio debido a que representa la primera medida de alimento después de 12 horas de privación. No obstante este incremento inicial de consumo de alimento, el grupo tratado con naltrexona consumió significativamente menos cantidad de alimento que el grupo control en las primeras dos horas, lo cual apoya la hipótesis de un decremento en el consumo de alimento en las horas inmediatas posteriores a la inyección con el antagonista opioide. En otras palabras, en condiciones de privación parcial, la acción inhibitoria del antagonista opioide sobre el consumo de alimento se hace más evidente que cuando el sujeto tiene el alimento a libre demanda. Posteriormente, al suspender el tratamiento, en PT, las diferencias desaparecen y se observa el mismo patrón que durante la LB.

En condiciones relacionadas con la pérdida de peso o con un balance negativo, como el ejercicio intenso, la restricción calórica y la lactancia, la vía del NPY se activa provocando un incremento del apetito, respuesta mediada por la reducción de la retroinhibición negativa de la leptina y la insulina (Flier y Maratos-Flier, 1998). En el presente experimento, durante las primeras horas de acceso encontramos la gran comilona, un incremento en el consumo de alimento inmediatamente después de que los sujetos pasan por un periodo de restricción alimentaria, lo cual puede estar asociado al incremento de NPY. Kotz, Grace, Briggs, Billington y Levin (1996) encontraron que la administración periférica de Ntx incrementa los niveles de la expresión genética de NPY en el ARC en ratas privadas y con alimento ad libitum, a diferencia de nuestro experimento, los sujetos de Kotz y cols estuvieron privados por 24 y 48hrs. En nuestro caso supusimos que cuando administráramos la Ntx con acceso a 12 hrs de alimento, después de 12 hrs de privación, el consumo de este se decrementaría con respecto a su grupo control lo cual sucedió así, lo que indica que la Ntx produce efectos anorexigénicos aún cuando el sujeto tiene hambre, posiblemente disminuyendo las propiedades reforzantes del alimento, decrementando su consumo. Posteriormente inferimos que el consumo tendería a incrementarse siendo al final no significativo con respecto a su grupo control, lo cual no sucedió, al menos en la primera semana de tratamiento, ya que los sujetos

consumían las primeras horas la mayor cantidad de alimento debido a la necesidad de comer y posteriormente se decrementaba.

La privación parcial parece afectar la cantidad total de alimento consumido independientemente del grupo, ya que los sujetos a lo largo del experimento disminuyeron la ingesta (Fig 3.1) casi en un 20% del consumo, en PT comparado con la LB. A pesar de que encontramos esa disminución de alimento, el peso corporal no se modifica drásticamente ni el porcentaje de grasa corporal; sin embargo, entre grupos, encontramos que la Ntx produce una pequeña pérdida de peso sin ser significativa con respecto al grupo control. No encontramos diferencias significativas en el peso corporal durante todo el experimento, esto puede deberse a que se sabe que cada individuo parece regular el consumo de alimento y así mantener el peso corporal alrededor de un punto de regulación óptimo aun cuando los sujetos están privados por lo que no se modifica el peso corporal ni el porcentaje de grasa. Por otro lado, Hadcock y Scott, (2005) encontraron que la administración crónica de la Ntx previene el aumento del peso corporal en ratas delgadas y produce pérdida de peso en las obesas, en nuestro caso, no utilizamos ratas obesas y el peso corporal no se modificó hacia la baja de manera importante, por lo tanto, en ratas en una condición de peso no extrema, la Ntx no parece producir un efecto importante, al menos en las condiciones del presente estudio.

Ya sabemos que los receptores a opioides son bloqueados por la Ntx en el cerebro entre las 72 y las 108hrs mientras que en plasma dura de 4 a 12hrs, que es el tiempo en que nosotros encontramos efecto en el consumo de alimento.

En el consumo de agua se observa que en la semana uno de tratamiento el patrón de consumo se decrementa las primeras 4hrs, efecto que persiste en la segunda semana las 2hrs inmediatas a la administración de la Ntx; sin embargo en este periodo encontramos al final del día que hay un incremento significativamente mayor a las 12hrs de haberse inyectado el antagonista para el grupo tratado con este fármaco. Se sabe que al mismo tiempo que las ratas son expuestas a la restricción de alimento, aún cuando el agua esta disponible en todo momento, dejan de beber mientras dura el periodo de restricción de alimento (Martínez, 2007). Esto lo podemos apoyar en este experimento ya que no observamos diferencias significativas de las 20:00 a las 8:00hrs en tres de los cuatro periodos e inmediatamente que tienen acceso al alimento incrementan el consumo de agua. Es posible que debido a la restricción de alimento, la sobre regulación de receptores opioides este afectando la ingesta de líquidos más que la de

alimento debido a que no se observa incremento en el consumo de alimento cuando se suspende el antagonista, sin embargo hay una tendencia a incrementarse el consumo de agua en PT para el grupo tratado con el fármaco.

En el consumo de agua el factor B (horas independientemente del grupo), las 10hrs son significativamente mayores al resto de las horas del día, durante los periodos de LB y PT; sin embargo, durante el período de tratamiento esta diferencia desaparece, lo cual parece deberse, en parte, a las inyecciones por si mismas y en parte al decremento significativo que se observó en el consumo de agua en el grupo tratado con Ntx.

EXPERIMENTO 4

Administración de Ntx (10mg/kg) con acceso a alimento, agua y alcohol en condiciones de privación parcial de alimento (12hrs/día).

OBJETIVO PARTICULAR

- Estudiar el efecto de una sola dosis de Ntx en la distribución del consumo de alimento en presencia de etanol bajo un esquema de privación parcial de alimento (12hrs/día).

HIPÓTESIS PARTICULAR

Cuando se administre la Ntx inmediatamente antes del acceso a 12 hrs de alimento y alcohol, después de 12 hrs de privación de ambos estímulos, el consumo de alimento se decrementará en las horas subsecuentes a la inyección y posteriormente tenderá a incrementarse de tal manera que el consumo final diario será semejante que el del grupo control. En el caso del alcohol, éste se decrementará en las horas subsecuentes a la inyección y su latencia de inicio de consumo será mayor que la del alimento, posteriormente tenderá a incrementarse encontrándose el consumo final global diario significativamente menor con respecto a su grupo control.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento 4, estuvo formado por 2 grupos (Ntx-AlcP, Veh-AlcP). Ambos grupos, tuvieron acceso a 12 hrs de alimento y alcohol. Pasaron por una semana de línea base (LB), dos semanas de tratamiento (T) en las cuales se les inyectaron 10mg/kg de Ntx al grupo Ntx y 0.2ml/kg de suero fisiológico al grupo Veh y finalmente una semana de postratamiento (PT) (Fig 4).

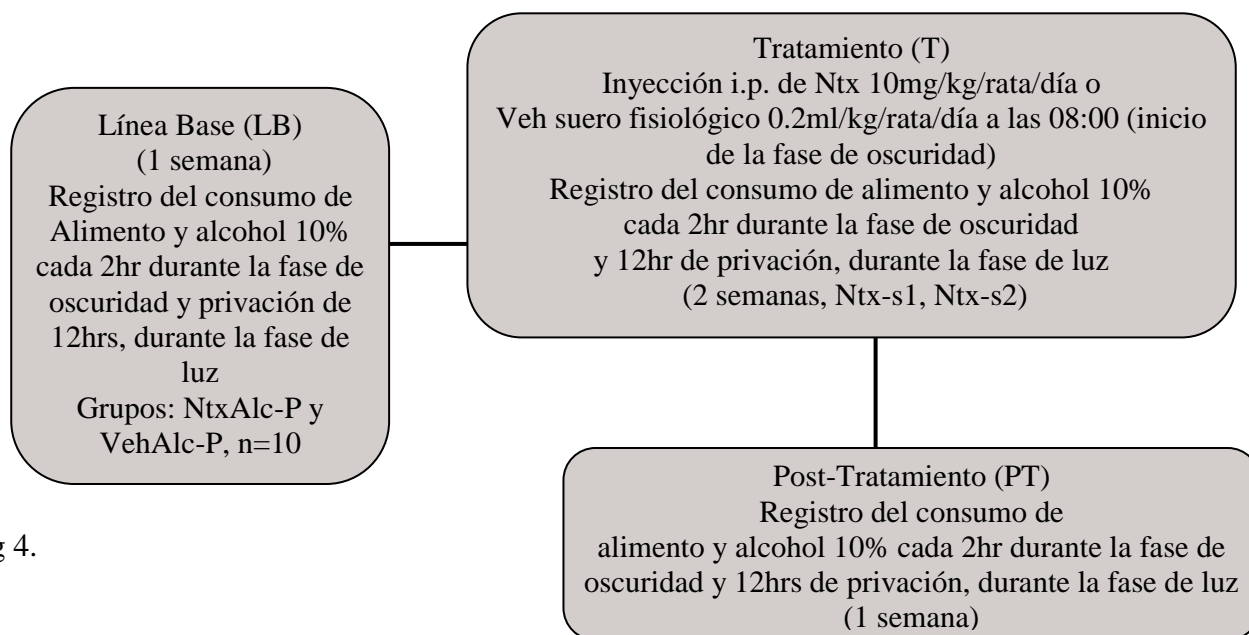


Fig 4.

