



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Psicología

Estudio exploratorio para la validación de un modelo de
anorexia inducida por Protoporfirina de Cobalto

TESIS

Que para obtener el título de:

Licenciado en Psicología

Presenta:

Luis Fernando Rubio Atonal

Directora de Tesis:

Dra. Marisol Orozco Ibarra

Revisor Interno:

Dr. David Natanael Velázquez Martínez

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La elaboración de este trabajo fue bajo la dirección de la Dra. Marisol Orozco Ibarra, Investigadora en Ciencias Médicas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN) de la Secretaría de Salud (SS).

Este trabajo forma parte del proyecto titulado “Validación de un modelo experimental para el estudio de las bases conductuales y moleculares relacionadas con la anorexia nerviosa” (No. de Registro: 32/18), cuya realización fue aprobada tanto por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL-INNN) así como por el Comité de Investigación del INNN.

*A mi madre, Luz María, por estar siempre ahí, alentando mis sueños a donde sea que estos me
lleven.*

A mi padre, Orlando, por siempre apoyarme en mis objetivos e impulsarme a continuar.

A la Dra. Marisol Orozco, por su confianza, apoyo y guía durante el desarrollo de este proyecto.

*A la M. en C. Norma Serrano, por sus consejos, su compañía y guía durante el desarrollo de este
proyecto.*

A mis sinodales por sus contribuciones y sugerencias a este trabajo.

Tabla de contenido

Lista de abreviaturas	1
Resumen.....	2
Introducción y antecedentes.....	3
Anorexia Nerviosa.....	3
Criterios diagnósticos.....	4
Epidemiología.....	5
Tratamiento	6
Pronóstico.....	7
Bases neurobiológicas de la anorexia nerviosa.....	7
Neurobiología del balance energético	7
Neurobiología de la anorexia nerviosa	14
Modelos animales para el estudio de la anorexia nerviosa	17
Modelos genéticos para el estudio de la anorexia nerviosa	18
Modelos ambientales para el estudio de la anorexia nerviosa	20
Necesidad de un nuevo modelo de anorexia nerviosa	23
Protoporfirina de cobalto.....	24
Efecto en la ingesta de alimentos.....	25
Mecanismos de acción.....	26
Hipótesis	28
Objetivo.....	28
General.....	28
Específicos	28
Materiales y métodos	29

Animales	29
Diseño experimental	29
Cuantificación del peso corporal, ingesta de alimentos y consumo de agua	32
Citología vaginal.....	32
Campo abierto	33
Exploración Luz-Oscuridad	34
Colgado del alambre.....	35
Procedimiento de condicionamiento aversivo al sabor y prueba de preferencia a la sacarina.....	36
Obtención de cerebro fijado	37
Preparación de cortes coronales del cerebro	38
Tinción de Nissl.....	38
Análisis estadístico.....	40
Resultados	41
La CoPP imitó el patrón de la anorexia nerviosa en cuanto a la ingesta de alimentos y el peso corporal	41
La CoPP no generó cambios en el ciclo estral de las ratas.....	43
La CoPP no incrementó la presencia de conductas similares a ansiedad ni induce hiperactividad	44
La CoPP no generó cambios en las poblaciones celulares del NAcc	46
Discusión.....	48
Conclusión	55
Referencias.....	56
Anexos	75

Lista de abreviaturas

AgRP	Proteína relacionada a agouti
ARC	Núcleo arqueado
CoPP	Protoporfirina de cobalto
CTRL	Grupo control
DMN	Núcleo dorsomedial hipotalámico
DVC	Complejo dorsal-vagal
LHA	Área lateral hipotalámica
LiCl	Cloruro de litio
NAcc	Núcleo accumbens
NPY	Neuropéptido Y
PBN	Núcleo parabraquial
POMC	Proopiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular hipotalámico
VMN	Núcleo ventromedial hipotalámico
VTA	Área tegmental ventral

Resumen

El estudio de la anorexia nerviosa es complejo debido a que se ha mostrado que diferentes factores participan en su patogénesis. En la actualidad existen algunos modelos animales que permiten el estudio de esta patología, sin embargo, estos modelos presentan características que dificultan su accesibilidad dado su alto costo, dificultad en la generación de un proceso de restricción de la ingesta o bien, presentan limitaciones en cuanto la capacidad del modelo para imitar características similares a la enfermedad. Ante esta situación, el objetivo de este trabajo es validar la viabilidad del uso de protoporfirina de cobalto (CoPP) inyectada de forma sistémica como un modelo de anorexia nerviosa en ratas hembra. Se trabajó con 30 ratas de la cepa Wistar entre 180-200 g de peso. El protocolo inició con una línea base de 4 días para evaluar diariamente la ingesta de alimentos, el consumo de agua y el peso corporal de las ratas. Posterior a la línea base se formó un grupo control y un grupo experimental que fueron administrados vía subcutánea con vehículo o CoPP. Cinco días después se realizaron pruebas conductuales para evaluar la presencia de conductas tipo ansiedad e hiperactividad. De manera adicional, se ocuparon 18 ratas para una prueba de preferencia a la sacarina que evaluar si la disminución en la ingesta de alimento se debe a un mecanismo de aversión condicionada. Encontramos que la CoPP reduce de manera significativa la ingesta de alimento y el peso corporal, pero no afecta el consumo de agua. Las pruebas conductuales muestran que después de la administración de CoPP, no se incrementa la presencia de conductas tipo ansiedad ni se induce hiperactividad en las ratas; mientras que los conteos celulares no muestran cambios en diferentes tipos celulares del núcleo accumbens. Estos resultados muestran que la CoPP disminuye significativamente la ingesta de alimentos y del peso corporal, sin embargo, no imita otras características relevantes de la anorexia nerviosa, por lo que el potencial de la protoporfirina de cobalto para generar un modelo animal de anorexia nerviosa es limitado.

Palabras clave: Anorexia nerviosa, protoporfirina de cobalto, ingesta de alimento, modelo animal, ansiedad, actividad locomotora.

Introducción y antecedentes

Anorexia Nerviosa

La anorexia nerviosa se caracteriza por la restricción voluntaria de la ingesta calórica y una consecuente pérdida de peso, un miedo patológico al aumento de peso y una distorsión en la percepción corporal de la persona que la padece, resultando en una disminución del peso (American Psychiatric Association, 2013; Zipfel, Giel, Bulik, Hay & Schmidt, 2015).

El Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales V (DSM-V) clasifica a la anorexia nerviosa en los siguientes subtipos (American Psychiatric Association, 2013):

- a) Restrictiva: Pérdida de peso lograda a través de dietas, ayunos y/o ejercicio excesivo. Durante los últimos tres meses, la persona no ha incurrido en episodios de atracones o conducta purgativa (vómito autoinducido, abuso de laxantes, diuréticos o enemas).
- b) Por atracones/Purgativa: La persona, en los últimos tres meses, ha incurrido en episodios de atracones o conducta purgativa.

La mezcla entre los diferentes subtipos no es rara, por lo que éstos deben usarse solamente para poder describir los síntomas actuales de la enfermedad (American Psychiatric Association, 2013).

Los síntomas son persistentes a pesar de los cambios: el miedo a la ganancia de peso o a ser gordo continúa a pesar de que el peso disminuya o se mantenga y lo mismo ocurre con la percepción de su forma corporal, las personas que padecen anorexia nerviosa perciben que su cuerpo tiene sobrepeso, o en algunos casos, son sólo partes de su cuerpo que son demasiado gordas (American Psychiatric Association, 2013; Zipfel et al., 2015).

Todos los casos presentan comportamientos persistentes que interfieren con la ganancia de peso (American Psychiatric Association, 2013) como por ejemplo, el consumo de laxantes, la restricción alimenticia o la realización excesiva de ejercicio.

Criterios diagnósticos

Los criterios diagnósticos específicos mencionados en el DSM-V (American Psychiatric Association, 2013) son los siguientes:

- a) Restricción de la ingesta energética con relación a sus requerimientos calóricos que lleva a un bajo peso corporal (considerando su edad, sexo, desarrollo y salud física).
- b) Miedo intenso de ganar peso o volverse gordo.
- c) Comportamientos persistentes que interfieren con la ganancia de peso a pesar de tener ya un peso bajo.
- d) Alteración en la experiencia personal del peso corporal.
- e) Influencia del peso y forma corporal en la autoevaluación.
- f) Falta de reconocimiento de un peso bajo.

De manera importante, la anorexia nerviosa presenta comorbilidad con otros trastornos psiquiátricos: 75 % de los pacientes reporta al menos un trastorno del ánimo (comúnmente depresión mayor), entre 25 % y el 75 % de los pacientes reportan un trastorno de ansiedad y entre el 15 % y 29 % de los pacientes presentan trastorno obsesivo-compulsivo (Zipfel et al., 2015).

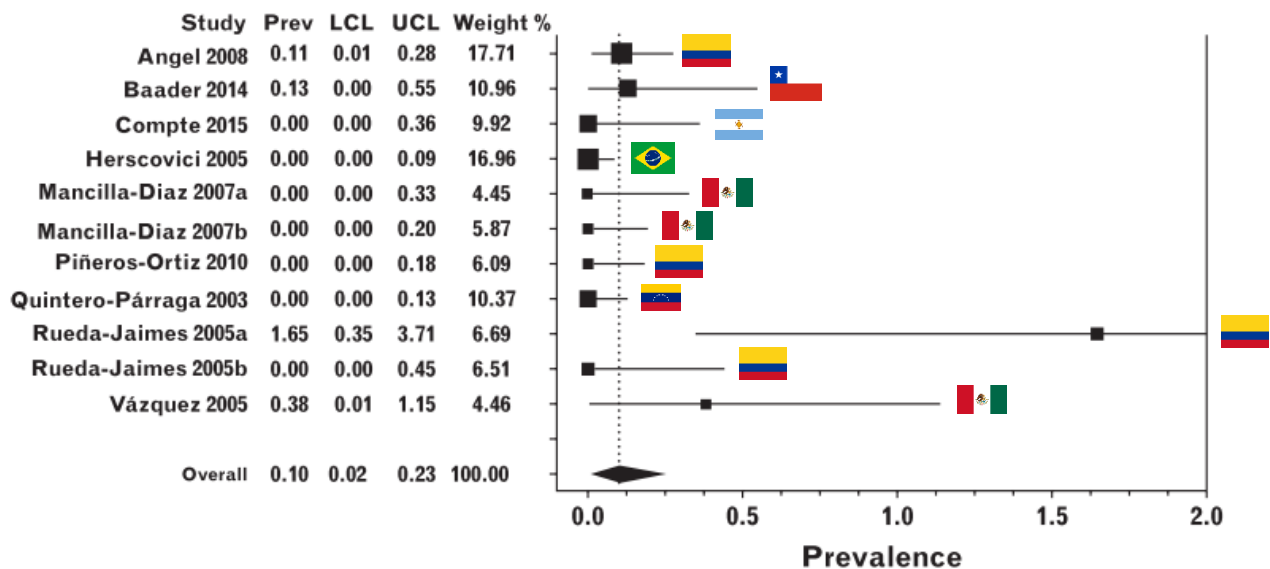
La restricción del consumo de alimentos y el incremento en la actividad física lleva a un índice de masa corporal bajo (American Psychiatric Association, 2013) así como un cambio en el tipo de alimento consumido: los pacientes disminuyen el consumo de grasas y

lo compensan con un incremento en el consumo de proteínas así como un menor consumo de minerales, elementos traza y vitaminas (Chiurazzi et al., 2017).

Epidemiología

La anorexia nerviosa es una condición que se presenta principalmente en mujeres, particularmente adolescentes y adultos jóvenes (Kolar, Mejía, Mebarak & Hoek, 2016; Mancilla-Díaz et al., 2007; Zipfel et al., 2015).

Estudios recientes estiman que la prevalencia de este trastorno en México es alrededor de 0.5 % (Benjet, Méndez, Borges & Medina-Mora, 2012) mientras que para la región de América Latina es de aproximadamente 0.1 % (Kolar et al., 2016), como lo muestra la Gráfica 1. Otras investigaciones relacionadas con la presencia de síntomas asociados a la anorexia nerviosa y otros trastornos de conducta alimentaria muestran que dichos síntomas se han incrementado en la población adolescente mexicana en los últimos años (Unikel-Santoncini, Bojórquez-Chapela, Villatoro-Velázquez, Fleiz-Bautista & Medina-Mora Icaza, 2006).



Gráfica 1. Diagrama de bosque que muestra los resultados de un metaanálisis que reporta la media de prevalencia puntual de diferentes estudios reportadas en América Latina para la anorexia nerviosa. Abreviaciones: Prev, prevalencia; LCL, intervalo de confianza inferior; UCL, intervalo de confianza superior. (Kolar et al., 2016)

Tratamiento

Los tratamientos existentes para la anorexia nerviosa son poco efectivos: si el paciente no es atendido en los primeros tres años a partir del inicio del trastorno, es difícil lograr una recuperación completa (Zipfel et al., 2015). La falta de efectividad en el tratamiento es posible resultado del limitado conocimiento de los diversos mecanismos que originan esta patología (Cuesto, Everaerts, León & Acebes, 2017; Zipfel et al., 2015).

Otro elemento que dificulta la recuperación es que gran parte de las personas afectadas no van a tratamiento. En el caso de países como Finlandia, que llevan registros detallados sobre los pacientes diagnosticados con anorexia, muestran que alrededor del 50 % de las personas con anorexia nerviosa no asiste, y, del 50 % que sí se presenta, sólo 40 % de las personas tratadas logra una recuperación completa (Zipfel et al., 2015). En el caso particular de México, existen reportes de que alrededor de un 17.3 % de las personas que padecen anorexia nerviosa han recibido tratamiento en los últimos doce meses posterior al diagnóstico de la enfermedad (Benjet et al., 2012), resaltando también la falta de acceso a instituciones de salud mental.

De manera breve, el procedimiento de recuperación para la anorexia nerviosa es una combinación entre cuidados médico-nutricionales para recuperar el peso perdido y terapia psicológica (Zipfel et al., 2015). Llama la atención que no existe tratamiento farmacológico alguno que cuente con evidencia suficiente para ser utilizado en esta enfermedad (Treasure, Claudino & Zucker, 2010; Zipfel et al., 2015), aunque se llegan a administrar fármacos para mejorar algunas comorbilidades de la anorexia, en particular, los síntomas depresivos (Foldi, Milton, & Oldfield, 2017).

Dentro de las terapias psicológicas con mayor evidencia de su efectividad encontramos a las terapias basadas en la familia (Treasure et al., 2010; Zipfel et al., 2015). Este tratamiento está enfocado en involucrar a la familia del paciente como un facilitador en la recuperación del peso corporal, a través de la exploración de las creencias y conductas de la familia para poder modificar la conducta de ingesta del paciente (Agras et al., 2014; Lock, 2015). Las terapias basadas en la familia están recomendados como intervención en

la población adolescente, pero presentan una tasa de remisión de alrededor de 33 % (Agras et al., 2014), y no existe evidencia sólida de su efectividad en adultos (Lock, 2015; Treasure et al., 2010; Zipfel et al., 2015). Por otro lado, la evidencia sobre la efectividad de otros tratamientos existentes para la anorexia nerviosa es escasa debido a dificultades en la realización de investigación clínica, ya que es difícil reclutar a pacientes, y los pocos reclutados suelen desistir de la terapia (Treasure et al., 2010).

Pronóstico

El pronóstico una vez diagnosticada la enfermedad es muy diverso: hay pacientes que tienen una recuperación completa después de un solo episodio, otros presentan un patrón de recuperación de peso para luego recaer y algunos otros, pasan por un curso crónico por muchos años (American Psychiatric Association, 2013). Sin tratamiento, la anorexia nerviosa es uno de los trastornos psiquiátricos con mayor tasa de mortalidad: alrededor del 2 % en adolescentes y alrededor del 5 % en adultos a nivel mundial (Zipfel et al., 2015).

Bases neurobiológicas de la anorexia nerviosa

Neurobiología del balance energético

La homeostasis energética es un proceso a través del cual el organismo iguala el gasto con el consumo energético a largo plazo (Morton, Meek & Schwartz, 2014; Smith & Ferguson, 2008), y es justo a través del control de la ingesta de alimentos y otros mecanismos como la termogénesis, que los organismos logran el balance energético (Harrold, Dovey, Blundell & Halford, 2012; Morton et al., 2014).

La regulación del balance energético se realiza en el sistema nervioso central, sin embargo, requiere de coordinación con diferentes órganos y tejidos que proveen información del estado nutricional y energético del organismo (Harrold et al., 2012). De manera general, las regiones del sistema nervioso que mantienen el balance energético tienen acceso a hormonas y otros factores circulantes que proveen información sobre la experiencia sensorial de la ingesta de alimentos (visión, olfato, gusto, somatosensorial), la

composición de los alimentos ingeridos y sobre la utilización de los nutrientes (absorción, metabolismo o almacenamiento) (Harrold et al., 2012; Morton et al., 2014).

En el sistema nervioso central existen varias regiones que están directamente involucradas en la regulación del balance energético a través de la ingesta de alimento y el gasto energético (Harrold et al., 2012). Estas regiones pueden agruparse en tres grandes circuitos: los circuitos autonómicos, los circuitos de recompensa y los circuitos ejecutivos (Caron & Richard, 2017). El circuito autonómico detecta el estado nutricional y energético del organismo regulando la ingesta homeostática de alimento; los circuitos de recompensa establecen las propiedades hedónicas (“que tanto nos gustan”) y de saliencia motivacional (“que tanto lo deseamos/queremos/anhelamos”) de la comida, y finalmente; las regiones ejecutivas están asociadas a la toma de la decisión de incurrir en la ingesta de alimento (Caron & Richard, 2017). Los diferentes circuitos están conectados entre sí e interactúan de forma constante para regular el balance energético (Caron & Richard, 2017; Harrold et al., 2012; Rossi & Stuber, 2017). En la Figura 1 se esquematizan las principales regiones cerebrales asociadas a la regulación del balance energético agrupadas en los tres circuitos que regulan el balance energético.

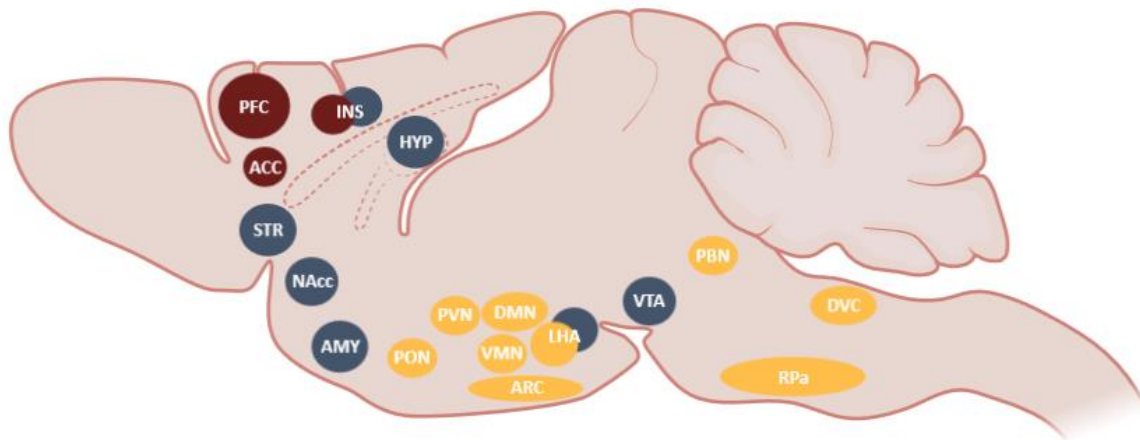


Figura 1. Principales estructuras asociadas a la regulación del balance energético. Las estructuras autonómicas (amarillo) incluyen al área preóptica (PON), los núcleos paraventricular (PVN), dorsomedial (DMN), ventromedial (VMN) y arqueado (ARC) del hipotálamo, así como el área lateral hipotalámica (LHA), el núcleo parabraquial (PBN), el núcleo del rafe pálido y el complejo dorsal-vagal (DVC). Los circuitos de recompensa (azul) comprenden el área ventral tegmental (VTA), el área lateral hipotalámica (LHA), la amígdala (AMY), el núcleo accumbens (NAcc), el estriado (STR), el hipocampo (HYP) y la ínsula (INS). Las estructuras ejecutivas (rojo) incluyen a la corteza prefrontal (PFC), la corteza anterior cingulada (ACC) y la ínsula (INS). Modificada de Caron y Richard (2017).

Los circuitos ejecutivos conformados por la corteza prefrontal y la ínsula tienen un papel importante en la conducta de ingesta, ya que determinan el inicio de la conducta de ingesta así como de la cantidad y el tipo de alimentos a ingerir (Berthoud, 2007; Caron & Richard, 2017; Richard, 2015). Alteraciones en los circuitos ejecutivos causan un comportamiento impulsivo, y existe asociación de estos comportamientos con trastornos como la anorexia nerviosa y otros trastornos alimenticios (Titova, Hjorth, Schiöth & Brooks, 2013; Val-Laillet et al., 2015) o bien, enfermedades como la obesidad (Caron & Richard, 2017; Richard, 2015). Sin embargo, los mecanismos a través de los cuáles las regiones ejecutivas influyen sobre el balance energético no se conocen en su totalidad (Rossi & Stuber, 2017), aunque sí se sabe que estas regiones reciben aferencias y proyectan hacia los diferentes núcleos hipotalámicos que se encargan de regular la ingesta homeostática así como a regiones motoras para iniciar la conducta de ingesta (Berthoud, 2007). De hecho, los circuitos ejecutivos y de recompensa tienen la capacidad de anular la regulación homeostática del balance energético (Berthoud, 2007; Rossi & Stuber, 2017), y pueden ser modulados por la actividades de factores de saciedad periféricos (Andermann & Lowell, 2017).

Los circuitos de recompensa conformados por el núcleo accumbens (NAcc), estriado, ínsula, amígdala, área ventral tegmental y el área lateral hipotalámica establecen los valores motivacionales y hedónicos de estímulos y conductas asociadas al balance energético (Berthoud, 2007; Rossi & Stuber, 2017).

El NAcc resulta relevante en este circuito ya que procesa ambos aspectos (motivacional y hedónico) de la ingesta. La saliencia motivacional está ligada a la vía mesolímbica de la dopamina, que tiene origen en el área tegmental ventral y proyecta directo al NAcc, y de ahí, a diversos núcleos hipotalámicos y a la corteza prefrontal (Cuesto et al., 2017). Existe evidencia abundante del rol del circuito de recompensa en el control del balance energético:

- a) En modelos animales, la destrucción de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral resulta en déficit en la ingesta de alimento, alteraciones motoras, anhedonia y dificultad en el aprendizaje (Rossi & Stuber, 2017).
- b) La comida palatable promueve la ingesta de alimentos al incrementar la liberación de dopamina en el estriado a través de la estimulación del área tegmental ventral (Andermann & Lowell, 2017; Avena & Bocarsly, 2012; Caron & Richard, 2017; Rossi & Stuber, 2017).
- c) Personas con obesidad y personas que sufren de trastornos alimenticios muestran alteraciones en el sistema dopaminérgico (Avena & Bocarsly, 2012; Rossi & Stuber, 2017).
- d) Finalmente, manipulaciones del sistema dopaminérgico permiten modelar algunas características de trastornos alimenticios como el trastorno por atracones, la bulimia o la anorexia nerviosa (Avena & Bocarsly, 2012).

Por otro lado, el aspecto hedónico parece estar mediado por neurotransmisión opioide y endocannabinoide en un punto específico del NAcc (Berridge, 2009). La activación de los receptores opioides μ incrementan la palatabilidad (valor hedónico) de los alimentos, ocurriendo algo similar con la estimulación de los receptores cannabinoides CB1 (Berridge, 2009).

De manera interesante, el NAcc tiene conexiones recíprocas con el hipocampo, la amígdala y otras áreas corticales que tienen un papel en el aprendizaje y la emoción (Caron & Richard, 2017; Rossi & Stuber, 2017), convirtiéndolo en un sitio donde convergen los circuitos ejecutivos, de recompensa y autonómicos.

Los circuitos autonómicos que regulan el balance energético tienen una interacción recíproca con los circuitos ejecutivos de recompensa, de tal manera que uno puede anular la acción del otro (Caron & Richard, 2017; Harrold et al., 2012; Rossi & Stuber, 2017). Estos circuitos tienen acceso a las diferentes señales periféricas que proveen información del estado nutricional y energético del organismo (Harrold et al., 2012). Estos circuitos

incluyen a una gran cantidad de núcleos hipotalámicos como el área preóptica, el núcleo paraventricular (PVN), el núcleo ventromedial (VMN), el núcleo dorsomedial (DMN), el núcleo arqueado (ARC) y el área lateral hipotalámica (LHA), así como regiones del tronco encefálico como el complejo vagal-dorsal, el núcleo del rafé pálido y el núcleo parabraquial (Caron & Richard, 2017; Harrold et al., 2012; Simerly, 2015; Smith & Ferguson, 2008).

El ARC es uno de los principales núcleos involucrados en el balance energético. Este núcleo presenta dos poblaciones diferentes de neuronas: una subpoblación que expresa y libera los neuropéptidos orexigénicos neuropéptido Y (NPY), proteína relacionada a agouti (AgRP) y ácido γ -aminobutírico (GABA); y otra subpoblación que expresa y libera los neuropéptidos anorexigénicos hormona estimulante de los melanocitos alfa (α -MSH) que es derivada de la proopiomelanocortina (POMC) o la transcripción regulada por cocaína y amfetamina (CART) (Harrold et al., 2012; Morton et al., 2014; Parker & Bloom, 2012; Rogge, Jones, Hubert, Lin & Kuhar, 2008; Smith & Ferguson, 2008). Las neuronas AgRP estimulan la ingesta de alimentos, ya que liberan tanto NPY (promueve la ingesta de alimentos al actuar sobre los receptores Y_2 y Y_5) como AgRP (promueve la ingesta al antagonizar los receptores de melanocortinas MC3R y MC4R) (Harrold et al., 2012; Parker & Bloom, 2012). Por otro lado, las neuronas POMC liberan α -MSH que disminuye la ingesta de alimentos al actuar sobre los receptores MC3R y MC4R así como el neuropéptido CART, que actúa sobre un receptor hasta la fecha desconocido (Harrold et al., 2012; Parker & Bloom, 2012; Rogge et al., 2008).

Estas poblaciones neuronales también son sensibles a una gran variedad de señales provenientes de la periferia que regulan su actividad favoreciendo o disminuyendo la ingesta de alimentos (Parker & Bloom, 2012). Estas señales periféricas actúan a corto plazo o a largo plazo. Las señales a corto plazo, conocidas también como señales fásicas, se dividen en dos grandes grupos:

1. Señales de saciedad: Péptidos y hormonas provenientes del tracto gastrointestinal generadas de forma proporcional ante la ingesta de alimento como la colecistocinina, el péptido similar a glucagón 1, el péptido YY o la

amilina (Chaudhri, Salem, Murphy & Bloom, 2008; Sam, Troke, Tan & Bewick, 2012; Woods & D'Alessio, 2008).

2. Señales anticipatorias de la ingesta de alimento (señales de hambre): Hormonas como la grelina, así como información proveniente de los órganos sensoriales como el olfato y la visión (Chaudhri et al., 2008; Harrold et al., 2012; Woods & D'Alessio, 2008).

Por otro lado, las señales de largo plazo, también conocidas como tónicas, derivan de los almacenes energéticos en el tejido adiposo y hepático, como la leptina, la insulina y el glucagón (Chaudhri et al., 2008; Harrold et al., 2012; Smith & Ferguson, 2008; Valassi, Scacchi & Cavagnini, 2008). De hecho, las poblaciones neuronales en el ARC presentan a su vez subconjuntos que expresan diferentes receptores de manera específica ante los péptidos y hormonas previamente mencionados así como otros neurotransmisores que modulan la ingesta de alimento, como por ejemplo: la serotonina (5-HT), el glutamato (GLUT) o GABA (Morton et al., 2014). Esto muestra la complejidad de la regulación del balance energético (Caron & Richard, 2017).

De igual manera, el ARC proyecta a varios núcleos hipotalámicos, de los cuales destaca el núcleo paraventricular, el cual es responsable de la actividad neuroendocrina asociada a la ingesta de alimentos a través de la activación del eje hipotálamo-hipófisis (Caron & Richard, 2017; Smith & Ferguson, 2008). Este núcleo integra la información proveniente de varias vías neuronales, entre ellas, las de las neuronas AgRP, POMC y las neuronas productoras de orexina en el área lateral hipotalámica (Simerly, 2015; Smith & Ferguson, 2008). El ARC también tiene comunicación recíproca con el complejo dorsal-vagal, una región en el tronco encefálico que se encarga de sensar y enviar información hacia el hipotálamo de diferentes señales periféricas provenientes tanto del tracto gastrointestinal como de factores circulantes (Fry & Ferguson, 2007; Sisó, Jeffrey & González, 2010). De esta manera, el complejo dorsal-vagal modula la actividad de los diversos núcleos hipotalámicos, favoreciendo o inhibiendo la respuesta de las diferentes

poblaciones de neuronas hipotalámicas (Caron & Richard, 2017; Harrold et al., 2012; Morton et al., 2014; Simerly, 2015; Smith & Ferguson, 2008).

En este punto es necesario mencionar que la gran mayoría de los estudios están centrados en la actividad neuronal, pero estudios recientes muestran que existe evidencia creciente del rol que las células gliales tienen en la regulación del balance energético y la ingesta de alimentos tanto en condiciones fisiológicas (Chowen et al., 2016; Frago & Chowen, 2017; Freire-Regatillo, Argente-Arízón, Argente, García-Segura & Chowen, 2017; Yang, Qi & Yang, 2015) como patológicas (Baufeld, Osterloh, Prokop, Miller & Heppner, 2016; Douglass, Dorfman, Fasnacht, Shaffer & Thaler, 2017; Ferris et al., 2017; García-Cáceres, Yi & Tschöp, 2013; Kwon et al., 2017). No obstante, no se conocen ni los mecanismos moleculares por los cuales las células gliales pueden modular el balance energético ni el papel que juega cada tipo glial en su regulación.

Otros núcleos hipotalámicos que también reciben proyecciones del ARC son: el núcleo ventromedial, que parece estar asociado con la promoción de gasto energético a través de la termogénesis del tejido adiposo pardo así como un papel en la ingesta de alimentos, ya que la destrucción de este núcleo induce un incremento en la ingesta de alimentos así como del peso corporal (Caron & Richard, 2017; Smith & Ferguson, 2008); el área lateral hipotalámica, que integra la información proveniente del circuito homeostático con el de recompensa resultando en la regulación del comportamiento motivado orientado hacia la ingesta de alimento (Rossi & Stuber, 2017) y el núcleo dorsomedial, que parece estar asociado a los aspectos circadianos de la ingesta de alimentos, dada la alta cantidad de fibras provenientes del núcleo supraquiasmático (Smith & Ferguson, 2008).

La figura 2 muestra como, en su conjunto, la actividad e interacciones de los tres circuitos (autonómico, de recompensa y ejecutivo) con las señales periféricas provenientes del tejido adiposo y del tracto gastrointestinal regulan el balance energético a través de la ingesta de alimento.

Existe amplia evidencia del papel del sistema de recompensa en la anorexia nerviosa. Anatómicamente, regiones del circuito de recompensa tienen proyecciones recíprocas hacia el hipotálamo, en particular, entre el núcleo accumbens y el área lateral hipotalámica (Caron & Richard, 2017; Harrold et al., 2012; Simerly, 2015). Mediante un metaanálisis, se encontró que pacientes con anorexia nerviosa presentan una disminución significativa de materia gris en el hipotálamo, el lóbulo parietal inferior izquierdo, el núcleo lentiforme izquierdo y el núcleo caudado izquierdo, siendo regiones asociadas a procesos somatosensoriales y de recompensa (Titova et al., 2013). De manera interesante, en este estudio no se detectaron alteraciones en el núcleo accumbens, clave en el sistema de recompensa (Titova et al., 2013). Otros estudios reportaron una disminución en los niveles de dopamina en el líquido cerebroespinal (Frank & Kaye, 2012), una mayor responsividad del circuito de recompensa ante estímulos alimenticios en pacientes con anorexia (Frank et al., 2012) y un incremento en la respuesta del NAcc ante la recompensa (Bischoff-Grethe et al., 2013). Existen también estudios sobre alteraciones morfológicas en la anorexia nerviosa (Titova et al., 2013), aunque han sido cuestionados por estudios más recientes con resultados contradictorios (Amianto et al., 2013; Broft et al., 2015). Sin embargo, de forma general, la participación del circuito de recompensa en la anorexia nerviosa está establecido ya que parece existir una sensibilización de la respuesta de la vía mesolímbica (Avena & Bocarsly, 2012; Frank & Kaye, 2012; Frank et al., 2012; Fuglset, Landrø, Reas & Rø, 2016; Kaye, 2008; Tasneem, 2018).