CONSUMO DE ALIMENTO

En el análisis de consumo total de alimento (Fig 4.1), el ANDEVA grupo (Veh-AlcP, Ntx-AlcP) X periodo (LB, Ntx-s1, Ntx-s2, PT), el factor grupo y la interacción no fueron significativos sin embargo el factor periodo ($F(3,54)=54.62$, $p=0.0051$) podemos observar que LB es significativamente mayor a Ntx-s1, Ntx-s2 y PT; a su vez Ntx-s1 mayor a Ntx-s2 y PT.

Para obtener el patrón de consumo de alimento, el análisis de grupo (Veh-AlcP, Ntx-AlcP) X hrs (10, 12, 14, 16, 18, 20) para LB, el factor B hrs es en el que se observaron diferencias significativas ($F(5,90)=16.14$, $p=0.0000$) en donde las 10hrs es significativamente mayor al resto de las hrs del día, independientemente del grupo (Fig 4.2).

Durante la primera semana de tratamiento (Ntx-s1), se observa en el análisis de grupo X periodo que el factor hrs y la interacción fueron significativos. El factor hrs ($F(5,90)=20.09$, $p=0.0000$) indicó que las 10 hrs es significativamente mayor al resto de las hrs del día; y las 12, 16 y 18hrs significativamente mayores a las 20hrs independientemente del grupo. En la interacción ($F(5,90)=7.69$, $p=0.0000$) observamos que las 10hrs de Veh-AlcP fue significativamente mayor a las 10 hrs del grupo Ntx-AlcP (Fig 4.2).

En el análisis de grupo X hrs para Ntx-s2 encontramos que el factor grupos no fue significativo, el factor hrs ($F(5,90)=28.91$, $p=0.0000$) fue significativo en donde las 10hrs es

significativamente mayor a las 12, 14, 16 y 20hrs; las 18hrs a la 16; y las 20hrs es significativamente menor a las 12, 14, 16 y 18hrs. La interacción ($F(5,90)=12.75$, $p=0.0000$) mostró diferencias significativas en el sentido que las 10hrs para Veh-AlcP es significativamente mayor a las 10 hrs del grupo Ntx-AlcP (Fig 4.2).

En el análisis de consumo de alimento para PT encontramos que el factor grupos y la interacción no fueron significativos, por otro lado, el factor hrs ($F(5,90)=30.02$, $p=0.0000$) mostró diferencias significativas en donde las 10hrs es significativamente mayor al resto de las horas del día y las 12, 14, 16 y 18 a las 20hrs, independientemente del grupo (Fig 4.2).

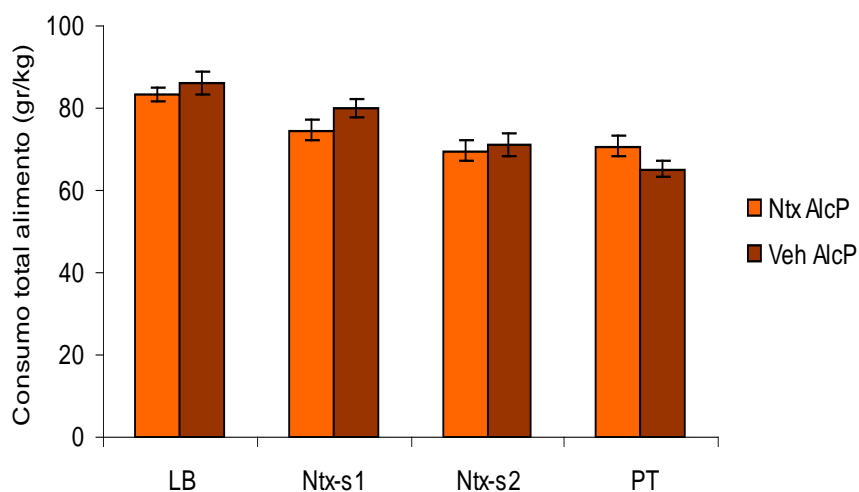


Fig. 4.1 Consumo total de alimento (gr/kg) en 12hs ($M \pm ES$) para el grupo Ntx-AlcP y Veh-AlcP durante los diferentes periodos.

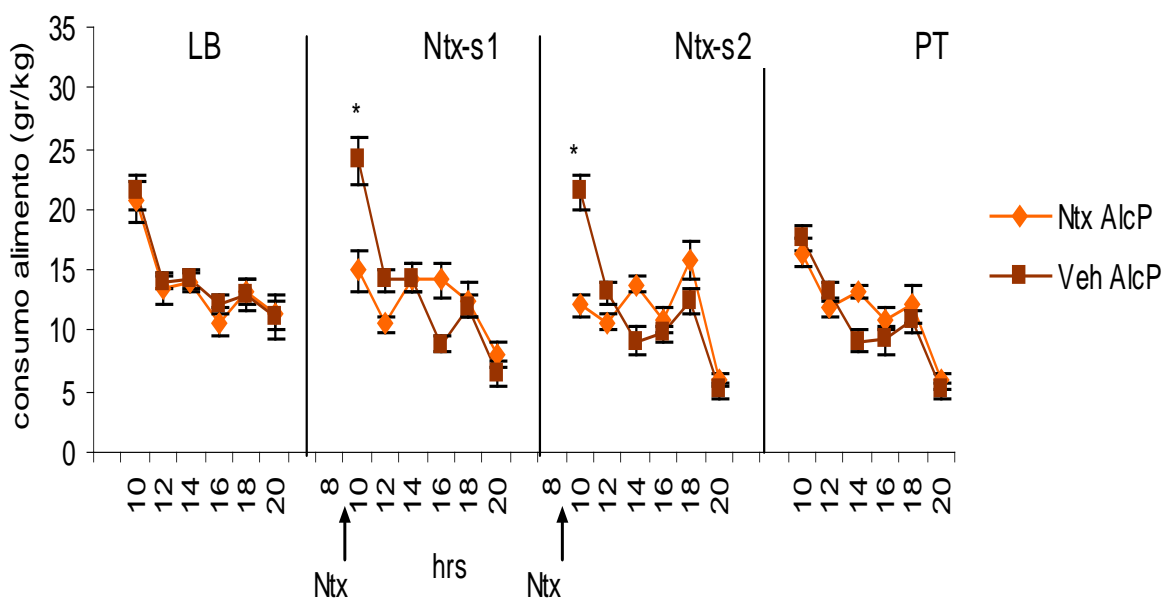


Fig 4.2. Consumo de alimento en gr /kg ($M \pm ES$) para el grupo Ntx-AlcP y Veh-AlcP medido cada 2hs durante 12hs. * Ntx-P < Veh-P

CONSUMO DE AGUA

En el análisis de consumo total de agua el único factor significativo fue el factor grupos (Ntx-AlcP, Veh-AlcP) ($F(1,18)=4.51$, $p=0.0477$) en donde el grupo Ntx-AlcP fue significativamente menor al grupo Veh-AlcP. Ni la interacción (Fig 4.3) ni el factor periodos fueron significativos.

En el análisis de grupo (Ntx-AlcP, Veh-AlcP) X hrs (10, 12, 14, 16, 18, 20) en el periodo de LB, encontramos al factor hrs significativo ($F(5,90)=2.78$, $p=0.0222$) en donde las 12hrs es significativamente mayor a las 20hrs. Ni la interacción (Fig 4.4) ni el factor grupos fueron significativos. Para la fase de luz de las 20:00 a las 8:00hrs no se observan diferencias significativas.