Por otro lado, la propuesta que considera a la anorexia nerviosa como un hábito empieza a aportar evidencia (Tasneem, 2018). Estudios recientes muestran que el estriado dorsal (compuesto por los núcleos basales) y la corteza prefrontal dorsolateral tienen un papel importante en la persistencia de los pacientes con anorexia en consumir comida con bajo contenido de grasa (Foerde, Steinglass, Shohamy & Walsh, 2015; Foerde, Steinglass, Walsh, Shohamy & Kostro, 2014; Steinglass & Walsh, 2016). Otros estudios muestran disminuciones significativas en el núcleo caudado (Titova et al., 2013) en pacientes con anorexia así como anomalías hipermetabólicas en el núcleo caudado (Delvenne, Goldman, De Maertelaer & Lotstra, 1999; Delvenne et al., 1996; Herholz et al., 1987).

Es importante mencionar que ambas propuestas no son mutuamente excluyentes. La propuesta que considera a la anorexia como un hábito argumenta que la alteración en los circuitos de recompensa son claves en facilitar el establecimiento de las conductas de restricción alimenticia, hiperactividad, purgativas y ansiosas, pero que posteriormente, estas se automatizan y su control pasa de la corteza a los ganglios basales (Steinglass & Walsh, 2016). Otro punto que recalcar es que ambas propuestas no contemplan a través de qué mecanismos estas regiones inhiben la ingesta de alimento. La literatura existente propone que es posible que los aferentes glutamatérgicos provenientes de la corteza prefrontal influyeran la actividad del núcleo accumbens (Foldi et al., 2017; Foldi, Milton & Oldfield, 2017), núcleo que a su vez, podría modificar la actividad del área lateral hipotalámica y del resto del circuito autonómico (Ross, Mandelblat-Cerf & Verstegen, 2016; Scheurink et al., 2010), inhibiendo así la ingesta de alimento, pero, a pesar de estos avances, las vías y mecanismos moleculares que median las interacciones entre el núcleo accumbens y el circuito autonómico siguen siendo poco claras.

Estudios recientes también comienzan a proponer que es posible que las células gliales se vean afectadas en la anorexia nerviosa en modelos animales, ya que se ha observado una disminución en el número de células astrocíticas en corteza cerebral, cuerpo calloso e hipocampo (Frintrop et al., 2017; Lindfors et al., 2011; Nilsson et al., 2011; Reyes-Haro, Labrada-Moncada, Miledi & Martínez-Torres, 2015; Reyes-Haro et al., 2016). Sin embargo, no está muy claro si esto ocurre en seres humanos, ya que el único estudio realizado hasta ahora no parece encontrar alteraciones en el marcador para daño cerebral S100 β (proteína expresada principalmente en los astrocitos en el cerebro) en suero (Ehrlich et al., 2008). Ante esta situación, es necesaria más investigación en cuanto al papel de las células gliales en la anorexia nerviosa en seres humanos y si también se encuentran afectadas en otros trastornos alimenticios.

Una vez que se ha explicado qué es la anorexia nerviosa, cuáles son sus principales características, cómo se trata y cuáles son las bases neurobiológicas de este trastorno alimenticio, podemos entender la dificultad para estudiarlo. Dado que no se conocen en su totalidad las vías y mecanismos moleculares relacionadas a la anorexia nerviosa, ni se tiene

en claro el papel de las células gliales en esta patología y que el tratamiento psicológico más efectivo en este trastorno alimenticio tiene una eficacia de alrededor del 33 %, queda clara la necesidad de contar con herramientas experimentales que permitan profundizar el estudio de este padecimiento. Ante esta situación, se han propuesto diferentes modelos animales para entender a esta enfermedad. A continuación, ahondaremos en los modelos animales que permiten el estudio de la anorexia nerviosa.

Modelos animales para el estudio de la anorexia nerviosa

En el reino animal no existe reporte alguno de la presencia de una patología similar a la anorexia nerviosa, ya que ningún animal se priva voluntariamente de alimento hasta la muerte (Mrosofsky & Sherry, 1980; Siegfried, Berry, Hao & Avraham, 2003). Sin embargo, existen ejemplos de privación voluntaria temporal de alimento, en particular, en periodos asociados a la conducta reproductiva, migraciones, muda de piel e hibernación (Mrosofsky & Sherry, 1980). De manera interesante, estos tipos de anorexia que los animales muestran en ocasiones particulares, parecen tener un valor adaptativo (Mrosofsky & Sherry, 1980).

Sin embargo, las anorexias animales no comparten las características psiquiátricas de la anorexia nerviosa, como, por ejemplo, la distorsión de la imagen corporal o la preocupación por el peso (Smith, 1989). Aunado a lo anterior, el estudio de este trastorno de la ingesta es complejo debido a que diferentes factores participan en su patogénesis: genéticos, sociales y ambientales (Siegfried et al., 2003; Zipfel et al., 2015). La complejidad en la patogénesis de la anorexia nerviosa resulta en modelos animales alejados de buscar la causa de la anorexia nerviosa y que más bien, están enfocados en imitar las principales características de la patología humana (Siegfried et al., 2003), estudiando tanto las consecuencias como los mecanismos asociados a la disminución de la ingesta de alimento. Dentro de las principales características a imitar, podemos enumerar las siguientes:

1. Inicio en edad adolescente.
2. Predominancia en mujeres/hembras.

3. Decremento en la ingesta de alimento.
4. Disminución del peso corporal.
5. Incremento en la actividad física (locomotora).
6. Aumento en las conductas tipo ansiedad.
7. Función neuroendocrina alterada.
8. Alteración en el ciclo menstrual.

En cuanto a los modelos existentes para el estudio de esta patología, podemos agruparlos en dos grandes categorías: primeramente, los modelos genéticos (ratones knock-out para el gen *anx*), y en segundo lugar, los modelos ambientales (anorexia inducida por deshidratación o anorexia inducida por actividad) (Siegfried et al., 2003).

Modelos genéticos para el estudio de la anorexia nerviosa

Se han realizado importantes avances en cuanto a la genética de la regulación del balance energético y de la ingesta de alimentos. Llama la atención la identificación de diversas mutaciones que resultan en un fenotipo obeso, sin embargo, existen pocas mutaciones que den como resultado un fenotipo anoréxico. Existen algunos argumentos que explican esta brecha entre ambos extremos de la regulación del balance energético. Algunos investigadores sugieren que un fenotipo anoréxico, incluso uno mínimamente anoréxico es una limitante en la supervivencia de cualquier organismo ante la existencia de periodos donde el alimento es abundante y periodos en los que el alimento escasea, de tal manera que durante periodos de abundancia, el organismo no se alimenta ni almacena la suficiente energía para poder sobrevivir en los periodos de escasez de alimentos (Mrosovsky & Sherry, 1980; Siegfried et al., 2003). Esta situación derivó en el desarrollo de mecanismos redundantes que facilitan la ingesta de alimentos calóricos y el almacenamiento de esta energía en lugar de mecanismos que disminuyan la ingesta de alimentos y favorezcan el gasto energético, por lo que la afectación de un solo gen

difícilmente repercutiría en estas vías redundantes (Mrosovsky & Sherry, 1980; Siegfried et al., 2003; Smith, 1989) y, en consecuencia, la dificultad en la generación de un modelo genético de la anorexia nerviosa.

Considerando estas dificultades, podemos encontrar algunos modelos genéticos utilizados para el estudio de la anorexia nerviosa. Dentro de los modelos genéticos ligados a un fenotipo anoréxico tenemos al modelo *anx/anx* que es generado por una mutación espontánea y, por otro lado, modelos inducidos a través del knock-out de algún gen en específico, por ejemplo, de la tirosina hidroxilasa, el receptor muscarínico M₃, la hormona concentradora de melatonina o el receptor cannabinoide CB1. Sin embargo, la mayoría de los modelos animales inducidos por knock-out presentan un alto costo en su adquisición y mantenimiento, y no logran imitar la privación de alimento de forma directa (Siegfried et al., 2003). Nos centraremos en el modelo *anx/anx* ya que es uno de los modelos más utilizados para el estudio de la anorexia nerviosa.

anx/anx

La mutación espontánea *anx* es una mutación autosómica recesiva letal de una región de 0.2cM localizada en el cromosoma 2, entre los marcadores D2Mit133 and Jojo5 (Nilsson, 2019). Los estudios de secuenciación de esta región no han arrojado una secuencia alterada común al fenotipo *anx/anx* (Nilsson, 2019). Los animales que presentan esta mutación se caracterizan por su peso bajo, disminución en la ingesta de alimentos, emaciación, tendencia a tener una temperatura central más baja, mecer la cabeza de izquierda a derecha de forma repetitiva, temores corporales, marcha descoordinada e hiperactividad previa al destete (Maltais, Lane & Beamer, 1984). Este fenotipo se vuelve aparente alrededor de los cinco u ocho días posteriores al nacimiento y aparece en alrededor del 64 % de la camada proveniente de portadores de la mutación (Maltais et al., 1984). De manera interesante, no existen estudios que evalúen la presencia de conductas asociadas a depresión y ansiedad en este modelo de anorexia.

En los ratones donde se presenta el fenotipo anoréxico, la mutación conduce a la muerte del roedor alrededor del día veintidós posterior al nacimiento (Maltais et al., 1984),

aunque en algunos casos, se ha reportado un tiempo de vida cercano a las cinco semanas (Nilsson, 2019).

Sin embargo, el modelo *anx/anx* tiene importantes limitaciones en el estudio de la anorexia nerviosa. Una de las limitantes más relevantes es la temporalidad del fenómeno, ya que el fenotipo anoréxico se presenta a edades tempranas en los animales mutantes, a diferencia de la enfermedad, en donde el inicio ocurre durante la adolescencia y adultez temprana; de hecho, este modelo es más utilizado para estudiar los efectos de la privación de la ingesta de alimentos a edades tempranas así como del síndrome de emaciación en niños (Broberger, Johansen, Schalling & Hökfelt, 1997; Jahng, Haupt, Kim, Joh & Son, 1998) y no para el estudio de la anorexia nerviosa. Otra de las limitaciones de este modelo está asociada al costo. Por un lado, los laboratorios tienen que invertir en la compra de una o más camadas de la variante para poder reproducir a los animales que no presentan el fenotipo pero sí portan la mutación y posteriormente proseguir con su utilización en estudios experimentales; por el otro, el bioterio tiene que contar con los aditamentos adecuados para mantener a la variante, como, por ejemplo, comida especial para los animales, condiciones de luz o temperatura especiales, entre otras, lo que dificulta el uso de este modelo en laboratorios e instituciones que no cuentan con los recursos materiales y financieros suficientes para adquirir y sostener a la población de animales.

Modelos ambientales para el estudio de la anorexia nerviosa

Entre los modelos ambientales más utilizados, encontramos a los modelos basados en estrés, en actividad física y aquéllos basados en la restricción alimentaria.

Modelos de estrés

Los modelos de anorexia basados en estrés implican la aplicación de estímulos aversivos, como por ejemplo, electroshocks pareados con un estímulo auditivo, dolor crónico, picar fuertemente la cola del roedor, estimulación cerebral (eléctrica, farmacológica), lesiones electrolíticas, o bien, la inmovilización de los roedores (Pare, 1965; Shimizu, Oomura & Kai, 1989; Siegfried et al., 2003). Sin embargo, el uso de algunos de estos

estímulos aversivos generan dolor, riesgo de infección e incluso la muerte, lo cual tiene implicaciones éticas que limitan su aplicación (Siegfried et al., 2003).

Por otro lado, diversos estudios han reportados que la intensidad de la aversión en la aplicación de estímulos aversivos es muy importante en estos modelos. Roedores sometidos a estrés leve (a través de estímulos levemente aversivos) muestran un incremento en la ingesta de alimentos pero cuando el estímulo es altamente aversivo, se observa una reducción en la ingesta de alimento (Pare, 1965; Shimizu et al., 1989; Siegfried et al., 2003; Van Leeuwen, Bonne, Avraham & Berry, 1997). Este efecto dual del estrés en la ingesta de alimentos complica el establecimiento de un modelo de anorexia inducida por estrés.

A pesar de las limitantes anteriormente mencionadas, uno de los modelos de estrés más reconocidos, es el de anorexia inducida por separación, que logra imitar varios de los aspectos de la patología en seres humanos (Zgheib et al., 2014). Este modelo implica mantener a ratones alojados dentro de una caja grande, que, a su vez, se encontrará dividida por separaciones de plexiglás donde se colocará de forma individual a cada ratón y se le dará acceso a la comida durante 1 hora (Van Leeuwen et al., 1997). Los ratones se mantienen separados entre sí la mayoría del tiempo, excepto durante la hora asignada a la alimentación, donde se remueven estas separaciones y se les permite convivir con sus compañeros (Van Leeuwen et al., 1997). Estas condiciones generan una disminución de la ingesta de alimento (65 % del requerimiento diario) y el peso corporal, pero no genera un incremento en la actividad locomotora del roedor (Van Leeuwen et al., 1997). Si bien, la implementación de este modelo es bastante sencilla a comparación de otros y no necesita alguna intrusión física (Van Leeuwen et al., 1997; Zgheib et al., 2014), no imita algunas de las principales características de la anorexia, como, por ejemplo, el incremento en la actividad locomotora y se desconoce su efecto en cuanto a alteraciones endócrinas y la presencia de conductas tipo ansiedad o de conductas asociadas a la depresión. Otro elemento que dificulta la diferenciación de efectos es precisamente el componente de estrés crónico inducido por la separación.

Anorexia inducida por actividad

El modelo de anorexia inducida por actividad es el estándar de oro en cuanto a los modelos animales de anorexia se refiere (Frintrop et al., 2018; Milton, Oldfield & Foldi, 2018). Este modelo implica el acceso ilimitado a una rueda de ejercicio más acceso limitado a la comida de alrededor de 60 a 90 minutos al día durante el inicio de la fase oscura del ciclo luz-oscuridad (Frintrop et al., 2018; Milton et al., 2018). Esta combinación da como resultado una disminución voluntaria de la ingesta de alimento, pérdida de peso severa, ejercicio excesivo, mayor vulnerabilidad en hembras, presencia de alteraciones en el ciclo estral (o bien, amenorrea) y la severidad de la condición es mayor en la adolescencia que en otras fases del ciclo de vida de la rata (Carrera, Fraga, Pellón & Gutiérrez, 2014; Chowdhury, Chen & Aoki, 2015; Foldi et al., 2017; Frintrop et al., 2017, 2018; Milton et al., 2018; Siegfried et al., 2003).

Este modelo logra imitar gran parte de las principales características de la anorexia como la privación de alimento, la disminución en el peso corporal, el incremento en la actividad locomotora, el aumento en las conductas tipo ansiedad e incluso el hecho de que ratas hembras son más sensibles a verse afectadas que las ratas macho (Carrera et al., 2014; Chowdhury et al., 2015; Milton et al., 2018; Siegfried et al., 2003). Sin embargo, estudios recientes han encontrado que existe heterogeneidad en cuanto a la susceptibilidad ante la pérdida de peso utilizando este modelo (Milton et al., 2018). Otra de las limitaciones de este modelo es que los efectos observados en este modelo corresponden a una alteración aguda y no a largo plazo, como ocurre en la anorexia nerviosa; no obstante, estudios recientes muestran que con ligeras modificaciones, este modelo puede utilizarse de manera crónica (Frintrop et al., 2018). Por otro lado, este modelo presenta una alta tasa de mortalidad, donde el 50 % de los animales muere a los diez días (Van Leeuwen et al., 1997), lo cual también impone consideraciones éticas en cuanto a su aplicación.

Restricción alimenticia

En este modelo, el investigador manipula directamente la cantidad de alimento consumida por los animales (Siegfried et al., 2003), restringiéndolo hasta lograr el nivel de

consumo de alimentos y peso corporal deseado. Esto es una de las críticas a este modelo, ya que no imita la restricción voluntaria de alimento. A pesar de esta importante crítica, la restricción alimenticia imita otras características de la anorexia nerviosa como las alteraciones neuroendocrinas encontradas en los pacientes con anorexia (Siegfried et al., 2003). De manera interesante, dependiendo de la magnitud de la restricción alimenticia, y en particular, dependiendo del porcentaje de calorías restringidas, se generan efectos diferentes. Con una restricción entre el 20 % y el 60 % de las calorías con una proporción adecuada de nutrientes para evitar la malnutrición, se observa un incremento en la longevidad de los animales así como el retraso en la aparición de diferentes enfermedades (Masoro, 1988). Por otro lado, restricciones calóricas mayores al 60 % o bien, con una deficiente proporción de nutrientes, se generan importantes afectaciones cerebrales (Morgane et al., 1993; Naik, Patro, Seth & Patro, 2017; Paz, Valente, Tasca, de Mattos & Pureur, 1991). Por lo tanto, en este modelo es necesario un cuidado constante de la cantidad de alimento proporcionado, así como de los nutrimentos que este contiene, lo que dificulta su uso como modelo de anorexia nerviosa.

Necesidad de un nuevo modelo de anorexia nerviosa

Como bien se mencionó previamente, estos modelos presentan características que dificultan su accesibilidad dado su alto costo (ratones knock-out), o bien, sea complicada la generación de un proceso de restricción de la ingesta (anorexia inducida por separación) o han recibido críticas en cuanto la capacidad del modelo para imitar características similares a la enfermedad (ratones knock-out, anorexia inducida por deshidratación, anorexia inducida por separación). Ante esta situación, la opción más apropiada sería el modelo de anorexia inducida por actividad. Este modelo es el más ampliamente utilizado para estudiar esta patología (Frintrop et al., 2018; Milton et al., 2018), ya que refleja características conductuales similares a la anorexia nerviosa: privación voluntaria de la ingesta de alimento, ejercicio excesivo, hiperactividad y presencia de conductas ansiosas (Chowdhury et al., 2015; Frintrop et al., 2018), sin embargo, no queda exento de limitaciones.

Dadas las razones anteriores, queda clara la necesidad de contar con otro modelo de anorexia, que sea más accesible y que se encuentre validado a nivel conductual y neurobiológico para su uso por aquéllos interesados en estudiar esta patología.

Protoporfirina de cobalto

La protoporfirina de cobalto (CoPP) es un análogo sintético del grupo hemo (Galbraith & Jellinck, 1989) compuesto por cuatro anillos tetrapirrólicos que se diferencia del mismo por contener en su centro un átomo de cobalto en lugar de uno de hierro y forma parte de la familia de las porfirinas, compuestos orgánicos con capacidad de funcionar como acarreadores de electrones y catalizadores de reacciones redox (Thunell, 2000).

La CoPP produce una disminución sostenida y significativa del citocromo P-450 hepático, inhibe la enzima de tasa limitante para la biosíntesis del grupo hemo (sintasa del ácido aminolevulínico), reduce la producción de estrógenos catecol, reduce los niveles de testosterona, tiroxina, triyodotironina y hormona luteinizante en suero, disminución en el peso corporal y en la ingesta de alimentos (Drummond & Kappas, 1982; Galbraith & Jellinck, 1987; Galbraith & Kappas, 1989; Galbraith & Krey, 1989; Smith, Drummond & Kappas, 1986).

Este compuesto es también inductor de la hemooxigenasa-1 (HO-1), enzima limitante encargada de la degradación del grupo hemo (Orozco-Ibarra & Pedraza-Chaverri, 2010; Thunell, 2000). La sobrerregulación de la HO-1 tiene un efecto neuroprotector, sin embargo, en condiciones fisiológicas, la expresión de esta enzima es baja y limitada a algunas poblaciones neuronales en el cerebro (Orozco-Ibarra & Pedraza-Chaverri, 2010).

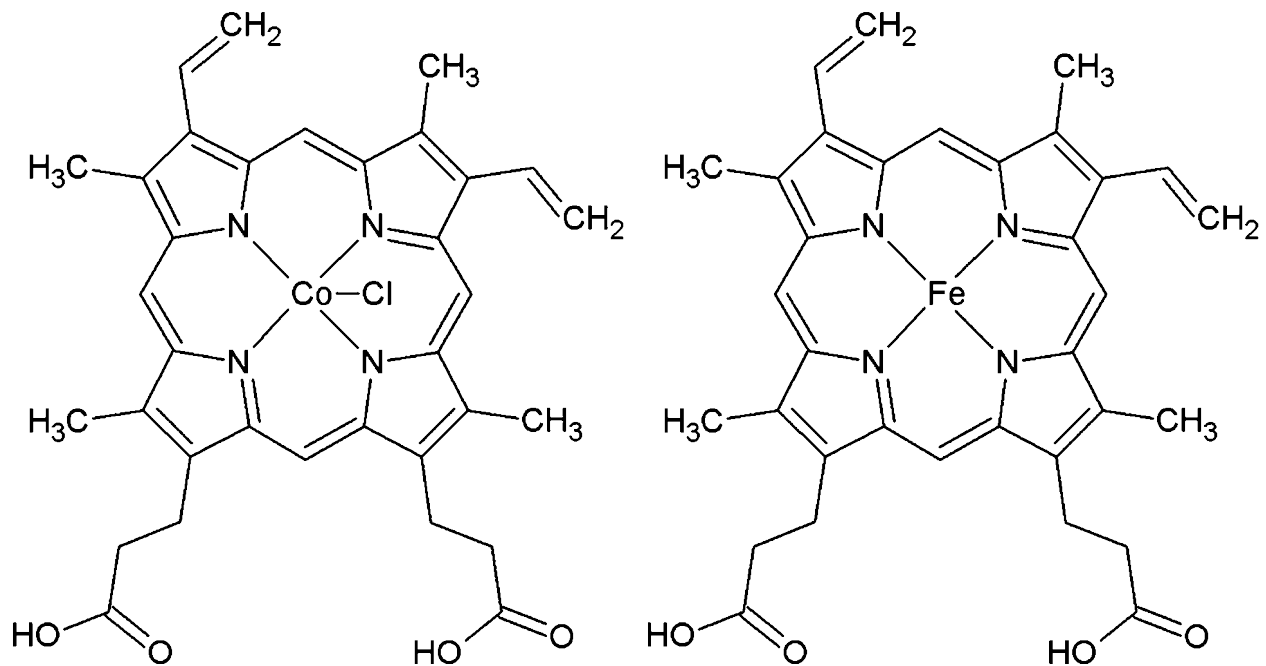


Figura 3. Estructura de la CoPP y el grupo hemo. Del lado izquierdo observamos la estructura de la protoporfirina de cobalto en su forma comercial (cloruro de protoporfirina de cobalto) y del lado derecho observamos la estructura del grupo hemo. Podemos notar la gran similitud en su estructura, a excepción de que la CoPP posee un átomo de cobalto en su centro a diferencia del grupo hemo con un átomo de hierro.

Seleccionamos a la CoPP como una molécula que pudiera modelar la anorexia nerviosa debido al efecto que este compuesto ha mostrado en la ingesta de alimentos así como que los efectos de este compuesto sobre el peso corporal y las alteraciones endócrinas parecen ser independientes uno del otro (Galbraith, Drummond, Krey & Kappas, 1987).

Efecto en la ingesta de alimentos

Estudios previos muestran que este compuesto genera una disminución de alimento de hasta el 60 % en los primeros cinco días posteriores a la administración de este compuesto y una disminución de alrededor del 20 % del peso corporal (Galbraith & Kappas, 1989, 1991b). Estudios previos también realizados por los mismos autores y algunos otros (Galbraith, Chua & Kappas, 1992; Galbraith, Furukawa & Li, 2006; Galbraith, Hodgdon, Grimm & Vizzard, 2004; Galbraith & Jellinck, 1989; Galbraith & Kappas, 1991b; Li, Vizzard, Jaworski & Galbraith, 2006; Turner, Corp & Galbraith, 1994) muestran que el efecto de este compuesto puede ocurrir en roedores (rata y ratón en diferentes cepas), perros, pollos y

otras especies, utilizando, inclusive, diferentes vías de administración (subcutánea, intracerebroventricular e intraperitoneal).

Reportes previos en la literatura sugieren que la CoPP tiene dos fases en su actuación: una primera fase aguda caracterizada por una disminución dramática en el peso e ingesta, seguida de una segunda fase prolongada donde a pesar de que la ingesta de alimentos se recupera, el peso se mantiene debajo de lo esperado para la edad y sexo del animal (Galbraith & Kappas, 1989). El establecimiento de dos fases de actuación sugiere que existen dos mecanismos diferentes que median los efectos conductuales de la CoPP: por un lado, un mecanismo central asociado a la disminución de la ingesta de alimentos; y por el otro, un mecanismo tanto a nivel central como periférico relacionado a la disminución del peso corporal a largo plazo (Galbraith & Kappas, 1989).

De manera interesante, posterior a la inyección del compuesto no se observaron cambios en la morfología de las células hipotalámicas (Galbraith & Kappas, 1991b) y hasta la fecha, el mecanismo de acción específico de este compuesto es desconocido (Galbraith et al., 2006, 2004; Galbraith & Kappas, 1989, 1991b), aunque se sugiere que podría tener dos mecanismos de acción.

Mecanismos de acción

Estudios previos sugieren que el mecanismo de acción de la CoPP se debe a una acción indirecta en regulación de las concentraciones de creatina en el hipotálamo, ya que se ha visto que la administración de CoPP induce una mayor transcripción del gen del transportador de creatina así como una disminución en la cantidad de creatina y fosfocreatina tanto en el hipotálamo como en otras regiones extrahipotalámicas (Galbraith et al., 2006). Estos resultados sugieren que la depleción de creatina ocurre a través de un mecanismo independiente del transportador de creatina (Galbraith et al., 2006) y que justo esta depleción podría alterar los niveles de ATP y AMP en la célula, y en consecuencia, la proporción ATP/AMP, la cual regula la actividad de la AMP cinasa, una enzima que sirve como sensor de los niveles de energía (Galbraith et al., 2006; Hardie & Ashford, 2014;

Morton, Cummings, Baskin, Barsh & Schwartz, 2006); sin embargo, esta hipótesis sobre la depleción de creatina no ha sido corroborada.

Otro estudio del mismo grupo de investigación muestra que, en hipotálamo, la CoPP tiene un efecto directo en la actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS), donde la CoPP induce una disminución de alrededor del 20 % de la actividad de la NOS en conjunto con un incremento del mRNA de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y de la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS), pero, al medir la cantidad de proteína, sólo detectan un incremento en la cantidad de nNOS y no en la iNOS (Li et al., 2006). Los autores sugieren que la NOS tiene un papel en la ingesta de alimentos, ya que inhibidores de la NOS disminuyen la ingesta de alimentos y peso corporal (Li et al., 2006), por lo que la disminución en la actividad de la NOS inducida por la CoPP podría explicar la hipofagia y disminución de peso que se presenta posterior a la administración de este compuesto. Sin embargo, tampoco se conoce el mecanismo de regulación a través del cual la CoPP inhibe la actividad de la NOS.

Hipótesis

La administración subcutánea de CoPP reproducirá las principales características del trastorno de anorexia nerviosa del tipo restrictivo: disminución en la ingesta de alimentos, disminución en el peso corporal, alteración en el ciclo estral, hiperactividad, conductas similares a ansiedad y una disminución en el número de células astrogliales.

Objetivo

General

- Validar la viabilidad del uso de CoPP inyectada en ratas Wistar hembra de forma sistémica como un modelo de anorexia nervosa.

Específicos

- Cuantificar el peso corporal, el consumo de agua, la ingesta de alimentos y verificar si ocurre la alteración del ciclo estral, como resultado de la administración de CoPP en ratas Wistar hembra.
- Determinar la presencia de hiperactividad y conductas similares a ansiedad de forma posterior a la administración de CoPP realizando pruebas conductuales de exploración luz-oscuridad y campo abierto.
- Analizar los cambios en la densidad de diferentes tipos celulares: neuronas, microglia, astrocitos y oligodendrocitos en el NAcc, usando la tinción de Nissl posterior a la administración de CoPP.

Materiales y métodos

Animales

Utilizamos ratas hembra de la cepa Wistar con una edad de entre 7 a 9 semanas y con un peso entre 180 g a 200 g, las cuales fueron proporcionadas por el Departamento de Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Las ratas se mantuvieron en cajas individuales bajo condiciones ambientales controladas con agua y alimento ad libitum. El manejo de los animales se apegó a lo establecido por la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”.

Diseño experimental

Se trabajó con 30 ratas en un protocolo con una duración de diez días en total. El protocolo consistió en una primera fase de cuatro días, en los cuáles, se cuantificó la ingesta de alimentos, el consumo de agua y el peso corporal cada 24 horas, así como la evaluación de la fase del ciclo estral cada 48 horas. Al cuarto día, los animales se dividieron en dos grupos: un grupo control que se inyectó vía subcutánea con vehículo (solución salina, 2 ml/kg, s.c., n=15) y un grupo experimental que se inyectó con CoPP (25 μ mol/kg, s.c., 102601-60-5, Frontier Scientific; Logan, USA, n=15). Esta inyección dio inicio a la segunda fase del protocolo, en la que se continuó con la cuantificación de la ingesta de alimento, el consumo de agua, y el peso corporal, así como con la evaluación de la fase del ciclo estral por cinco días. Se escogió una ventana de cinco días para evaluar el efecto de la CoPP posterior a su administración para evitar perder el efecto de la CoPP en las ratas. Esto debido a que estudios previos muestran que el efecto de la CoPP en ratas macho se mantiene entre cinco y diez días (Galbraith & Kappas, 1989, 1991b), y, el único reporte previo donde se utilizan ratas hembra se menciona de manera anecdótica que el efecto de la CoPP en ratas hembras parece ser menor (Galbraith & Kappas, 1991a).

Al noveno día, previo al inicio de la fase lumínica del ciclo circadiano de las ratas, se llevaron a cabo las siguientes pruebas conductuales: prueba de campo abierto, test de

exploración luz/oscuridad y finalmente, la prueba de colgado del alambre. Las primeras dos pruebas se usaron para evaluar la presencia de conductas tipo ansiedad en los animales; mientras que la prueba de colgado del alambre sirvió como control positivo ante debilitamiento muscular posiblemente causado por la por la anorexia. La prueba de campo abierto también permitió la evaluación de la actividad locomotora, la cual posibilitó determinar la presencia de hiperactividad en las ratas así como de control positivo en las pruebas de ansiedad, ya que incrementos en la actividad locomotora pueden afectar los resultados de las pruebas de ansiedad (Buccafusco, 2009; Chaouloff, Durand & Mormède, 1997). Específicamente, se contabilizó la conducta de rearing, también conocida como exploración erguida como un indicador de la actividad locomotora general (Buccafusco, 2009; Kelley, 1993). Una vez terminadas las pruebas conductuales, los animales se privaron de alimento por un periodo de 24 horas, y se procedió a recuperar el encéfalo fijado, el cual se procesó para obtener cortes coronales correspondientes a la región del NAcc. Los cortes se sometieron a la tinción histológica de Nissl.

En resumen, en cada una de las fases se realizaron las siguientes actividades:

Fase 1:

1. Evaluación de ingesta de alimento, consumo de agua y peso corporal cada 24 hrs para generar una línea base.
2. Determinación del ciclo estral cada 48 hrs para generar una línea base.

Fase 2:

1. Administración de CoPP o solución vehículo a los animales para formar dos grupos experimentales (CTRL y CoPP).
2. Evaluación de ingesta de alimento, consumo de agua y peso corporal cada 24 hrs para detectar cambios en estas variables.

3. Determinación del ciclo estral cada 48 hrs para detectar alteraciones en el ciclo estral.
4. Realización de pruebas conductuales de campo abierto, exploración luz-oscuridad y colgado del alambre para determinar la presencia de conductas similares a ansiedad e hiperactividad.
5. 24 horas de privación de alimento.
6. Sacrificio y obtención de muestras para realizar tinción de Nissl.

En la Figura 4 se ilustra de forma general el diseño experimental del proyecto.