Para el periodo de Ntx-s1 observamos que en el análisis de grupo X hrs los dos factores y la interacción fueron significativas. Con respecto al factor A, grupos, ($F(1,18)=7.02$, $p=0.0163$) en donde el grupo Ntx-AlcP fue significativamente menor al grupo Veh-AlcP. El

factor B, hrs ($F(5,90)=9.23$, $p=0.0000$) la diferencia fue la siguiente, 20hrs es significativamente menor al resto de las hrs de medición. En relación a la interacción ($F(5,90)=4.85$, $p=0.0006$) encontramos que las 10hrs del grupo Veh-AlcP es significativamente mayor a las respectivas horas del grupo Ntx-AlcP (Fig 4.4). En el análisis de grupos en el periodo de luz de las 20:00 a las 8:00hrs ($F(1,18)=10.25$, $p=0.0049$) se observa que el consumo del grupo Ntx-AlcP es significativamente menor al grupo Veh-AlcP. En el análisis del periodo de luz (20:00 a las 8:00) se observó que el consumo del grupo Veh-AlcP es significativamente mayor al consumo del grupo Ntx-AlcP

El análisis de la segunda semana de tratamiento (Ntx-s2) de grupo X hrs, el factor hrs y la interacción fueron significativas. Con respecto al factor hrs ($F(5,90)=16.26$, $p=0.0000$) observamos que las 14 y 18 hrs son significativamente mayores a las 10, 12 y 20hrs; las 16 mayores a las 10 y 20hrs; y las 12 a las 20hrs. En relación a la interacción ($F(5,90)=6.44$, $p=0.0000$) se observa que las 10 y 12hrs del grupo Veh-AlcP son significativamente mayores a las respectivas horas del grupo Ntx-AlcP (Fig 4.4). Se encontraron diferencias significativas entre grupos en el periodo de luz, en donde el grupo Veh-AlcP es significativamente mayor al grupo Ntx-AlcP

En PT observamos diferencias significativas en el factor B, hrs, ($F(5,90)=6.24$, $p=0.0001$) en donde las 18hrs son significativamente mayor a las 10 y 20hrs; las 12, 14, 16hrs mayores a las 20hrs independientemente del grupo. Ni el factor grupos, ni la interacción (Fig 4.4) fueron significativos, así como tampoco el periodo de las 20:00 a las 8:00.

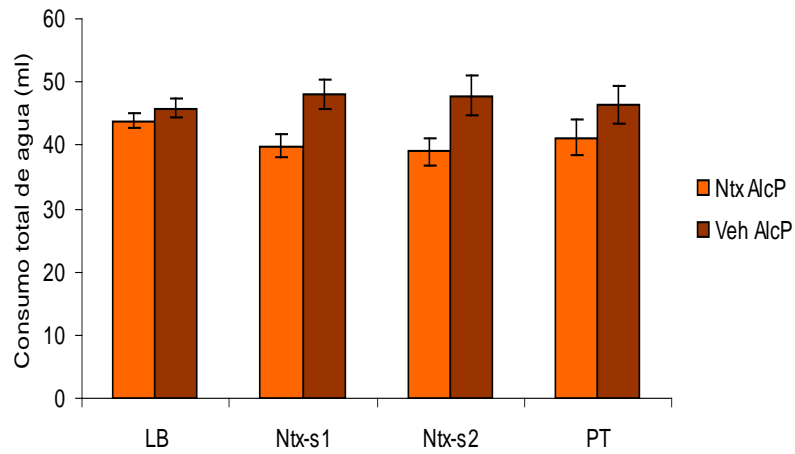


Fig. 4.3 Consumo total de agua (ml) en 12hs ($M \pm ES$) para el grupo Ntx-AlcP y Veh-AlcP durante los diferentes periodos.

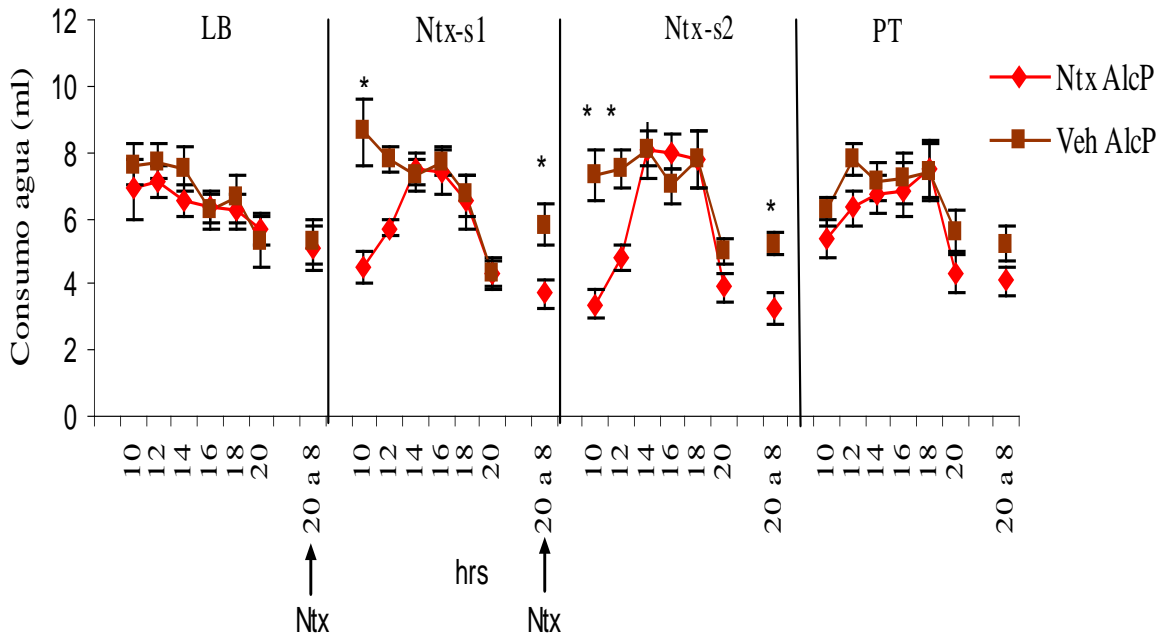


Fig 4.4. Consumo de agua en ml ($M \pm ES$) para el grupo Ntx-AlcP y Veh-AlcP medido cada 2hs durante 12hs. * Ntx-P < Veh-P

CONSUMO DE ALCOHOL

En el análisis grupo X periodo del consumo total de alcohol se observa que el factor periodos ($F(3,54)=8.87$, $p=0.0001$) fue significativo en donde PT es significativamente mayor a LB y a Ntx-s1; y Ntx-s2 mayor a LB. Ni la interacción (Fig 4.5) ni el factor grupos fueron significativos.

Con respecto a LB, el análisis de grupo (Ntx-AlcP, Veh-AlcP) X hrs (10, 12, 14, 16, 18, 20) ni el factor grupos, ni la interacción (Fig 4.6) presentaron diferencias significativas. En el factor B, hrs, ($F(5,90)=4.87$, $p=0.0005$) se observa que las 18hrs es significativamente mayor a las 10 y 12hrs; las 14 y 16hrs a las 10hrs, independientemente del grupo.

En el análisis de dos factores para Ntx-s1 observamos que el único factor que mostró diferencias significativas fue las hrs ($F(5,90)=11.97$, $p=0.0000$) en donde las 14, 16, 18hrs son significativamente mayores a las 10 y 12hrs; las 20 mayor a las 10hrs, independientemente del grupo.

Para Ntx-s2 solo se observa significancia en el factor B, hrs, ($F(5,90)=21.05$, $p=0.000$) donde las 18hrs es significativamente mayor a las 10, 12, 14, 16 y 20hrs; las 16 y 20hrs mayor a las 10 y 12hrs, y las 14hrs a las 10hrs, independientemente del grupo. No se observan diferencias significativas ni en el factor grupo ni en la interacción (Fig 4.6).

Para PT el factor hrs fue significativo ($F(5,90)=21.06$, $p=0.0000$) observándose que las 18hrs es significativamente mayor a las 10, 12, 14 y 20hrs, las 16hrs mayor a las 10, 12 y 20, y las 12, 14 y 20hrs a las 10, independientemente del grupo.

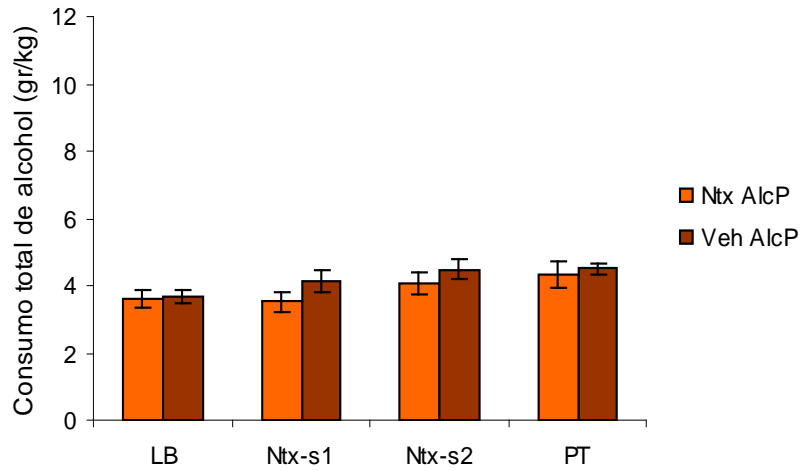


Fig 4.5. Consumo total de alcohol (gr/kg) en 12hs ($M \pm ES$) para el grupo Ntx-AlcP y Veh-AlcP durante los diferentes periodos.