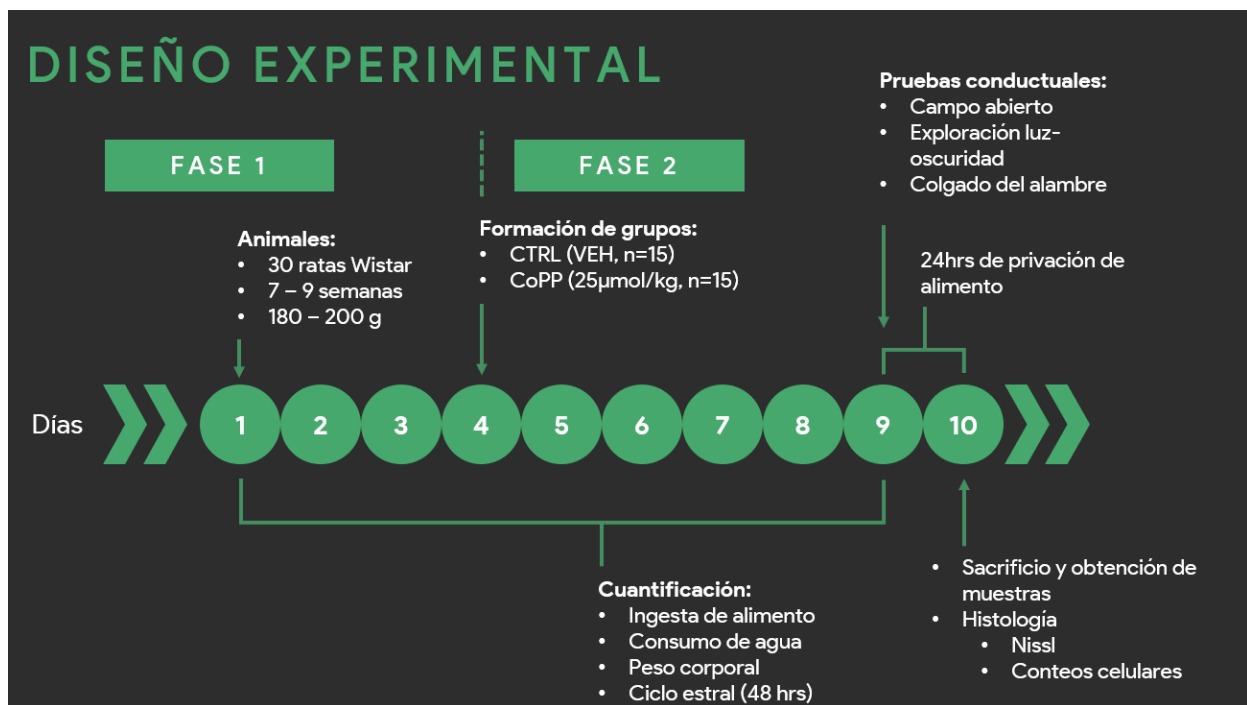


Figura 4. Diseño experimental del proyecto. Consta de dos fases: una línea base (Fase 1) y una fase experimental (Fase 2) donde los animales son administrados con vehículo (CTRL) o protoporfirina de cobalto (CoPP). Al noveno día, realizamos las pruebas conductuales de campo abierto, exploración luz-oscuridad y de colgado del alambre. Terminadas las pruebas los animales tuvieron veinticuatro horas de privación de alimento para finalmente ser sacrificados y recuperar los tejidos para realizar histología.

Ante la posibilidad de que la disminución en la ingesta de alimentos fuera causada por un proceso de aversión condicionada al sabor, usamos 18 ratas de manera adicional para evaluar la presencia de aversión condicionada al sabor a través de una prueba de preferencia a la sacarina.

Cuantificación del peso corporal, ingesta de alimentos y consumo de agua

Las mediciones se realizaron cada 24 horas, en un periodo comprendido entre las 10:00 AM y 12:00 PM del día, entre el segundo y décimo día del protocolo, excepto en el caso del peso corporal, el cual se midió desde el primer día del protocolo hasta el décimo día. Para la medición del peso corporal, cada rata se colocó en un contenedor cuyo peso se descontó previamente en una balanza digital marca Tefal (BC15000S6; Rumilly, Francia).

Para la cuantificación del consumo de alimento, las ratas se alojaron en forma individual en cajas de acrílico, a las cuales se les colocaron 200 g de alimento el día de recepción de los animales, y, una vez pasadas 24 horas, el alimento restante se pesó en la báscula. La ingesta del día previo se calculó a partir de la diferencia entre la cantidad inicial y la cantidad de alimento recuperado a las 24 h. Una vez el alimento restante había sido pesado, el alimento se reajustó a 200 g para la medición del día siguiente.

En el caso del consumo de agua, el procedimiento fue similar a la cuantificación de la ingesta de alimentos: se colocaron 300 ml de agua en la botella de cada animal, midiéndose con una probeta el agua restante 24 horas después. La cantidad de agua consumida se calculó como la diferencia entre el agua colocada inicialmente con el agua recuperada 24 h después. Una vez realizado este cálculo, se reajustó la cantidad de agua a 300 ml para una nueva medición.

Citología vaginal

La citología vaginal se realizó cada 48 horas en un frotis vaginal para determinar la presencia de alteraciones del ciclo estral, comunes en pacientes con anorexia nerviosa (American Psychiatric Association, 2013). Para esto, se introdujo un hisopo previamente humedecido en solución salina fisiológica en el orificio vaginal de la rata. Una vez dentro, el hisopo se rotó y se desplazó de arriba hacia abajo una sola vez para inmediatamente ser retirado. A continuación, el hisopo se colocó sobre un portaobjetos, rotándolo dos veces y de costado sobre el portaobjetos para depositar la muestra colectada.

Una vez realizado el frotis, se tiñó con una gota de solución de azul de metileno al 0.5 % (M9140, Sigma-Aldrich; Missouri, USA) y se le colocó un cubreobjetos. Finalmente, las muestras se analizaron en un microscopio óptico UNICO MD-250 LED (UNICO; Nueva Jersey, USA) a 10x y 40x, y, de acuerdo al tipo de células presentes en frotis (nucleadas, anucleadas, linfocitos) se definió la fase del ciclo estral de la rata (proestro, estro, metaestro y diestro) de acuerdo a descripciones previas (Byers, Wiles, Dunn & Taft, 2012; Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, s/f; Marcondes, Bianchi & Tanno, 2005).

Campo abierto

La prueba de campo abierto consistió en ingresar a una rata en el centro de una arena iluminada con luz blanca y de color negro (56x56x37 cm) donde un cuadro central permitió identificar la diferencia entre la zona central y la zona lateral. Una vez en el centro, la rata exploró libremente la arena durante cinco minutos (Buccafusco, 2009). Una vez finalizados, se retiró a la rata. Las sesiones fueron videograbadas con una cámara Nikon D3200 (Nikon Corporation; Tokio, Japón).

Para el análisis de esta prueba, se cuantificó el tiempo que cada rata permanece en el centro de la arena (Buccafusco, 2009) así como la frecuencia de ocurrencia de la conducta de exploración erguida durante los cinco minutos de duración de la prueba de campo abierto (Fornai et al., 2005). La definición operacional del tiempo en el centro fue la siguiente: el tiempo que la rata permanece en la sección central de la arena. El conteo inició cuando el cuerpo completo de la rata (sin contar la cola) se encontró dentro del recuadro central y permaneció dentro por más de tres segundos, a partir de los cuáles comenzó el conteo. El conteo terminó cuando el cuerpo completo de la rata (sin contar la cola) estaba en la zona de la periferia por más de tres segundos. En cuanto a la conducta de rearing, ésta se definió como el momento en el que la rata adquiere una posición erguida, elevando su cabeza, manteniendo sus extremidades anteriores en el aire y apoyándose en el suelo con sólo en sus extremidades posteriores. El fin de la conducta de exploración erguida se consideró cuando la rata estuvo apoyada en el piso con sus cuatro extremidades. Estos criterios para contabilizar la conducta se establecieron en todas las pruebas conductuales

realizadas para unificar criterios y facilitar la reproducibilidad de los datos, verificándose que las observaciones realizadas por un evaluador externo al proyecto mostraran una alta correlación con las realizadas por el experimentador (Anexo 1). El registro de la conducta se llevó a cabo de forma manual utilizando la aplicación Countee (Peic & Hernández, 2016).

Exploración Luz-Oscuridad

La prueba de exploración luz-oscuridad consistió en colocar a una rata en una arena de 56x56x37 cm dividida en dos compartimentos: uno de ellos pintado de color blanco e iluminado con luz blanca y el otro pintado de color negro e iluminado con luz roja. Ambos compartimentos estaban conectados a través de una abertura de 7x15 cm. La posición de inicio de cada rata ya fuera en el lado con luz blanca o en el lado con luz roja, se organizó de tal manera que para ambos grupos (tanto CTRL como CoPP) el 50 % de las ratas iniciara en un compartimento de la arena y el otro 50 % de las ratas en el otro, esto dado que en algunas condiciones, la introducción de la rata a un ambiente nuevo puede generar respuestas de miedo, como la inmovilidad (“freezing”) (Buccafusco, 2009; Kelley, 1993). La inmovilidad implica que la rata se mantiene en una posición (Kelley, 1993), sin moverse de ella, lo que podría ser interpretado en esta prueba como mayor tiempo en “x” o “y” compartimento, pero no reflejaría correctamente la presencia de conductas tipo ansiedad, sino una respuesta de miedo. Una vez dentro, la rata exploró la arena libremente durante cinco minutos (Buccafusco, 2009; Chaouloff et al., 1997). Pasados los cinco minutos, se retiró a la rata. Las sesiones fueron videograbadas utilizando una cámara Nikon D3200 (Nikon Corporation; Tokio, Japón). Se evaluaron los siguientes parámetros (Buccafusco, 2009; Chaouloff et al., 1997):

- Número de transiciones entre ambos compartimentos: El momento en el cual la rata (con todo su cuerpo, sin contar la cola) cruzó a través de la abertura que conecta a ambos compartimientos.
- Duración de visita a compartimento con luz blanca: Lapso en el cual las ratas se encontraron en la sección con la luz blanca del laberinto. El conteo inició a partir del momento en el que el cuerpo de la rata (sin contar la cola)

permaneció por más de tres segundos en el compartimento con luz blanca. El conteo terminó cuando el cuerpo completo de la rata (sin contar la cola) permaneció por más de tres segundos en la sección oscura.

- Duración de las conductas de evaluación de riesgo: Lapso en el que rata adquirió una postura extendida y atenta, en la cual la cabeza ingresó a otro compartimento mientras que las extremidades anteriores pudieron ingresar o bien, se mantuvieron al margen del compartimento original; pero el resto del cuerpo permaneció en el compartimento en el que se encontraba previamente.

El registro de la conducta se llevó a cabo de forma manual utilizando la aplicación Countee (Peic & Hernández, 2016).

Colgado del alambre

La prueba de colgado del alambre, también conocida como “Hanging wire test” permitió evaluar la presencia de alteraciones en el funcionamiento muscular de los roedores y sirvió de control positivo ante los efectos de debilitamiento muscular en la anorexia nerviosa asociada a un estado severo de desnutrición (también conocido como emaciación) (Zipfel et al., 2015). La prueba consistió en colocar a la rata sobre la tapa de una caja para roedor y se sacudió brevemente para permitirle al roedor asirse con sus cuatro extremidades a la tapa. Inmediatamente, se invirtió la tapa de la caja y se mantuvo en esa posición hasta que la rata cayó en una caja previamente acojinada (Klein et al., 2012). Si la rata se lograba asir a la tapa por más de dos minutos, se daba por terminada la sesión. Dichas sesiones fueron videograbadas utilizando una cámara Nikon D3200 (Nikon Corporation; Tokio, Japón). Para el análisis de esta prueba se contabilizó la duración del tiempo que la rata se sostuvo de la tapa, iniciado a partir del acto de volteo de la tapa, hasta el momento en que la rata se soltó. El registro de la conducta se llevó a cabo de forma manual utilizando la aplicación Countee (Peic & Hernández, 2016).

Procedimiento de condicionamiento aversivo al sabor y prueba de preferencia a la sacarina

Esta prueba funcionó como un control positivo ante la posibilidad de que la disminución en la ingesta de alimentos fuera causada por un proceso de aversión condicionada al sabor (Nachman, 1970; Yamamoto, Shimura, Sako, Yasoshima & Sakai, 1994). La prueba consistió en una fase de entrenamiento, en la cual las ratas tuvieron un consumo de agua limitado a solamente 20 minutos al día por tres días, y para el cuarto día, el tiempo de acceso al agua se incrementó a una hora (Kalat & Rozin, 1973). El acceso al alimento fue ad libitum durante todo el procedimiento. Al quinto día, se cambió el agua por una solución con sacarina al 0.25 % (1461, Droguería Cosmopolita; Ciudad de México, México) (Nachman, 1970) y les dimos acceso durante dos horas y media a la solución. Media hora después del término del periodo de acceso a la sacarina, las ratas se dividieron en tres grupos que respectivamente fueron administrados con el vehículo, la CoPP o bien, con una solución al 0.15 M de cloruro de litio (2 % del peso corporal, i.p.) (26235, Golden Bell Reactivos; Zapopan, México) (Kalat & Rozin, 1973; Loy & Hall, 2002; Nachman, 1970). En el sexto y séptimo día, el acceso al agua fue ad libitum; mientras que para el octavo y noveno día, los animales se privaron del consumo de agua para inducir el consumo de líquidos necesario para realizar la prueba de preferencia a la sacarina (Kalat & Rozin, 1973). En el décimo día se probó la preferencia a la sacarina, para lo cual se ofreció, de forma simultánea, tanto el agua como la solución con sacarina al 0.25 % durante veinte minutos. Ambas botellas se ajustaron previamente a 100 ml, y al terminar la prueba, se midieron las cantidades de agua y sacarosa restantes en una probeta. La diferencia entre la cantidad ajustada y el restante se consideró como la medida de preferencia. A continuación, la Figura 5 ilustra de manera general, el procedimiento para realizar esta prueba de aversión condicionada.

PRUEBA DE PREFERENCIA A LA SACARINA

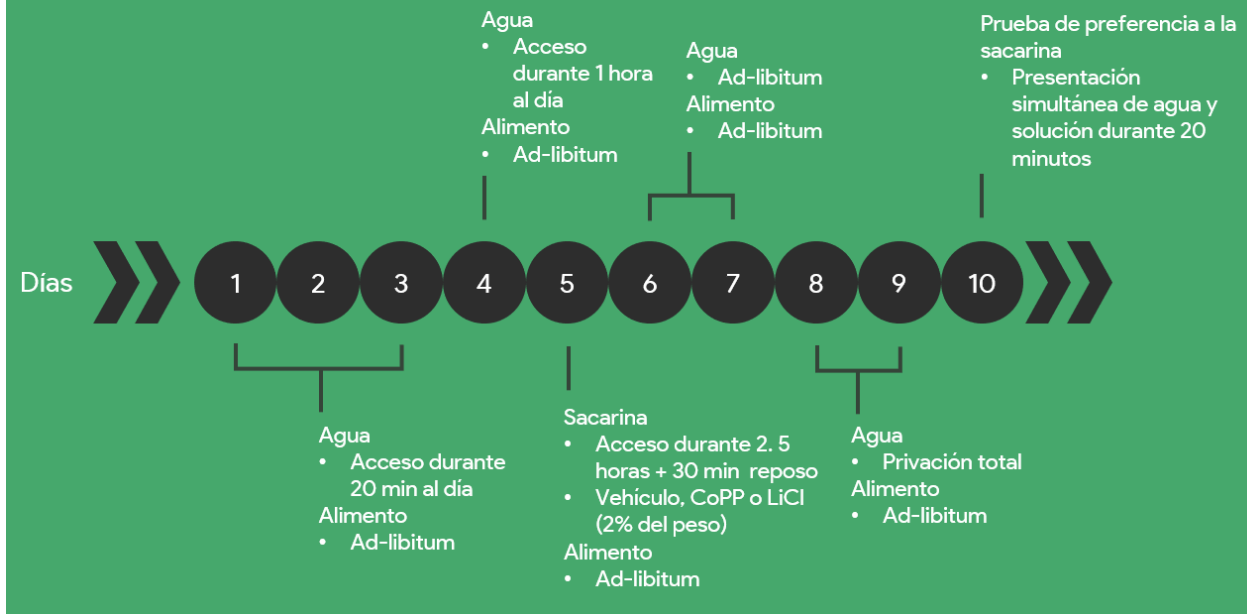


Figura 5. Prueba de preferencia a la sacarina. La prueba de preferencia a la sacarina implica una fase de entrenamiento, donde las ratas aprenden a beber agua de manera inmediata a la colocación de la botella debido al acceso por tiempo limitado. El quinto día apareamos la presentación de la solución con sacarina a la administración del vehículo, CoPP o LiCl. Al décimo día evaluamos la generación de aversión condicionada a través de una prueba de preferencia a la sacarina.

Obtención de cerebro fijado

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg, PiSA Agropecuaria; Atitalaquia, México) y se perfundieron vía intracardiaca. Para esto, se expuso la cavidad torácica de la rata realizando un corte a nivel del diafragma y dos más a cada extremo del diafragma en dirección dorso-rostral. A continuación, se insertó un catéter en el ventrículo izquierdo que proveía de solución salina fisiológica (PiSA Farmacéutica; Tlajomulco de Zúñiga, México) en el ventrículo izquierdo, para servir como solución de lavado. Posteriormente y mediante el mismo catéter se permitió el ingreso de paraformaldehído (30525-89-4, Sigma-Aldrich; Darmstadt, Alemania) al 4% en PBS como solución fijadora del tejido. Una vez que los tejidos de la rata estuviesen bien fijados, se procedió a extraer el cerebro para inmediatamente almacenarlo en paraformaldehído al 4% en PBS para su conservación y posterior uso.