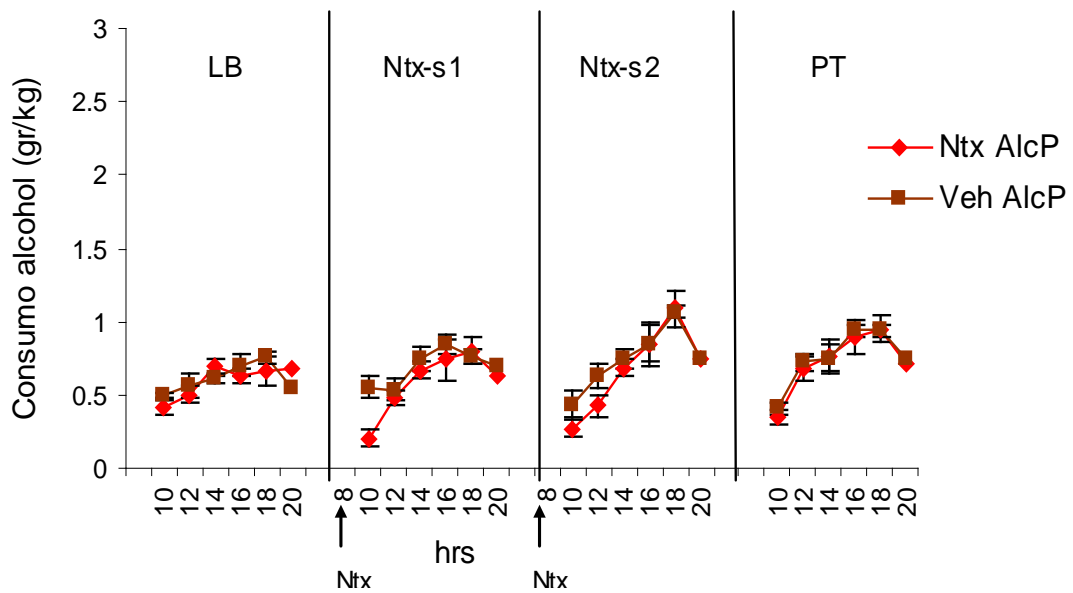


Fig 4.6. Consumo de alcohol en gr/kg ($M \pm ES$) para el grupo Ntx-AlcP y Veh-AlcP medido cada 2hs durante 12hs.

GANANCIA DE PESO CORPORAL

El análisis de grupo X periodo para la ganancia de peso corporal muestra que hay ausencia de diferencias significativas en los dos factores, grupo y periodo, y en la interacción entre ambos (Fig. 4.7)

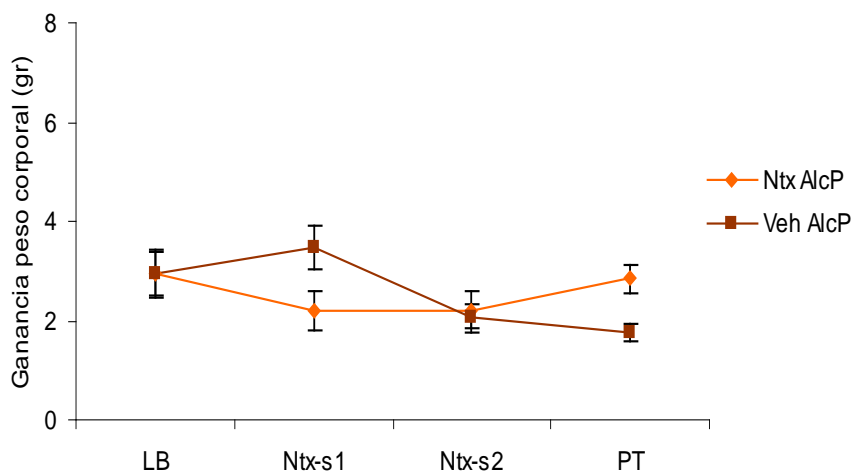


Fig 4.7. Ganancia de peso corporal (gr) ($M \pm ES$) en los cuatro periodos

PORCENTAJE DE GRASA

No se observan diferencias significativas entre grupos en el porcentaje de grasa.

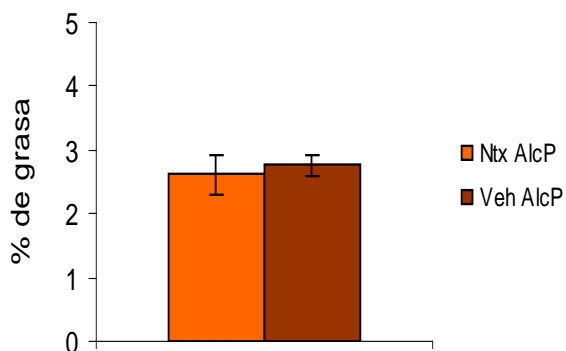


Fig 4.8. Media + ES del porcentaje de grasa para Ntx-AlcP y Veh-Alc

DISCUSION

En el Experimento 4 (Administración de Ntx (10mg/kg) con acceso a alimento, agua y alcohol en condiciones de privación parcial de alimento (12hrs/día))” se mostró, en el consumo de alimento que, durante la LB, los patrones son iguales, para ambos grupos (Ntx-AlcP y Veh-AlcP), inmediatamente después de la administración del antagonista opioide se produce un decremento en el consumo de alimento en la primera semana, efecto que persiste en la segunda semana de tratamiento a pesar de la privación parcial en el grupo Ntx y no se observan diferencias significativas en PT ni en el consumo total de dicho incentivo. Esto nos indica que la Ntx influye en los estados de motivación, es decir, aún cuando el sujeto ha pasado por un periodo de restricción y le es muy atractivo el alimento, la Ntx decremента su consumo. Knuth y Friesen, (1983) encontraron que los niveles de β -endorfinas disminuyen en el núcleo arqueado de las ratas después de una prolongada (16 días) restricción de alimento. Por otro lado, se ha encontrado que los antagonistas selectivos a receptores opioides diferencialmente alteran la alimentación inducida por privación en ratas, el pretratamiento ventricular ya sea con antagonistas selectivos para μ y μ_1 producen potentes reducciones (50%-70%) en el consumo inducido por privación, efectos similares a la magnitud producida por el antagonista inespecífico (Levine, Grace y Billington, 1991; Koch y Bodnar, 1994). En nuestro caso posiblemente se este afectando la liberación de β -endorfinas y al bloquear los receptores opioides con el antagonista el consumo disminuye a pesar de que los sujetos tienen hambre alterando el valor incentivo por comer, esto apoya la hipótesis planteada en la cual se menciona que cuando se administre la Ntx inmediatamente antes del acceso a 12 hrs de alimento y alcohol, después de 12 hrs de privación de ambos estímulos, el consumo de alimento se decremента en las horas subsecuentes a la inyección y posteriormente tenderá a incrementarse de tal manera que el consumo final diario será semejante que el del grupo control, aunque no encontramos ese efecto compensatorio al final del día.

Esta ausencia de diferencias en el consumo de alimento las podemos observar también en la ganancia de peso corporal y en el porcentaje de grasa corporal, se observa una tendencia del grupo Ntx-AlcP a perder peso en el periodo de Ntx-s1 lo cual concuerda con los estudios encontrados (Marin-Bivens y Olster, 1999; Kotz, Glass, Levine y Billington, 2000) y posteriormente se recupera el peso cuando se suspende el antagonista opioide pero sin ser significativo este resultado, esto puede deberse a lo mencionado en el experimento anterior,

que se sabe que cada individuo parece regular el consumo de alimento y así mantener el peso corporal alrededor de un punto de regulación óptimo por lo que la privación parcial de alimento no modifica el peso corporal ni el porcentaje de grasa y así como encontraron Hadcock y Scott, (2005) que la Ntx no produce efecto en ratas delgadas en nuestro caso observamos que no hay ningún efecto en el peso corporal causado por la Ntx.

En el consumo de agua se observa un decremento significativo las primeras dos horas de consumo, en la primer semana de tratamiento y de las 20:00 a las 8:00hrs para el grupo tratado con el antagonista opioide. En la segunda semana de tratamiento (Ntx-s2) observamos que este decremento persiste las 4 horas siguientes a la administración de la Ntx y en la fase de luz, tiempo en el cual los sujetos no tenían acceso a alimento por lo que se ve afectado el consumo de agua, ya que se sabe que las ratas dejan de beber mientras dura el periodo de restricción de alimento (Martínez, 2007). Esta tendencia de decremento permanece en el consumo total donde se observa que a partir de la primera semana de tratamiento se decrementa el consumo del grupo Ntx-AlcP y se mantiene en ese sentido hasta PT aunque estos datos no son significativos. Se sabe que la Ntx decremента el consumo de agua (William y Woods, 1999) y es por lo que encontramos ese efecto de decremento en el consumo para el grupo Ntx-AlcP. Es posible que la Ntx afecte con mayor intensidad un reforzador primario como es el agua, que es importante para la supervivencia del ser vivo, más que al alimento, por eso se observa un decremento que persiste a lo largo del tiempo.

Con respecto al consumo de alcohol encontramos que la Ntx no produjo ningún efecto ni en el patrón de consumo ni en el consumo total, este efecto posiblemente pueda deberse a que al ser el alcohol un reforzador no primario, la Ntx no lo afecte de igual manera como sucede con el agua y el alimento, ya que al estar privado de alimento el sujeto, invierte más tiempo en comer las primeras horas y en beber agua que en beber alcohol. Diversos estudios (Gianoulakis, 1990; O'Malley, 1996; Coonfield, Kiefer, Ferraro y Sinclair, 2004; Stromberg, Volpicelli y O'Brien, 1998) muestran que se produce un decremento del consumo de alcohol las horas inmediatas a la administración de la Ntx, en nuestro caso no encontramos ese efecto posiblemente por causa de la privación parcial de alimento y de alcohol, por lo anteriormente mencionado, debido que el sujeto invierte su tiempo en comer y tomar agua, que en beber alcohol. Williams y Woods (1999) encontraron que la Ntx puede afectar el consumo de agua y alcohol dependiendo de la preferencia de una solución sobre la otra, es decir cuando el agua es

preferida sobre el alcohol, la Ntx decreta el consumo de agua, concluyen que la actividad de los opioides endógenos modulan las cualidades reforzantes de la respuesta o el consumo del reforzador preferido. La hipótesis planteada para el caso del alcohol, plantea que, éste se decrementará en las horas subsecuentes a la inyección y su latencia de inicio de consumo será mayor que la del alimento, posteriormente tenderá a incrementarse encontrándose el consumo final global diario significativamente menor con respecto a su grupo control, nuestra hipótesis no se cumplió con este experimento ya que no encontramos ningún efecto en este incentivo posiblemente debido a lo que encontraron Williams y Woods que la Ntx afecta las cualidades reforzantes del líquido preferido, que en este caso es el agua.

Con respecto al consumo de alimento, el factor B (horas independientemente del grupo) mostró que a las 10 hrs el consumo es significativamente mayor al resto de las horas del día en todos los periodos, sin embargo esta diferencia no se reproduce en el consumo de agua ni en el de alcohol, lo cual sugiere que al estar privados de alimento, los sujetos se dedicaron a consumir preferentemente este incentivo más que agua y alcohol en las primeras horas posteriores a la privación de alimento y alcohol.

REFERENCIAS

1. Bakshi, V.P & Kelley, A.E. (1993a) Feeding induced by opioid stimulation of the ventral striatum: Role of opiate receptor subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 265:1253-1260.
2. Bakshi, V.P & Kelley, A.E. (1993b) Striatal regulation of morphine-induced hyperphagia: An anatomical mapping study. *Psychopharmacology*, 111:207-14.
3. Balon-Perin, S, Kolanowski, J, Berbinschi, A, Franchimont, P & Ketelslegers, JM. (1991). The effects of glucose ingestion and fasting on plasma immunoreactive beta-endorphin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol in obese subjects. *Journal of Endocrinological Investigation* 14: 919-925,
4. Basso, AM & Kelley, AE (1999) Feeding induced by GABA_A receptor stimulation within the nucleus accumbens shell: regional mapping and characterization of macronutrient and taste preference. *Behavioral Neuroscience*, 113(2):324-336.
5. Bray, GA, & York, DA. (1979) Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals. An autonomic and endocrine hypothesis. *Physiology Rtv.* 59, 719-809
6. Bertino, M, Beauchamp, GK & Engelman, K. (1991) Naltrexone, an opioid blocker, alters taste perception and nutrient intake in humans. *American Journal of Physiology*, 261(1-2):R59-63.
7. Berman, Y, Devi L, & Carr KD. (1994). Effects of chronic food restriction on prodynorphin-derived peptides in rat brain regions. *Brain Research.* 664: 49-53.
8. Bergendahl, M, Wiemann JN, Clifton DK, Huhtaniemi I. & Steiner RA. (1992) .Short-term starvation decreases POMC mRNA but does not alter GnRH mRNA in the brain of adult male rats. *Neuroendocrinology* 56: 913-920.
9. Berridge, KC. & Robinson, TE. (1998). What is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Review*, 28:309-69.
10. Berridge, KC. (1996) Food reward: Brain substrates of wanting and linking. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 20:1-25.
11. Berglund, MM., Hipskind, PA. & Gehlert, DR. (2003) Recent developments in our understanding of the physiological role of PP-fold peptide receptor subtypes. *Experimental Biology and Medicine*, 228:217-44.
12. Bjorbaek, C. & Hollenberg, AN. (2002). Leptine and melanocortin signaling in the hypothalamus. *Vitamins and Hormones*, 65:281-311.
13. Brady, L. S., Smith MA, Gold PW & Herkenham M. (1990). Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 52:441-447.
14. Clark, JT, Keaton, AK, Sahu, A, Kalra, SP, Mahajan, SC, & Gudger, JN (1998). Neuropeptide Y (NPY) levels in alcoholic and food restricted male rats: implications for site selective function. *Regulatory Peptides*, 75-76:335-345.
15. Chen, P, Li, C, Haskell-Luevano, C, Cone, RD & Smith, MS. (1998) Expression of agouti-related transcript (ART) and neuropeptide Y (NPY) in the hypothalamic arcuate nucleus of female rats during the estrous cycle. Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, LA, (Abstract P3-663), p 521
16. Chester, JA. & Cunningham, CL. (2002) GABA(A) receptor modulation of the rewarding and aversive effects of ethanol. Evidence of alcohol/GABA interactions in an animal model. *Alcohol*, 26:131-143.

17. Chua, SC, Brown, AW, Kim, J, Hennessey, KL, Leibel, RL. & Hirsch, J. (1991). Food deprivation and hypothalamic neuropeptide gene expression: effects of strain background and the diabetes mutation. *Mol. Brain Research*, 11: 291-299.
18. Contreras, J. (1999). Cambios sociales y cambios en los comportamientos alimentarios en la España de la segunda mitad del siglo XX. *Anuario de Psicología*, 30(2):25-42.
19. Coonfield, DL, Hill, KG, Kaczmarek, HJ, Ferraro Iii, FM. & Kiefer, SW. (2002) Low doses of naltrexone reduce palatability and consumption of ethanol in outbred rats. *Alcohol*, 26:43-47.
20. Coonfield, DL, Kiefer, SW, Ferraro, FM 3rd & Sinclair, JD. (2004) Ethanol palatability and consumption by high ethanol-drinking rats: manipulation of the opioid system with naltrexone. *Behavioral Neuroscience*, 118(5):1089-96.
21. Cooper, S.J., & Kirkham, T.C. (1993). Opioid mechanisms in the control of food consumption and taste preferences. In: Herz A. (ed) *Handbook of Experimental Pharmacology: Opioids II* (pp 239-262), Springer-Verlag, Berlin.
22. Dai, X, Thavundayil, J & Gianoulakis, C. (2005) Differences in the peripheral levels of β -endorphin in response to alcohol and stress as function of alcohol dependence and family history of alcoholism. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 29: 1965–75.
23. de Zwaan, M. & Mitchell, JE. (1992) Opiate antagonists and eating behavior in humans: a review. *Journal of Clinical Pharmacology*, 32(12):1060-72.
24. Díaz Muñoz, M. & Vázquez Martínez, O. (2002). Alimentación y balance energético. En Motivación y conducta: sus bases biológicas. Escobar Briones, C, Aguilar Roblero, RA, (eds). Manual Moderno. México. pp 169-188.
25. Ding, YQ, Kaneko, T, Nomura, S. & Mizuno, N (1996) Immunohistochemical localization of μ -opioid receptors in the central nervous system of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 367:375-402.
26. Ehlers, CL, Li, TK, Lumeng, L, Hwang, BH, Somes, C, Jimenez, P, Mathe, AA. (1998). Neuropeptide Y levels in ethanol-naive alcohol-preferring and -nonpreferring rats and in Wistar rats after ethanol exposure. *Alcohol Clinical and Experimental Research* 22:1778–1782.
27. Escobar Briones, C. & Aguilar Roblero, RA (2002). Alertamiento e ingestión de alimentos. En: motivación humana y animal. Hernández-González, M. (ed). Manual Moderno. México. pp 67-85.
28. Escobar Briones, C. (2002). Ingestión de alimentos y equilibrio energético. En Motivación y conducta: sus bases biológicas. Escobar Briones, C, Aguilar Roblero, RA, (eds). Manual Moderno. México. pp 189-211.
29. Evans, KR, & Vaccarino, FJ (1990). Amphetamine- and morphine-induced feeding: evidence for involvement of reward mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14:9-22.
30. Fantino, M. (1988) Endogenous opiates, palatability and control of food intake. *Annals of Endocrinology*, 49(2):125-32.
31. Fariñas, RL, Meléndez, MM, Martínez, Z, Travieso, Y, Posada, A & Dujarric, DM. (2005). Control de la alimentación y leptina. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 24(1)47-53.
32. Friedman, JM. & Halaas, JL. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395:763-770.