Preparación de cortes coronales del cerebro

Un mes después de obtener el cerebro fijado, éste se deshidrató a través de un tren de alcoholes crecientes (alcohol etílico 70 %, alcohol etílico 80 %, alcohol etílico 96 %, alcohol etílico absoluto y xilol) usando un procesador de tejidos automático Histokinette 2000 (Leica Microsystems GmbH, Alemania). El cerebro deshidratado se incluyó en parafina histológica. Utilizando un micrótopo, se obtuvieron cortes de 4 µm de espesor en el NAcc. Basándonos en un atlas estereotáxico (Paxinos & Watson, 2007), para el NAcc seleccionamos cortes cercanos a la coordenada interaural 11.28 mm, utilizando una clara visualización de la comisura anterior y del cuerpo calloso como elementos para determinar la coordenada adecuada. Al terminar de ubicar las regiones a obtener, los cortes recuperados fueron montados en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina al 0.1 % durante 10 minutos.

Tinción de Nissl

Esta técnica de tinción facilitó la identificación de los diferentes tipos celulares del sistema nervioso de acuerdo a sus características nucleares y posteriormente permitió la cuantificación de cada tipo celular.

La tinción de Nissl comenzó con la deparafinización de los tejidos previamente obtenidos utilizando un tren de alcoholes en concentraciones decrecientes (xilol, alcohol etílico absoluto, alcohol etílico 96 %, alcohol etílico 70 %) hasta llegar a agua destilada. A continuación, los portaobjetos se colocaron en una solución al 1 % con violeta de cresilo (10510-54-0, Sigma-Aldrich; Steinheim, Alemania) durante 5 segundos y al terminar se enjuagaron nuevamente con agua destilada. Se prosiguió con una solución de diferenciación al 0.25 % de ácido acético glacial en alcohol absoluto durante 1 segundo para continuar con la diferenciación en un tren de alcoholes etílicos (alcohol etílico 96 %, alcohol absoluto, xilol). Para finalizar, los tejidos pasaron por xilol y se montaron con PermaMounter (BSB 0097, Bio SB; Santa Bárbara, USA). Una vez montado el tejido, se tomaron fotografías con un

microscopio óptico Eclipse E200 (Nikon Corporation, Tokio, Japón) apoyado con el software de captura Q-Capture Pro-7 (Teledyne QImaging; Surrey, Canadá).

Para el conteo de tipos celulares se escogieron fotografías a 40x de la región de interés. La forma de conteo fue manual apoyados por el software ImageJ, así como por algoritmos de toma de decisión y descripciones previamente publicadas en la literatura (García-Cabezas, John, Barbas, & Zikopoulos, 2016; Hilton & Shivane, 2015; Ling, Paterson, Privat, Mori, & Leblond, 1973) que permitieron clasificar a los núcleos celulares observados de acuerdo a su coloración, tamaño y forma del núcleo como está descrito en la Tabla 1.

Tipo Celular	Núcleo					Pericarión	
	Diámetro medio	Forma usual	Coloración del nucleoplasma	Cromatina	Nucléolo	Cantidad	Coloración
Neurona	Variada	Redondo u ovoide	Débil	Gránulos de heterocromatina que rodean parcial o totalmente al núcleo	Grande	Abundante	Moderado a fuerte
Astrocito	6.3 μm	Oval	Débil	Sigue el contorno del núcleo como un borde fino	Tamaño moderado	Moderado	Débil
Microglia	4.1 μm	Elongada, redonda o angular	Moderado	Manchas que contrastan con el nucleoplasma	No distinguible	Moderado o escaso	Moderado
Oligodendrocito	4.3 - 7 μm	Oval	Fuerte o moderado	Manchas que no contrastan con el nucleoplasma	Moderado a pequeño	Abundante o moderado	Fuerte a muy fuerte

Tabla 1. Características microscópicas típicas de neuronas y células gliales en ratas. Elaborado con información de García-Cabezas et al. (2016) y Ling et al. (1973).

Se consideraron las dos subdivisiones del NAcc, ya que se considera que ambas subdivisiones están relacionadas con el sistema de recompensa (en particular la subdivisión Shell) (Berridge, 2009; O'Hara et al., 2015; Scheurink et al., 2010) y la formación de hábitos

(subdivisión Core) (Broft et al., 2015; Foerde et al., 2015; Steinglass & Walsh, 2016). Las células contabilizadas se encontraban dentro del plano focal y aquellas fuera de él no se contabilizaron. Tampoco se contabilizaron aquellas células que tocaran los bordes de la imagen.

Análisis estadístico

Los datos están expresados como media \pm error estándar de la media (E.E.M.). El análisis de datos se realizó mediante el software estadístico GraphPad Prism 6.01 (GraphPad, San Diego, USA). Primeramente, se verificó que los datos cumplieran el criterio de normalidad para posteriormente, utilizar pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas de acuerdo a la situación. De manera general, las pruebas paramétricas utilizadas fueron: la t de Student para los resultados de la actividad locomotora en el campo abierto, las transiciones luz-oscuridad y las conductas de evaluación de riesgo en la prueba de exploración luz-oscuridad; ANOVA de una vía para contrastar los resultados de la prueba de preferencia a la sacarina en el procedimiento de aversión condicionada; y, ANOVA de dos vías para analizar el consumo de alimento, el consumo de agua y peso corporal. La prueba no paramétrica ocupada fue la U de Mann-Whitney para analizar la duración del colgado en el alambre y el tiempo en la zona central del campo abierto. Las diferencias entre los grupos se consideraron como significativas a partir de valores de $p \leq 0.05$.

Resultados

La CoPP imitó el patrón de la anorexia nerviosa en cuanto a la ingesta de alimentos y el peso corporal

La evaluación diaria de la ingesta de alimentos muestra que, al día posterior a la inyección de la solución, los animales administrados con CoPP presentaron una disminución significativa de la ingesta de alimentos (Figura 6A) a comparación de los controles (CTRL $15.5 \text{ g} \pm 0.9$ vs CoPP $10.8 \text{ g} \pm 1.1$, $p \leq 0.05$), y dicha disminución se mantuvo hasta el último día del registro (CTRL $14.9 \text{ g} \pm 0.9$ vs CoPP $8.8 \text{ g} \pm 0.8$, $p \leq 0.001$). De manera interesante, podemos observar de forma clara, dos fases en la disminución de la ingesta de alimentos. En los primeros dos días observamos una fase aguda caracterizada por una rápida disminución, y posteriormente, una fase de mantenimiento, es decir, donde la ingesta de alimentos se mantiene disminuida pero estable.

En cuanto al peso corporal observamos que, a partir del segundo día posterior a la inyección, los animales administrados con CoPP mostraron una disminución significativa en el peso corporal (Figura 6B) comparados con los controles (CTRL $194.8 \text{ g} \pm 1.7$ vs CoPP $182.3 \text{ g} \pm 2.7$, $p \leq 0.01$). La disminución en el peso corporal de los animales tratados con CoPP continuó hasta el último día de registro (CTRL $195.7 \text{ g} \pm 2.0$ vs CoPP $178.1 \text{ g} \pm 2.9$). A diferencia de la fase de mantenimiento en la disminución del consumo de alimentos, el peso corporal continuó bajando en los últimos días del registro.

Los registros del consumo de agua mostraron que la administración de CoPP no disminuyó el consumo de agua de forma significativa (Figura 6C) a comparación con el grupo control (CTRL $31.7 \text{ ml} \pm 0.6$ vs CoPP $28.1 \text{ ml} \pm 1.1$, n.s.) a excepción del octavo día del protocolo, donde el grupo CoPP presentó una disminución importante del consumo de agua en comparación con el grupo control (CTRL $32.5 \text{ ml} \pm 2.5$ vs CoPP $24.0 \text{ ml} \pm 1.8$, $p \leq 0.05$). Sin embargo, al revisar los efectos principales del ANOVA de medidas repetidas, notamos que el efecto principal del factor tratamiento no fue significativo ($F_{(1, 28)} = 2.979$, n.s.).

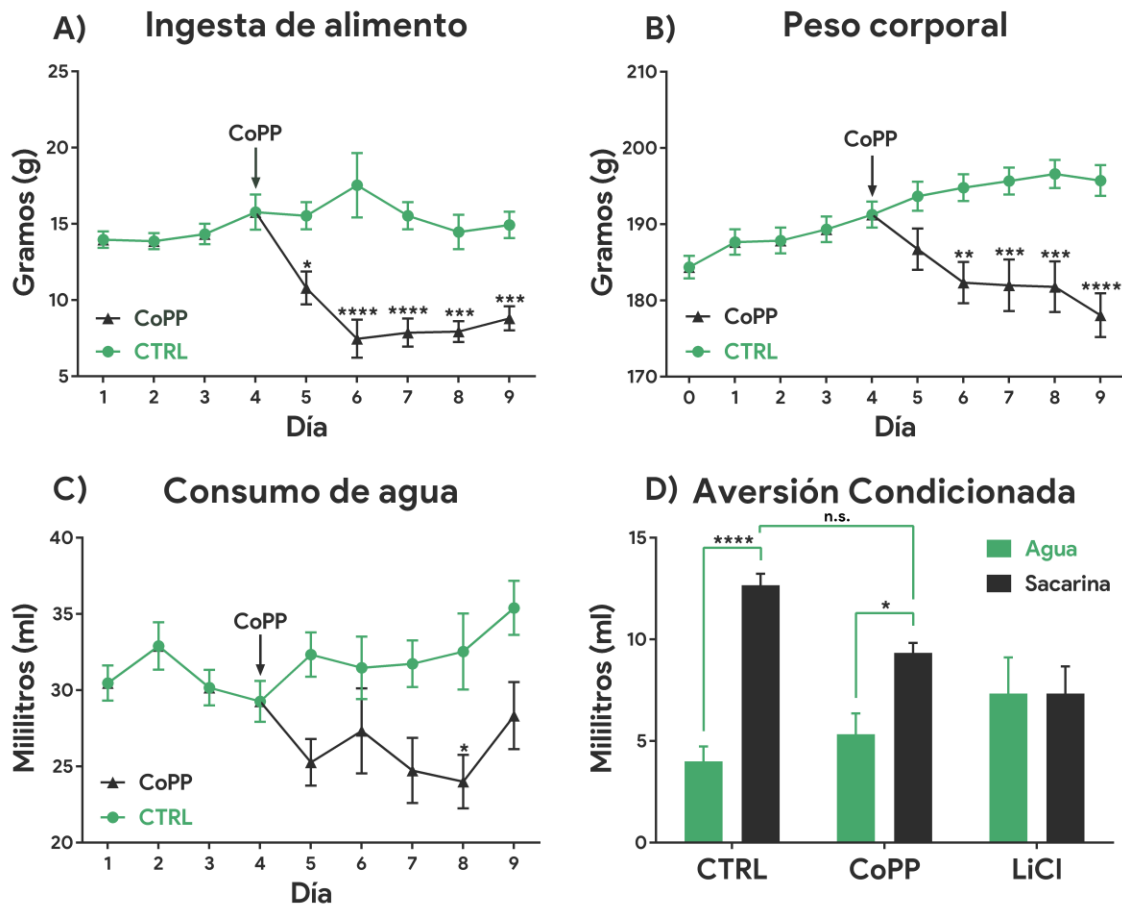


Figura 6. Efecto de la CoPP sobre la ingesta de alimentos (A), el peso corporal (B) y el consumo de agua (C), así como sobre el condicionamiento de aversión al sabor (D). Media \pm E.E.M, RM-ANOVA, $n=15$; excepto en D) donde ANOVA de dos vías y $n=6$. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$

Por otro lado, en la prueba de aversión condicionada (Figura 6D) se encontró que las ratas administradas con CoPP tuvieron un mayor consumo de sacarina que de agua (CoPP Agua 5.3 ml \pm 1.0 vs CoPP Sacarina 9.3 ml \pm 0.5, $p \leq 0.05$), lo que confirma que mantienen la preferencia por la sacarina que mostró el grupo control (CTRL Agua 4.0 ml \pm 0.7 vs CTRL Sacarina 12.7 ml \pm 0.6, $p \leq 0.0001$). No se encontró diferencia significativa en el consumo de sacarina entre el grupo CTRL y el grupo administrado con CoPP (CTRL Sacarina 12.7 ml \pm 0.6 vs CoPP Sacarina 9.3 ml \pm 0.5, n.s.). Los resultados se contrastaron contra un control positivo de animales inyectados con cloruro de litio (LiCl), donde observamos que las ratas prefieren por igual el agua a la sacarina (LiCl Agua 7.3 ml \pm 1.8 vs LiCl Sacarina 7.3 ml \pm 1.3, n.s.), es decir, se eliminó la preferencia por la sacarina. De esta manera, confirmamos que la

disminución en la ingesta de alimentos es causada por un mecanismo diferente a la aversión condicionada.

Estos resultados en su conjunto mostraron que la CoPP logró imitar la disminución en la ingesta de alimentos, así como la disminución en el peso corporal, ambas características elementales de la anorexia nerviosa. Por otro lado, también confirmaron que la disminución en la ingesta de alimentos no se debe a un mecanismo de condicionamiento aversivo al sabor.

La CoPP no generó cambios en el ciclo estral de las ratas

La evaluación del ciclo estral de las ratas a través de la citología vaginal (Tabla 2) no mostró cambios en el comportamiento del ciclo estral de forma posterior a la administración de CoPP, ya que el número de ratas que presentó algún retraso en el ciclo es similar en ambos grupos a lo largo de los días posteriores a la administración de CoPP; por otro lado, las ratas que avanzaron o mantuvieron la fase del ciclo estral en la que se encontraban no se ven afectadas de forma posterior a la administración de CoPP, ya que los números entre el grupo control y el grupo CoPP no muestran variaciones importantes.

Grupo	Cambio en el ciclo estral	Cambio en el		
		Día 1	Día 3	Día 5
CTRL	Avance/Mantiene	12	9	11
	Retraso	3	6	3
CoPP	Avance/Mantiene	11	10	10
	Retraso	4	5	5

Tabla 2. Animales administrados con CoPP no muestran cambios en el ciclo estral a comparación del grupo control.

La CoPP no incrementó la presencia de conductas similares a ansiedad ni induce hiperactividad

En la prueba conductual de campo abierto (Figura 7A), las ratas tratadas con CoPP no presentaron diferencia alguna al compararse con el grupo control en cuanto al tiempo que estas pasaron en la zona central de la arena (CTRL $5.5 \text{ s} \pm 1.7$ vs CoPP $3.9 \text{ s} \pm 1.3$, n.s.). Esta prueba también permitió la evaluación de la actividad locomotora (Figura 7B) a través de la conducta de rearing o exploración erguida, donde tampoco se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de la actividad locomotora entre el grupo CTRL y el grupo CoPP (CTRL 34.5 ± 2.7 vs CoPP 29.0 ± 2.4 , n.s.).

La prueba de exploración luz-oscuridad (Figura 7C, 7D y 7E) tampoco mostró diferencias significativas entre ambos grupos tanto en el tiempo que los animales pasaron en la zona iluminada (CTRL $79.7 \text{ s} \pm 17.4$ vs CoPP $54.8 \text{ s} \pm 12.6$, n.s.), el número de transiciones entre zonas (CTRL 4.9 ± 0.8 vs CoPP 4.1 ± 0.7 , n.s.) y tampoco la duración total de las conductas de evaluación de riesgo (CTRL $21.5 \text{ s} \pm 1.8$ vs CoPP $20.7 \text{ s} \pm 2.7$, n.s.). Finalmente, la prueba de colgado del alambre (Figura 7F) tampoco mostró diferencias significativas en la duración del agarre (CTRL $2.4 \text{ s} \pm 0.7$ vs CoPP $2.8 \text{ s} \pm 0.8$, n.s.).

Considerando los resultados previos, éstos sugieren que la administración de CoPP no imitó la presencia de conductas tipo ansiedad ni indujo hiperactividad, ambas características claves de la anorexia nerviosa.

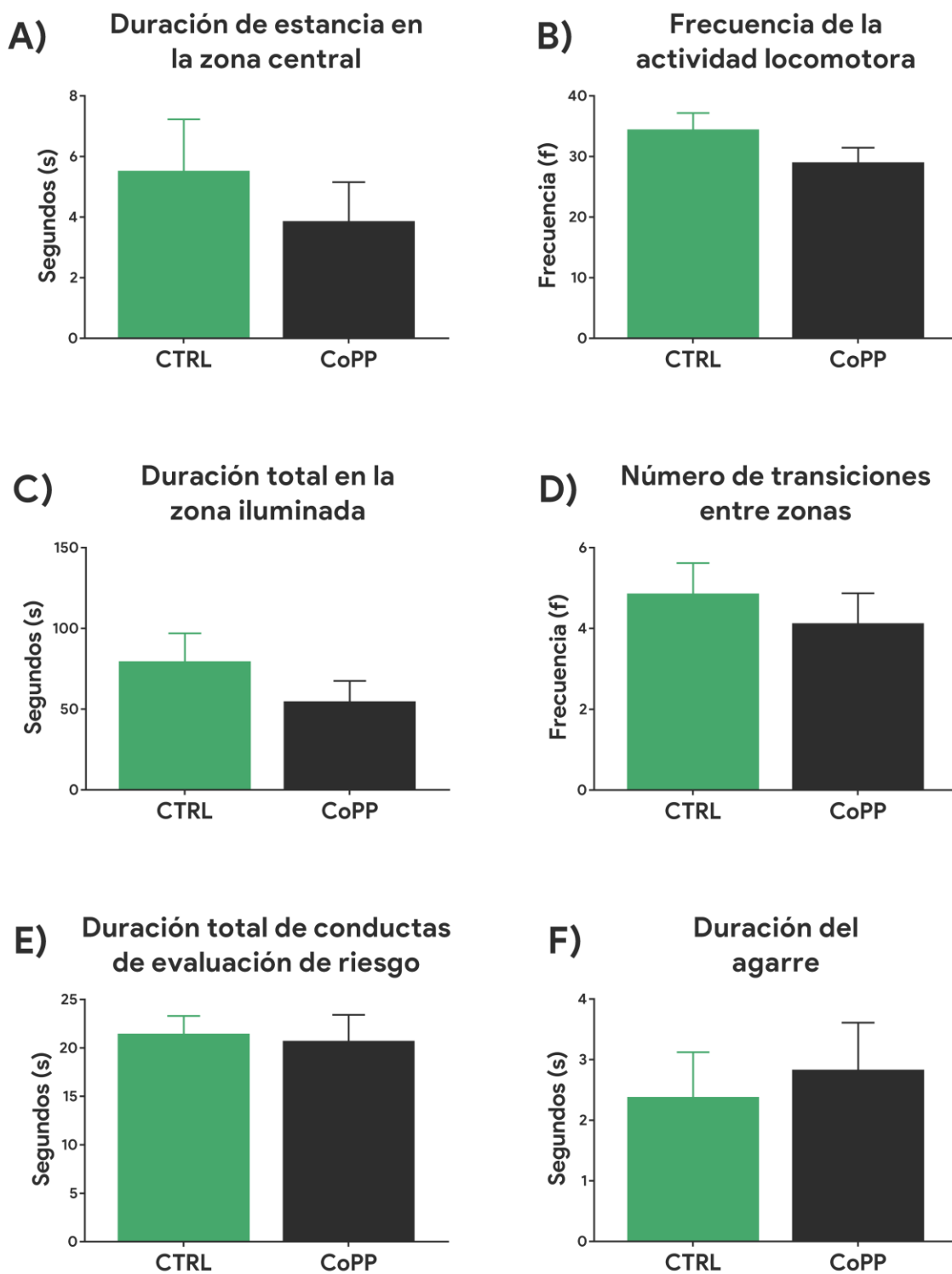


Figura 7. Efecto de la privación de ingesta de alimentos generada por CoPP en las pruebas de campo abierto (A-B) y exploración luz-oscuridad (C-E). La CoPP no genera debilitamiento muscular (F). Media \pm E.E.M, t de Student (B, D y E) o U de Mann-Whitney (A, C, F), n=15; excepto en F) donde CTRL n=13 y CoPP n=12. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001.

La CoPP no generó cambios en las poblaciones celulares del NAcc

Los conteos celulares preliminares (Figura 8C y 8F) del NAcc mostraron que la privación de alimento producida por la CoPP no generó cambios en el número de neuronas en el NAcc en comparación con el grupo control tanto en la subdivisión Core (CTRL 26.1 ± 0.6 vs CoPP 26.6 ± 3.1) como Shell (CTRL 32.5 ± 0.0 vs CoPP 24.8 ± 0.0) del NAcc. Resultados similares se encontraron para astrocitos (Core: CTRL 4.2 ± 0.8 vs CoPP 4.1 ± 1.1 ; Shell: CTRL 7.8 ± 0.7 vs 4.6 ± 0.0), oligodendrocitos (Core: CTRL 4.2 ± 2.2 vs CoPP 3.4 ± 0.9 ; Shell: CTRL 3.3 ± 0.7 vs CoPP 3.0 ± 0.0) y microglia (Core: CTRL 1.0 ± 0.0 vs CoPP 1.7 ± 0.3 ; Shell: CTRL 2.3 ± 0.3 vs CoPP 1.8 ± 0.0). A nivel morfológico, las células no presentaron anomalías como cariólisis o picnosis, signos de posible muerte celular, en ambas subdivisiones del NAcc para ambos grupos (Figura 8A, 8B, 8D y 8E). En su conjunto, estos resultados sugieren que la privación de alimento inducida por CoPP no induce cambios en los números de neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía en las dos subdivisiones del NAcc.

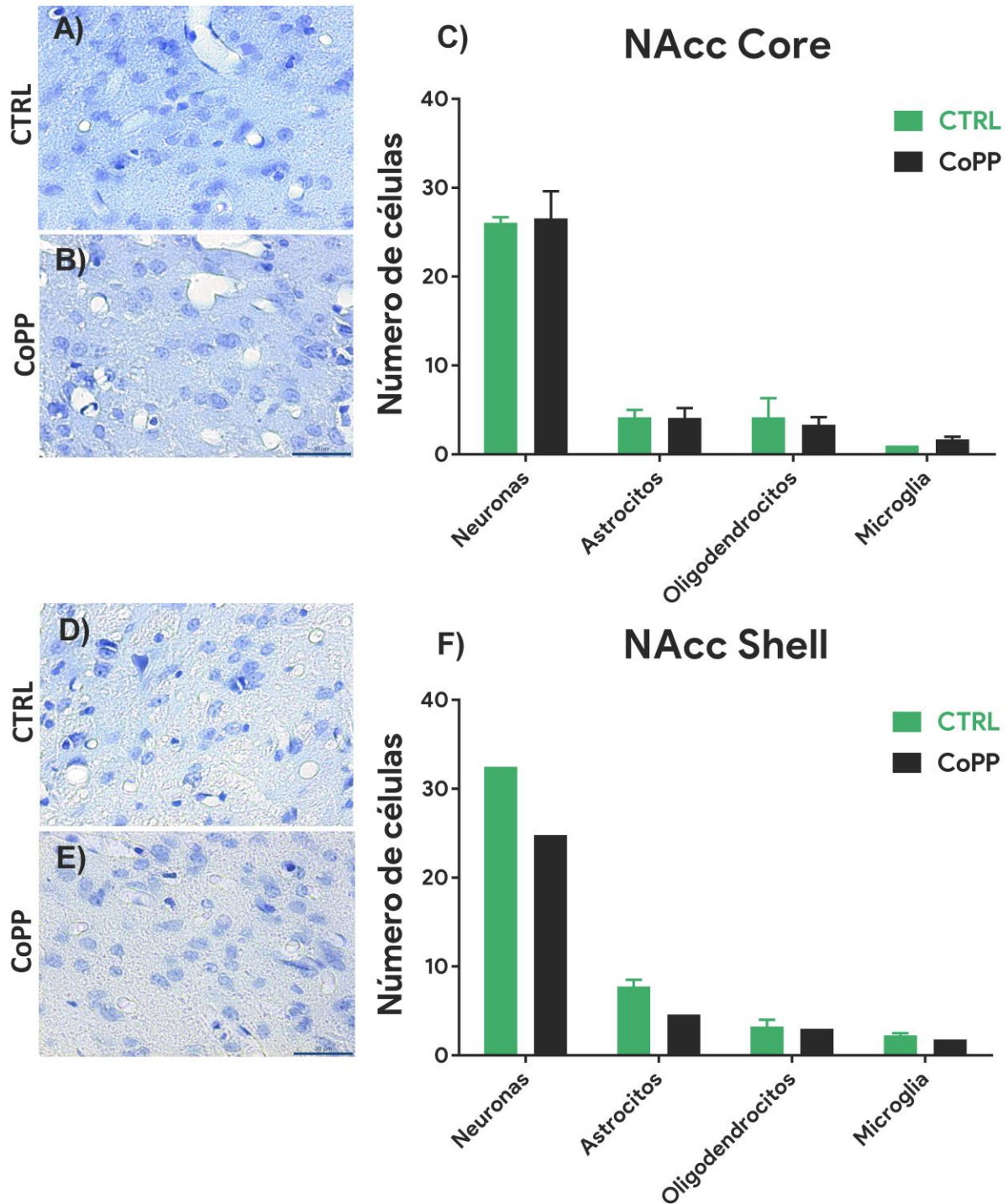


Figura 8. Efecto de la privación de alimentos inducida por CoPP en las diferentes poblaciones celulares del NAcc (C, F) y su morfología (A-B, D-E). Tanto en la subdivisión Core como Shell del NAcc no se observan cambios en la población de células neuronales, astrocíticas, oligodendrocíticas y microgliales. Datos preliminares (n=2, excepto en CoPP Shell, donde n=1).

Discusión

Esta investigación muestra que la CoPP imita de manera aguda la disminución en la ingesta de alimento, así como una disminución en el peso corporal presente en la anorexia nerviosa, pero no logra imitar aspectos conductuales igualmente relevantes en la enfermedad, como, por ejemplo, la hiperactividad y la presencia de conductas tipo ansiedad.

La disminución en la ingesta de alimentos así como en el peso corporal son efectos causados por la administración de CoPP que han sido bien documentados previamente en la literatura científica (Choi, Meeran, O'Shea, Lambert & Bloom, 1996; Csongradi, Docarmo, Dubinion, Vera & Stec, 2012; Galbraith & Kappas, 1989, 1991a; Galbraith, Kow, Pfaff & Kappas, 1992). Sin embargo, la mayor parte de los estudios reportados hasta ahora se han realizado en animales macho, y, si bien existe un solo reporte del efecto de este compuesto en el peso corporal de ratas hembras (Galbraith & Kappas, 1991a), este trabajo confirma que el efecto previamente reportado en el peso corporal de las hembras y muestra que la disminución en la ingesta de alimentos también ocurre en ratas hembras.

Llama la atención la rápida pérdida de peso que ocurre en las ratas, ya que en los primeros dos días post-inyección observamos una rápida disminución de la ingesta de alimento acompañada de una disminución en el peso corporal. A partir del tercer día, el peso sigue disminuyendo debido a que la ingesta de alimentos sigue sin alcanzar su nivel previo a la inyección. La pérdida de peso podría también atribuirse a un incremento en la actividad locomotora, sin embargo, como observamos en la figura 7B, la actividad locomotora no incrementa, siendo esto otro elemento que también concuerda con reportes de la literatura previa (Csongradi et al., 2012; Galbraith, Kow, et al., 1992). Los resultados obtenidos en la actividad locomotora a través de la conducta de rearing deben de corroborarse contabilizando la cantidad de cuadros recorridos en el campo abierto.

En cuanto al consumo de agua, podemos observar que este no se ve disminuido de forma significativa, sin embargo, muestra una tendencia a la baja. Esta tendencia a la baja puede explicarse debido a que las ratas toman agua de forma prandial, es decir, gran parte

de su ingesta de agua ($\approx 70\%$) ocurre en conjunto con la comida (Fitzsimons & Le Magnen, 1969; Kissileff, 1969). Estos hallazgos son novedosos y contrastan con el efecto que la CoPP induce en las ratas macho, donde si se ha reportado una disminución significativa en el consumo de agua (Galbraith & Kappas, 1991a). El menor efecto que parece tener la CoPP en el consumo de agua podría explicarse ya que, en ese mismo reporte, los autores encuentran que, al menos, en cuanto al peso corporal, el efecto de la CoPP parece ser menor en las hembras que en los machos; así que, dado que la disminución en el peso corporal se debe a una menor ingesta de alimentos, y, aunado al hecho de que el efecto en el peso corporal es menor en las hembras, es de esperarse que el consumo de agua sea menor en ellas, pero no necesariamente de forma significativa frente al del grupo control.

En cuanto a los resultados obtenidos de la prueba de preferencia a la sacarina, no observamos diferencias significativas entre la preferencia a la sacarosa entre el grupo control y el grupo administrado con CoPP, lo que indica que la disminución en el consumo de alimento no se debe a un mecanismo de aversión condicionada. Por otro lado, el grupo de LiCl llamó la atención debido a que se esperaba que el consumo de la solución con sacarina fuera prácticamente nulo, sin embargo, se ha mostrado que la duración, cantidad y concentración del estímulo condicionado (en este caso, la solución con sacarina) tiene un efecto importante en la intensidad de la aversión (Archer & Sjöden, 1985; Barker, 1976), y, en el caso de la sacarina, se ha encontrado evidencia que muestra que la sacarina es menos atractiva a comparación de otras sustancias que tienen un sabor dulce como la sucrosa (Sclafani, Bahrani, Zukerman & Ackroff, 2010; Sclafani, Thompson & Smith, 1998; Smith & Sclafani, 2002) por lo que podríamos esperar que la aversión condicionada no fuese tan intensa.

Hasta aquí podemos decir de manera general que verificamos la presencia de elementos característicos de la anorexia nerviosa como la reducción del peso corporal, de la ingesta de alimentos sin alterar el consumo de agua. Sin embargo, no sabemos si imita otras características relevantes de este trastorno, en particular, conductas tipo ansiedad, hiperactividad y alteraciones en el ciclo estral.

Este trabajo presenta el primer reporte sobre conductas tipo ansiedad en animales administrados con CoPP. Los resultados de las dos pruebas conductuales para evaluar ansiedad muestran que no hay un incremento en la presencia de conductas tipo ansiedad ni un incremento en la actividad locomotora. También confirmamos que ninguna de las dos pruebas conductuales se vieron afectadas por posibles alteraciones musculares que pueden ser producidas por un proceso de emaciación gracias a la prueba de colgado del alambre, que evalúa la capacidad muscular de las ratas (Klein et al., 2012). Los resultados encontrados no concuerdan con lo esperado, ya que existe una clara relación entre la privación de alimento y un incremento tanto en las conductas tipo ansiedad (Campos et al., 2019; Gauthier et al., 2014; Kang et al., 2007; Lee & Kinzig, 2017) como en la actividad locomotora (Hebebrand et al., 2003; Horndasch, O'Keefe, Lamond, Brown & McCabe, 2016; Ross et al., 2016; Scheurink et al., 2010), pero no encontramos esto en los animales tratados con CoPP a pesar de que su ingesta de alimentos se ve disminuida significativamente.

Ante una situación de restricción alimenticia, se ha encontrado una disminución en los niveles de producción de serotonina en los núcleos del rafé así como un incremento en los niveles de serotonina en el hipocampo y una disminución en el metabolismo de serotonina en el hipotálamo que a su vez están asociados a un incremento en la presencia de conductas tipo ansiedad y depresivas (Kang et al., 2007; Ross et al., 2016). Otros estudios muestran una disminución de los niveles de serotonina en sangre en pacientes con anorexia nerviosa y su correlación con la presencia de síntomas depresivos y de ansiedad (Gauthier et al., 2014; Mattar, Thiébaud, Huas, Cebula & Godart, 2012; Ross et al., 2016). Dada la relación entre la disfunción del sistema serotoninérgico con el aumento en las conductas tipo ansiedad e hiperactividad tanto en poblaciones clínicas como experimentales y la ausencia de conductas tipo ansiedad en animales con privación de alimento inducida por CoPP, es plausible sugerir que la CoPP podría recuperar la respuesta del sistema serotoninérgico a través de un mecanismo desconocido, evitando así el incremento la hiperactividad y las conductas tipo ansiedad en ratas con un menor consumo de alimento.