33. Flier, JS. & Maratos-Flier, E. (1998). Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathway. *Cell*, 92:437-440.
34. Foster, AC, Joppa, M, Markison, S, Gogas, KR, Fleck, BA, Murphy, BJ, Wolff, M, Cismowski, MJ, Ling, N, Goodfellow, VS, Chen, C, Saunders, J & Conlon, PJ.(2003). Body weight regulation by selective MC4 receptor agonist and antagonist. *Annals New York Academy Sciences*, 994:103-110.
35. Gambert, SR, Garthwaite, TL, Pontzer, CH, & Hagen, TC. (1980) Fasting associated with decrease in hypothalamic betaendorphin. *Science*, 210: 1271-1272.
36. Gardell, LR, Hubbell, CHL. & Reid, LD. (1996) Naltrexone persistently reduces rats intake of a palatable alcoholic beverage. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 20:584-588.
37. Gardell, LR, Reid, LD, Boedeker, KL, Liakos, TM & Hubell CL. (1997a) Isradipine and naltrexone in combination with isradipine interact with a period of abstinence to reduce rats' intakes of an alcoholic beverage. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21(9):1592-8.
38. Gardell, LR, Whalen, CA, Chattopadhyay, S, Cavallaro, CA, Hubbell, CL & Reid, LC. (1997b) Combination of naltrexone and fluoxetine on rats propensity to take alcoholic beverage. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21:1435-39.
39. Gautron, L, Mingam, R, Moranis, A, Combe, C. & Laye, S. (2005) Influence of feeding status on neuronal activity in the hypothalamus during lipopolysaccharide-induced anorexia in rats. *Neuroscience*, 134(3):933-46.
40. Genazzani, A.R., Nappi, G., Facchinetti, F., Mazzella, G.L., Parrini, D., & Sinforiani, E. (1982). Central deficiency of beta-endorphin in alcohol addicts. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 55, 583-586.
41. Gerald, C, Walker, MW, Criscione, L, Gustafson, EL, Batzl-Hartmann, C, Smith, KE, Vaysse, P, Durkin, MM, Laz, TM, Linemeyer, DL, Schaffhauser, AO, Whitebread, S, Hofbauer, KG, Taber, RI, Branchek, TA & Weinshank, RL.(1996). A receptor subtype involved in neuropeptide-Y food intake. *Nature* 382:168-70.
42. Gianoulakis, C. (2001). Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 26(4), 304-318.
43. González, J.P., & Brogden, R.N. (1988). Naltrexone: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of opioid dependence. *Drugs*, 35, 192-213.
44. Gonzalez, R.A. & Weiss, F. (1998). Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamina levels in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 18, 10663-10671.
45. Gosnell, BA, Crahn, DD, Majchrzak, MJ (1990a). The effects of morphine on diet selection are dependent upon baseline diet preferences. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 37:207-212.
46. Gosnell, BA, Majchrzak, MJ. (1990b) Effects of a selective mu opioid receptor agonist and naloxone on the intake of sodium chloride solutions. *Psychopharmacology*, 100:66-71.
47. Gosnell, BA, Majchrzak, MJ, Krahn, DD. (1990c) Effects of preferential delta and kappa opioid receptor agonists on the intake of hypotonic saline. *Physiology and Behavior*, 47:601-3.

48. Goodwin, F.L., Campisi, M., Babinska, I. & Amit, Z. (2001). Effects of naltrexone on the intake of ethanol and flavored solutions in rats, *Alcohol*, 25, 9-19.
49. Hadcock, JR & Scott, DO. (2005). Role of opiates and their receptors in the regulation of foos intake and body weight. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 2,171-175.
50. Hagan, MM, Rushing, PA, Benoit, SC, Woods, SC & Seeley, RJ. (2001) Opioid receptor involvement in the effect of AgRP-(83–132) on food intake and food selection. *American Journal of Physiology*, 280:R814–21.
51. Hahn, TM, Breininger, JF, Baskin, DG. & Schwartz, MW (1998). Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Natural Neuroscience* 1:271–272.
52. Hamilton, M.G., & Hirst, H. (1980). Alcohol-related tetrahydroisoquinolines: pharmacology and identification. *Substances and Alcohol Actions Misuse*, 1(2), 121-144.
53. Heimer, L, Zahm, DS, Churchill, L, Kalivas, PW & Wohltmann, C. (1991) Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*. 41:89-125.
54. Hill, K.G. & Kiefer, W. (1997). Naltrexone treatment increase the aversiveness of alcohol for outbred rats. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 21, 637-642.
55. Hobbs, DJ, Koch, JE & Bodnar, RJ. (1994) Naltrexone, dopamine receptor agonists and antagonists and food intake in rats: 1. Food deprivation. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 49(1):197-204.
56. Hoebel, BG & Teitelbaum, P (1962). Hypothalamic control feeding and self-stimulation. *Science*, 135:375-377.
57. Hollister, LE, Johnson, K, Boukhabza, D & Gillespie, HK. (1981) Aversive effects of naltrexone in subjects not dependent on opiates. *Drug and Alcohol Dependence* 8(1):37-41.
58. Horvath, TL, Diano, S & Tschöp, M. (2004). Brain circuits regulating energy homeostasis. *Neuroscientist*, 10(3):235-246.
59. Huszar, D, Lynch, CA, Fairchild-Huntress, V, Dunmore, JH, Fang, Q, Berkemeier, LR, Gu, W, Kesterson, RA, Boston, BA, Cone, RD, Smith, FJ, Campfield, LA, Burn, P. & Lee, F (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 88:131–141.
60. Ikemoto S & Panksepp J. (1996) Dissociations between appetitive and consummatory responses by pharmacological manipulations and rewardrelevant brain regions. *Behavioral Neuroscience*, 110:331– 345.
61. Jarosz, PA, & Metzger, BL. (2002) The effect of opioid antagonism on food intake behavior and body weight in a biobehavioral model of obese binge eating. *Biological Research of Nursing*, 3(4):198-209.
62. Juárez, J & Eliana B De T. (2007). Alcohol consumption is enhanced after naltrexone treatment. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 31:260-264.
63. Kalra, SP. & Kalra, PS. (2003). Neuropeptide Y: a physiological orexigen modulated by the feedback action of ghrelin and leptin. *Endocrine*, 22(1):49-56.
64. Kalra, PS, Norlin, M, & Kalra, SP. (1995) Neuropeptide Y stimulates beta-endorphin release in the basal hypothalamus: role of gonadal steroids. *Brain Research*, 24;705(1-2):353-356.

65. Kanarek, RB, Mathes, WF, Heisler, LK, Lima, RP & Monfared, LS. (1997) Prior exposure to palatable solutions enhances the effects of naltrexone on food intake in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 57(1-2):377-81.
66. Kelley, AE. & Domesik, VB. (1982) The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: An anterograde- and retrograde-Horseradish peroxidase study. *Neuroscience*. 7:2321-35.
67. Keesey, RE., Boyle, PC., Kemnitz, JW., & Mitchel, JS. (1976) The role of the lateral hypothalamus in determining the body weight set-point. In *Hunger: Basic Mechanisms and Clinical Implications* (Novin, D., Wywicka, W., and Bray, G., eds) pp. 243-255, Raven, New York
68. Kiefer, F, Jahn, H, Otte, C, Demiralay, C, Wolf, K. & Wiedemann, K. (2005) Increasing leptin precedes craving and relapse during pharmacological abstinence maintenance treatment of alcoholism. *Journal of Psychiatric Research*, 39(5):545-51.
69. Kirkham, TC & Blundell, JE. (1987) Effects of naloxone and naltrexone on meal patterns of freely-feeding rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 26(3):515-20.
70. Khaimova, E, Kandov, Y, Israel, Y, Cataldo, G, Hadjimarkou, M & Bodnar, RJ (2004). Opioid receptor subtype antagonists differentially alter GABA agonist-induced feeding elicited from either the nucleus accumbens shell or ventral tegmental area regions in rats. *Brain Research*, 1026:284–294
71. Khawaja, XZ, Chattopadhyay, AK. & Green IC. (1991). Increased p-endorphin and dynorphin concentrations in discrete hypothalamic regions of genetically obese (ob/ob) mice. *Brain Research*, 555: 164-168.
72. Klitenick, MA & Wirtshafter, D. (1988) Comparative studies of the ingestive behaviors produced by microinjections of muscimol into the midbrain raphe nuclei of the ventral tegmental area of the rat. *Life Science*, 42:775– 782.
73. Knuth, UA. & Friesen, HG. (1983). Changes of beta-endorphin and somatostatin concentrations in different hypothalamic areas of female rats after chronic starvation. *Life Science*, 33: 827-833.
74. Koch, JE & Bodnar, RJ. (1994) Selective alterations in macronutrient intake of food-deprived or glucoprivic rats by centrally-administered opioid receptor subtype antagonists in rats. *Brain Research*. 657:191-201.
75. Koob, G.F & Bloom, F. (1988) Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*, 242:715-723.
76. Kotz, CM, Glass, MJ, Levine AS. & Billington CJ. (2000). Regional effects of naltrexone in the nucleus of the solitary tract in blockade of NPY-induced feeding. *American Journal of Physiology and Regulatory Integrative Comparative Physiology*, 278: R499–R503.
77. Kotz, CM, Grace, MK, Billington, CJ. & Levine, AS. (1993). The effect of norbinaltorphimine, p-funaltrexamine, and naltrindole on NPY-induced feeding. *Brain Research*, 631: 325-328.
78. Kotz, CM, Grace, MK, Briggs, JE, Billington, CJ & Levin, S. (1996). Naltrexone induces arcuate (ARC) nucleus neuropeptide Y gene expression in the rat. *American Journal of Physiology*, 271:R286-R271.
79. Kulkosky, PJ, Glazner, GW, Moore, HD, Low, CA & Woods, SC (1988). Neuropeptide Y: behavioral effects in the golden hamster. *Peptides* 9:1389-1393.

80. Lahti-Koski, M., Pietinen, P, Heliovaara, M. & Vartiainen, E. (2002) Associations of body mass index and obesity with physical activity, food choices, alcohol intake and smoking in the 1982-1997 FINRISK studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 75:809-817.
81. Lambert, PD, Wilding, JPH, Al-Dokhayel, AAM, Gilbey, SG. & Bloom, SR. (1993). The effect of central blockade of kappa-opioid receptors on neuropeptide Y-induced feeding in the rat. *Brain Research*, 629: 146-148.
82. Lambert, PD, Wilding, JPH, Al-Dokhayel, AAM, Bohuon, C, Comoy, E, Gilbey, SG. & Bloom, SR. (1993). A role for neuropeptide-Y, dynorphin, and noradrenaline in the central control of food intake after food deprivation. *Endocrinology*, 133(1): 29-32.
83. Lang, IM, Strahlendorf, JC, Strahlendorf, HK, Lutherer, LO & Barnes, CD. (1982). The effects of chronic administration of naltrexone on appetitive and water exchange in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 16(6): 909-13.
84. Larue-Achagiotis, C, Poussard, AM. & Louis-Sylvestre, J. (1990). Alcohol drinking, food and fluid intakes and body weight gain in rats. *Physiology & Behavior*. 47(3):545-548.
85. Levine, AS, & Morley, JE. (1984). Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides*. 5(6):1025-1029.
86. Levine, AS, Grace, M. & Billington, CJ. (1990). The effect of centrally administered naloxone on deprivation and drug induced feeding. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 36: 409-412.
87. Levine, AS, Grace, M. & Billington, CJ. (1991). Beta-funaltrexamine (beta-FNA) decreases deprivation and opioid-induced feeding. *Brain Research*. 25;562(2):281-4. (en Hadjimarkou 04)
88. Lee, MC, Wagner Jr, HN, Tanada S, JJ Frost, Bice, AN & Dannals RF. (1988). Duration of occupancy of opiates receptors by naltrexone. *Journal of Nuclear Medicine*, 29(7):1207-11.
89. López-Espinosa, A & Martínez, H. (2001). Efectos de dos programas de privación alimentaria sobre el peso corporal de ratas wistar. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 27:35-46.
90. Majeed, NH, Lason, W, Przewlocka, B. & Przewlocki, R. (1986). Brain and peripheral opioid peptides after changes in ingestive behavior. *Neuroendocrinology* 42: 267-272.
91. MacDonald, AF, Billington, CJ & Levine, AS. (2003) Effects of the opioid antagonist naltrexone on feeding induced DAMGO in the ventral tegmental area and in the nucleus accumbens shell region in the rat. *American Journal of Physiology and Regulatory Integrative Comparative Physiology*, 285(5):R999-R1004.
92. Mansour, A, Khachaturian, H, Lewis, ME, Akil, H. & Watson, SJ. (1988). Anatomy of CNS opioid receptors. *Trend in Neuroscience*, 11:308-14.
93. Mansour, A, Burke, S, Pavlic, RJ, Akil, H, & Watson, SJ. (1996) Immunohistochemical localization of the cloned $\kappa 1$ receptor in the rat CNS and pituitary. *Neuroscience*, 71:671-690.
94. Margules, DL, Moisset B, Lewis, MJ, Shibuya, H & Pert, CB. (1978) Beta-endorphin is associated with over-eating in genetically obese mice (ob/ob) and rats (fa/fa). *Science*, 202:988-991.
95. Marin-Bivens, C.L & Olster, D.H. (1999). Opioid receptor blockade promotes weight loss and improves the display of sexual behaviors in obese Zucker female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 63(3), 515-520.

96. Marks-Kaufman, R., Balmagiya, T. & Gross, E. (1984). Modification in food intake and energy metabolism in rats as a function of chronic naltrexone infusions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 20, 911-916.
97. Martínez-Sánchez, H. (2007). Conducta alimentaria y hedonismo. En Neurobiología del hedonismo. Juárez-González, J (Ed). Manual moderno, UdG, UNAM. 55-73
98. McLaughlin, CL, Baile, CA. & Della-Fera, MA. (1985). Meal-stimulated increased concentrations of beta-endorphin in the hypothalamus of Zucker obese and lean rats. *Physiology and Behavior*, 35: 891-896.
99. McShane, TM, Petersen, SL, McCrone, S. & Keisler, DH. (1993). Influence of food restriction on neuropeptide-Y, proopiomelanocortin, and luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in sheep hypothalami. *Biology of Reproduction*, 49: 831-839.
100. Meister, B. & Hökfelt, T. (1988). Peptide- and transmitter-containing neurons in the mediobasal hypothalamus and their relation to GABAergic systems: possible roles in control of prolactin and growth hormone secretion. *Synapse*, 2:585-605.
101. Melanson, KJ. (2004) Food intake regulation in body weight management. *Nutrition Today*, 39(5):203-213.
102. Mitev, Y, Almeida, OFX. & Patchev, V. (1993). Pituitary-adrenal function and hypothalamic beta-endorphin release in vitro following food deprivation. *Brain Research*, 30: 7-10
103. Nader, K & van der Kooy, D. (1997) Deprivation state switches the neurobiological substrates mediating opiate reward in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*. 1;17(1):383-90
104. Novi, RF, Lamberto, M, Visconti, P, Maurino, M, Ardizzone, A, Mantovan, M, Meluzzi, A, Francesetti, G & Molinatti, GM. (1990) The role of opioid antagonists in the treatment of obesity. Results of a clinical trial with naltrexone. *Minerva Endocrinology*, 15(2):121-3.
105. Olson, GA, Olson RD & Kastin, J. (1991) Review: endogenous opiates 1990. *Peptides*, 13: 1247-1287.
106. Olszewski, PK, Wirth, MM, Grace, MK, Levine, AS, & Giraud, SQ. (2001) Evidence of interactions between melanocortin and opioid systems in regulation of feeding. *Neuroreport*, 12:1727-30.
107. O'Malley, SS. (1996) Opioid antagonist in the treatment of alcohol dependence: clinical efficacy and prevention of relapse. *Alcohol Alcoholism* 1: 77-814.
108. Oswald, L.M. & Wand, G.S. (2004). Opioids and alcoholism. *Physiology and Behavior*, 81, 339-358.
109. Parkes, H. & Sinclair, J.D. (2000). Reduction of alcohol drinking and upregulation of opioid receptors by oral naltrexone in AA rats. *Alcohol*, 21, 215-221.
110. Phillips, TJ, Wenger, ChD & Dorow, JD. (1997) Naltrexone effects on ethanol drinking acquisition and on established ethanol consumption in C57BL/6J mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21:691-702.
111. Reid, L. D., Gardell, L.R., Chattopadhyay, S. & Hubell, C.L. (1996). Periodic naltrexone and propensity to take alcoholic beverage. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 20, 1329-1334.
112. Robbins, TW. & Everitt, BJ. (1996) Neurobehavioral mechanism of reward and motivation. *Current Opinion in Neurobiology*, 6:228-236.
113. Robbins, TW, Cador, M, Taylor, JR. & Everitt, BJ. (1989) Limbic-striatal interactions in reward-related processes. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 13(2-3):155-162.

114. Robinson, TW & Berridge, KC. (1993). The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Review*, 18:247-91.
115. Rojdmarm, S, Calissendorff, J. & Brismar, K. (2001). Alcohol ingestion decreases both diurnal and nocturnal secretion of leptin in healthy individuals. *Clinical Endocrinology*, 5(5):639-47.
116. Rudski, JM, Billington, CJ, Levine, AS. (1994) Naloxone's effects on operant responding depend upon level of deprivation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49(2):377-83.
117. Sabath Silva, EF. (2002). Leptin. *Revista de Investigacion Clinica*, 54(2):161-165.
118. Sahu, A. (2004). Minireview: a hypothalamic role in energy balance with especial emphasis on leptin. *Endocrinology*, 145(6):2613-2620.
119. Scavo, D, Barletta, C, Buzzetti, R. & Vagiri, D. (1988). Effects of caloric restriction and exercise on p-endorphin, ACTH and cortisol circulating levels in obesity. *Physiology and Behavior*, 42: 65-68.
120. Shepherd, GM. (1994). Visceral brains: Feeding. En: *Neurobiology*. Shepherd, GM (Oxford University Press. Nueva York. pp 562-584.
121. Sills, TL, & Vaccarino, FJ (1991) Facilitation and inhibition of feeding by a single dose of amphetamine: relationship to baseline intake and accumbens cholecystokinin. *Psychopharmacology* 105:329-334.
122. Spiegel, TA, Stunkard, AJ, Shrager, EE, O'Brien, CP, Morrison, MF. & Stellar, E. (1987) Effect of naltrexone on food intake, hunger and satiety in obese men. *Physiology and Behavior*, 40(2):135-141.
123. Stanley, BG, Magdalin, W, Seirafi, A, Nguyen, MM. & Leibowitz, SF. (1992). Evidence for neuropeptide Y mediation of eating produced by food deprivation and for a variant of the Y1 receptor mediating this peptide's effect. *Peptides* 13:581-587
124. Steward, O (2000). The hypothalamus: coordination of visceral operation and behaviors that maintain bodily homeostasis. En: *Functional Neuroscience*. Springer-Verlag New York Inc. Pp 466-467.
125. Strand, FL. (1999). Endogenous opiate neuropeptides: Endorphins, enkephalins, dynorphins, Tyr-MIF-1, and nociceptin. En: *Neuropeptides Regulators of Physiological Process*. Strand FL (ed) pp 341-364.
126. Stratford, TR. & Kelley, AE. (1997) GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *Journal of Neuroscience*, 17:4434-40.
127. Stratford, TR. & Kelley, AE. (1999). Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *Journal of Neuroscience*. 19(24):11040-8.
128. Stromberg, M.F., Volpicelli, J.R. & O'Brien, C.P. (1998). Effects of naltrexone administered repeatedly across 30 or 60 days on ethanol consumption using a limited access procedure in the rat. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 22, 2186-2191.
129. Stromberg, MF, Sengpiel, T, Mackler, SA, Volpicelli, JR, O'Brien, CP & Vogel, WH. (2002) Effect of naltrexone on oral consumption of concurrently available ethanol and cocaine in the rat. *Alcohol*, 28:169-179.
130. Suter, PM, Hasler, E. & Vetter, W. (1997). Effects of alcohol on energy metabolism and body weight regulation: Is alcohol a risk factor for obesity? *Nutrition Reviews* 55:157-171.

131. Tannenbaum, MG & Pivorum, EB. (1984) Effect of naltrexone on food intake and hoarding in white-footed mice (*Peromyscus*). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 20(1):35-7.
132. Turton, MD, O'Shea, D, Gunn, I, Beak, SA, Edwards, CM, Meeran, K, Choi, SJ, Taylor, GM, Heath, MM, Lambert, PD, Wilding, JP, Smith, DM, Ghatei, MA, Herbert, J, & Bloom, SR. (1996) A role glucagon-like-peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379:69-72.
133. Vaccarino, FJ, Mogil, JS. & Stinus, L. (1995). Chronic dopamine antagonism facilitates opiate-induced feeding. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 20(3):210-214.
134. Van den Pol, AN, Wuarin, JP. & Dudek, FE. (1990). Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science*, 250:1276-1278
135. Van den Pol, AN. (1991). Glutamate and aspartate immunoreactivity in hypothalamic presynaptic axons. *Journal of Neuroscience*, 11:2087-2101.
136. Vaswani, KK. & Tejwani, GA. (1986). Food deprivation-induced changes in the level of opioid peptides in the pituitary and brain of rat. *Life Science*, 38: 197-201.
137. Villarejo, D.M. (1998) Farmacología de los analgésicos opioides y sus antagonistas. En: DM.Villarejo (Ed.). *Farmacología aplicada a la anestesia* (Intersistemas), PAC Anestesia 1, tomo A-3: 5-18. México, ED. Intersistemas SA. De CV.
138. Wannamethee, SG. & Sharper, AG (2003). Alcohol, Body weight and body weight gain in middle-aged men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77:1312-1317.
139. Wang Q, Bing C, Al-Barazanji, K, Mossakowaska, DE, Wang, XM, McBay, DL, Neville, WA, Taddayon, M, Pickavance, L, Dryden, S, Thomas, ME, McHale, MT, Gloyer, IS, Wilson, S, Buckingham, R, Arch JR, Trayhurn, P & Williams, G. (1997). Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes*. 46:335-341.
140. Widdowson, PS. & Holman, RB. (1992) ethanol-induced increase in endogenous dopamine release may involve endogenous opioids. *Journal of Neurochemistry*. 59:157-163.
141. Wilding, JP, Gilbey, SG, Mannan, M, Aslam, N, Ghatei, MA. & Bloom, SR. (1992). Increased neuropeptide Y content in individual hypothalamic nuclei, but not neuropeptide Y mRNA, in diet-induced obesity in rats. *Journal of Endocrinology* 132:299-304.
142. Williams, K.L. & Woods, J.H. (1999). Naltrexone reduces ethanol and/or water-reinforced responding in rhesus monkeys: effect depends upon ethanol concentration. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 23, 1462-1467.
143. Wilson, PN & Osbourn, DR. (1960) Compensatory growth after undernutrition in animals and birds. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 35,324-363 7.
144. Woods, SC & Seeley, RJ. (2006) Hap1 and GABA: thinking about food intake *Cellular Metabolism*. 3(6):388-390.
145. Yeomans, M.R. & Gray, R.W. (1996) Selective effects of naltrexone on food pleasantness and intake. *Physiology and Behavior*, 60(2):439
146. Yeomans, M.R. & Gray, R.W. (1997). Effects of naltrexone on food intake and changes in subjective appetite during eating: evidence for opioid involvement in the appetizer effect. *Physiology and Behavior*, 62(1), 15-21.

147. Yeomans, MR, Hails, NJ. & Nesic, JS. (1999). Alcohol and appetizer effect. *Behavioral Pharmacology* 10:151-161.
148. Yeomans, MR, Caton, S. & Hetherington, MM. (2003). Alcohol and food intake. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 6:639-644.
149. Yeomans, MR & Gray, RW. (2002) Opioid peptides and the control of human ingestive behaviour. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(6):713-28. Review.
150. Zalewska-Kaszubska, J, Gorska, D, Dyr, W & Czarnecka, E (2008) Voluntary alcohol consumption and plasma beta-endorphin levels in alcohol-preferring rats chronically treated with naltrexone *Physiology & Behavior*, 93:1005–1010
151. Zhang, M, Balmadrid, C. & Kelley, AE. (2003). Nucleus accumbens opioid, gabaergic and dopaminergic modulation of palatable food motivation: contrasting effects revealed by a progressive ratio study in the rat. *Behavioral Neuroscience*. 117:202-211.
152. Zhang, M. & Kelley, AE. (1997). Opiate agonist microinjection into de nucleus accumbens enhance sucrose drinking in rats. *Psychopharmacology*. 132:350-360.
153. Zimanyi, IA. & Pellemounter, MA. (2003). The role of melanocortin peptides and receptors in regulation of energy balance. *Current Pharma Des*, 9C:627-641.