En cuanto al ciclo estral, no observamos alteraciones importantes en las ratas tratadas con CoPP en comparación con las ratas control. No existen reportes previos de los efectos de la CoPP en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en hembras, pero se sabe que la privación de alimento suprime la actividad de dicho eje, resultando en alteraciones del ciclo tanto estral en modelos animales como menstrual en seres humanos (Evans & Anderson, 2017; Frintrop et al., 2018; Hebebrand et al., 2003). Es posible que esto no ocurra en nuestros animales debido a la posible actividad de la CoPP en este eje, afectando en particular, el metabolismo de hormonas derivadas del colesterol en ratas macho (Galbraith & Jellinck, 1989; Galbraith & Krey, 1989; Smith et al., 1986). Por otro lado, no todas las pacientes con anorexia nerviosa sufren de alteraciones en el ciclo menstrual y tampoco parecen existir diferencias clínicamente relevantes entre las mujeres con anorexia nerviosa que sí menstrúan y las que no (Attia & Roberto, 2009), por lo que se ha dejado de proponer como elemento clave para definir la patología pero sí se le considera como un indicador de su severidad.

Una limitación importante de estos resultados es que la medición del ciclo estral se realizó cada 48 hrs en lugar de las 24 hrs típicamente realizadas, esto debido a que la toma de muestra es invasiva y estresante para las ratas, por lo que se decidió disminuir la frecuencia con la que esta prueba se realiza. Este cambio en la frecuencia de evaluación del ciclo estral es importante ya que la duración del ciclo estral en las ratas es de alrededor de cuatro días (Marcondes et al., 2005), sin embargo, se pueden presentar variaciones en la duración del ciclo estral e incluso en algunos casos, ratas que no siguen la secuencia usual del ciclo estral (proestro, estro, metaestro y diestro) (Marcondes et al., 2005). Por otro lado, tampoco se controló la presencia de posibles efectos del ciclo estral en las pruebas conductuales realizadas, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Se sugiere para trabajos posteriores controlar la fase del ciclo estral en la que las ratas se encuentran, ya que se ha mostrado que existen variaciones en las mediciones de conductas tipo ansiedad de acuerdo al ciclo estral (Brobeck, Wheatland & Strominger, 1947; Marcondes, Miguel, Melo & Spadari-Bratfisch, 2001).

Con esto, podemos decir que nuestra hipótesis sobre que la administración subcutánea de CoPP reproducirá las principales características del trastorno de anorexia nerviosa del tipo restrictivo se ve rechazada. Sin embargo, por los efectos que este compuesto tiene en la ingesta de alimentos y el peso corporal, no podemos descartarlo como un valioso modelo para el estudio de la regulación del balance energético, y en particular, su uso para elucidar los mecanismos que modifican la ingesta de alimentos y el peso corporal. Este compuesto podría resultar valioso como tratamiento médico hacia problemas como la obesidad, donde un primer estudio muestra efectos prometedores (Csongradi et al., 2012).

En este punto, es necesario mencionar que en la literatura científica no existen estudios en cuando a la posible toxicidad de este compuesto. El cobalto es un metal pesado que tiene funciones biológicas importantes en la homeostasis del ADN, del grupo hemo, y de algunos aminoácidos, así como parte importante de la Vitamina B₁₂ (Cianocobalamina), que es un cofactor de varias metiltransferasas, como la metionina sintasa (que cataliza la biosíntesis del aminoácido esencial metionina) o la metilmalonil-CoA mutasa (que cataliza la síntesis de succinil-CoA a partir de propionil-CoA proveniente de la β -oxidación de los ácidos grasos) (Randaccio, Geremia, Demitri & Wuerges, 2010; Reynolds, 2006). No obstante, de forma libre y en exceso, el cobalto puede producir alteraciones pulmonares, hematológicas, cardiovasculares, gastrointestinales, hepáticas, endócrinas, dermatológicas, oftalmológicas, inmunológicas, psiquiátricas y neurológicas (Sheikh, 2016). A pesar de esto, la intoxicación por cobalto es bastante rara en la literatura, puede llegar a ocurrir principalmente por reemplazos de cadera donde el implante está fabricado con aleaciones de cobalto (Green, Griffiths & Almond, 2017). Por otro lado, en el caso específico de la CoPP, existe evidencia indirecta de que no se metaboliza por ninguna enzima endógena (Galbraith et al., 2004), lo que evitaría la liberación del cobalto al organismo, pero, no se han realizado estudios sobre la degradación biológica de este compuesto in vitro e in vivo. Los resultados de este trabajo también aportan información sobre su toxicidad, ya que no observamos alteraciones conductuales de relevancia, al menos, en cuanto a conducta locomotora y conductas tipo ansiedad ni tampoco cambios en las poblaciones celulares del

NAcc en los conteos celulares; no obstante, no podemos descartar alteraciones en otras funciones cognitivas como, por ejemplo, la memoria.

La ausencia de cambios en las poblaciones celulares de neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglia del NAcc es un hallazgo novedoso, ya que estudios previos realizados en otros modelos animales de anorexia nerviosa han encontrado una disminución en el número de astrocitos en corteza e hipocampo (Frintrop et al., 2017; Reyes-Haro et al., 2015, 2016). Por otro lado, no se ha estudiado la posible afectación de células oligodendrogiales, a pesar de la presencia de reportes sobre disminución del volumen de materia blanca tanto a nivel general como en regiones del lóbulo temporal y parietal (Frank, Shott, Hagman & Mittal, 2013). A pesar de que se muestra que el efecto anorexigénico de la CoPP no induce cambios en las diferentes poblaciones del NAcc en sus dos subdivisiones, este hallazgo no es conclusivo y representa una limitante de este trabajo, ya que los resultados aquí presentados son preliminares y presentan una muestra de poco tamaño (n=2 o n=1). Sin embargo, estos conteos permiten vislumbrar lo que podría ocurrir al incrementar el número de muestras analizadas.

Si bien los hallazgos en el NAcc son novedosos, concuerdan con los reportes anecdóticos de que la CoPP no parece inducir anomalías al menos en la zona hipotalámica (Galbraith & Kappas, 1989) y concuerda también con evidencia de que la CoPP no induce genes de respuesta rápida como Fos en áreas fuera del hipotálamo (Galbraith et al., 2004), lo que refuerza la propuesta de que el sitio de acción de la CoPP se encuentra a nivel hipotalámico (Galbraith & Kappas, 1991b, 1991a; Galbraith, Kow, et al., 1992; Li et al., 2006; Turner et al., 1994). Estos hallazgos en el NAcc también se ven parcialmente fortalecidos por los resultados obtenidos en la prueba de preferencia a la sacarina, ya que no observamos diferencias significativas entre la preferencia a la sacarina entre el grupo control y el grupo administrado con CoPP. La prueba de preferencia a la sacarina está íntimamente ligada al elemento hedónico, que, como hemos mencionado previamente, está mediado por el circuito de recompensa, y en particular, por el NAcc (Berridge, 2004; Hoffman, 2015). Dado que no hay diferencias entre el consumo de la solución con sacarina entre animales control y animales administrados con CoPP, tampoco se esperarían cambios

en las poblaciones celulares del NAcc, ya que, si la CoPP indujera cambios en esta región, veríamos también un cambio en la preferencia a la sacarosa en el grupo CoPP. No obstante, es necesaria la inclusión de más muestras para poder presentar resultados conclusivos en cuanto al cambios en las poblaciones celulares del NAcc. Por otro lado, tampoco podemos descartar la posibilidad de que la CoPP module la actividad del NAcc a través de vías indirectas.

Dentro de las limitaciones de este trabajo encontramos que la anorexia es una condición crónica, es decir, se padece por largo tiempo, mientras que los tiempos propuestos en este estudio equivaldrían a un efecto agudo. Sin embargo, la mayoría de los modelos animales para el estudio de la anorexia nerviosa tiene una duración de entre cuatro días y un máximo de hasta catorce días (Carrera et al., 2014; Frintrop et al., 2018; Reyes-Haro et al., 2015, 2016), representando nuevamente, un efecto agudo. Sólo en años recientes se ha realizado un esfuerzo por representar mejor el aspecto crónico de esta patología (Frintrop et al., 2018). En el caso particular del uso de CoPP como modelo de anorexia, esto podría mejorarse incrementando el tiempo de observación posterior a la administración de CoPP, ya que su efecto sobre la ingesta de alimentos en ratas macho se encuentra entre los cinco y diez días. Se escogió el tiempo mínimo que aseguraba la observación del efecto en la ingesta de alimentos, dado que se desconocía el efecto de la CoPP en la ingesta de alimento en ratas hembras. Aunado a esta situación, solo hay un estudio donde se analiza el peso corporal pero sin hacer mención de la ingesta, y, dado que encuentra que el efecto de la CoPP parece ser menor en hembras que en machos (Galbraith & Kappas, 1991a) no podíamos asegurar que después de cinco días se mantuviera el efecto anorexigénico de la CoPP en hembras. A futuro, sugerimos identificar la duración del efecto anorexigénico en ratas hembras así como la posible administración de varias dosis de CoPP a lo largo del tiempo para poder imitar el efecto crónico de esta patología.

Conclusión

En conclusión, la CoPP disminuye significativamente la ingesta de alimentos y del peso corporal, sin embargo, no imita otras características relevantes de la anorexia nerviosa como las conductas tipo ansiedad o el incremento en la actividad locomotora, por lo que el potencial de la CoPP para generar un modelo animal de anorexia nerviosa es limitado. No obstante, la CoPP tiene uso potencial como modelo para el estudio de mecanismos que regulan el balance energético a través de la ingesta de alimentos, así como en patologías como la obesidad, donde parece mostrar resultados prometedores. Por otro lado, es necesario estudiar los mecanismos moleculares implicados en los efectos conductuales de la CoPP, en particular, los efectos de este compuesto a nivel endócrino y en el sistema serotoninérgico cerebral.

Referencias

- Agras, W. S., Lock, J., Brandt, H., Bryson, S. W., Dodge, E., Halmi, K. A., ... Woodside, B. (2014). Comparison of 2 Family Therapies for Adolescent Anorexia Nervosa. *JAMA Psychiatry*, 71(11), 1279. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.1025>
- American Psychiatric Association. (2013). Feeding and Eating Disorders. En *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)* (5a ed., p. 947). United States of America: American Psychiatric Publishing.
- Amianto, F., Caroppo, P., D'Agata, F., Spalatro, A., Lavagnino, L., Caglio, M., ... Fassino, S. (2013). Brain volumetric abnormalities in patients with anorexia and bulimia nervosa: A Voxel-based morphometry study. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 213(3), 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2013.03.010>
- Andermann, M. L., & Lowell, B. B. (2017). Toward a Wiring Diagram Understanding of Appetite Control. *Neuron*, 95(4), 757–778. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.014>
- Archer, T., & Sjöden, P.-O. (1985). Effects of CS concentration in taste-aversion learning: Problems in assessing aversion strength. *Scandinavian Journal of Psychology*, 26(1), 42–52. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9450.1985.tb01140.x>
- Attia, E., & Roberto, C. A. (2009). Should amenorrhea be a diagnostic criterion for anorexia nervosa? *International Journal of Eating Disorders*, 42(7), 581–589. <https://doi.org/10.1002/eat.20720>
- Avena, N. M., & Bocarsly, M. E. (2012). Dysregulation of brain reward systems in eating disorders: Neurochemical information from animal models of binge eating, bulimia nervosa, and anorexia nervosa. *Neuropharmacology*, 63(1), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.11.010>
- Barker, L. M. (1976). CS duration, amount, and concentration effects in conditioning taste

aversions. *Learning and Motivation*, 7(2), 265–273. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(76\)90033-3](https://doi.org/10.1016/0023-9690(76)90033-3)

Baufeld, C., Osterloh, A., Prokop, S., Miller, K. R., & Heppner, F. L. (2016). High-fat diet-induced brain region-specific phenotypic spectrum of CNS resident microglia. *Acta Neuropathologica*, 132(3), 361–375. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1595-4>

Benjet, C., Méndez, E., Borges, G., & Medina-Mora, M. E. (2012). Epidemiología de los trastornos de la conducta alimentaria en una muestra representativa de adolescentes. *Salud Mental*, 35(6), 483–490.

Berridge, K. C. (2004). Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiology and Behavior*, 81(2), 179–209. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.004>

Berridge, K. C. (2009). “Liking” and “wanting” food rewards: Brain substrates and roles in eating disorders. *Physiology and Behavior*, 97(5), 537–550. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.044>

Berthoud, H. R. (2007). Interactions between the “cognitive” and “metabolic” brain in the control of food intake. *Physiology and Behavior*, 91(5), 486–498. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.016>

Bischoff-Grethe, A., McCurdy, D., Grenesko-Stevens, E., (Zoe) Irvine, L. E., Wagner, A., Wendy Yau, W. Y., ... Kaye, W. H. (2013). Altered brain response to reward and punishment in adolescents with Anorexia nervosa. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 214(3), 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2013.07.004>

Brobeck, J., Wheatland, M., & Strominger, J. (1947). Variations in regulation of energy exchange associated with estrus, diestrus and pseudopregnancy in rats. *Endocrinology*, 40(2), 65–72. <https://doi.org/10.1210/endo-40-2-65>

Broberger, C., Johansen, J., Schalling, M., & Hökfelt, T. (1997). Hypothalamic neurohistochemistry of the murine anorexia (anx/anx) mutation: Altered processing

of neuropeptide Y in the arcuate nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 387(1), 124–135. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971013\)387:1<124::AID-CNE10>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971013)387:1<124::AID-CNE10>3.0.CO;2-U)

Broft, A., Slifstein, M., Osborne, J., Kothari, P., Morim, S., Shingleton, R., ... Timothy Walsh, B. (2015). Striatal dopamine type 2 receptor availability in anorexia nervosa. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 233(3), 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2015.06.013>

Buccafusco, J. J. (2009). *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience* (2nd ed.). United States of America: CRC Press.

Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS ONE*, 7(4), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>

Campos, G. V., de Noronha, S. R., de Souza, A. A., Lima, P. M., Abreu, A. R., Chianca-Jr, D., & de Menezes, R. C. (2019). Estrogen receptor β activation within dorsal raphe nucleus reverses anxiety-like behavior induced by food restriction in female rats. *Behavioural Brain Research*, 357–358(February 2018), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.03.029>

Caron, A., & Richard, D. (2017). Neuronal systems and circuits involved in the control of food intake and adaptive thermogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1391(1), 35–53. <https://doi.org/10.1111/nyas.13263>

Carrera, O., Fraga, Á., Pellón, R., & Gutiérrez, E. (2014). Rodent model of activity-based anorexia. *Current Protocols in Neuroscience*, (SUPPL.67), 1–11. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0947s67>

Chaouloff, F., Durand, M., & Mormède, P. (1997). Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behavioural Brain Research*, 85(1), 27–35. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(96\)00160-X](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(96)00160-X)

- Chaudhri, O. B., Salem, V., Murphy, K. G., & Bloom, S. R. (2008). Gastrointestinal satiety signals. *Annual Reviews in Physiology*, *70*, 239–255.
<https://doi.org/10.1038/ijo.2008.235>
- Chiurazzi, C., Cioffi, I., De Caprio, C., De Filippo, E., Marra, M., Sammarco, R., ... Pasanisi, F. (2017). Adequacy of nutrient intake in women with restrictive anorexia nervosa. *Nutrition*, *38*, 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.02.004>
- Choi, S. J., Meeran, K., O’Shea, D., Lambert, P. D., & Bloom, S. R. (1996). Weight loss in rats treated with intracerebroventricular cobalt protoporphyrin is not specific to the neuropeptide Y system. *Brain Research*, *729*(2), 223–227.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)00423-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)00423-4)
- Chowdhury, T. G., Chen, Y.-W., & Aoki, C. (2015). Using the Activity-based Anorexia Rodent Model to Study the Neurobiological Basis of Anorexia Nervosa. *Journal of Visualized Experiments*, (104), 13–15. <https://doi.org/10.3791/52927>
- Chowen, J. A., Argente-Arizón, P., Freire-Regatillo, A., Frago, L. M., Horvath, T. L., & Argente, J. (2016). The role of astrocytes in the hypothalamic response and adaptation to metabolic signals. *Progress in Neurobiology*, *144*, 68–87.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.03.001>
- Csongradi, E., Docarmo, J. M., Dubinion, J. H., Vera, T., & Stec, D. E. (2012). Chronic HO-1 induction with cobalt protoporphyrin (CoPP) treatment increases oxygen consumption, activity, heat production and lowers body weight in obese melanocortin-4 receptor-deficient mice. *International Journal of Obesity*.
<https://doi.org/10.1038/ijo.2011.78>
- Cuesto, G., Everaerts, C., León, L. G., & Acebes, A. (2017). Molecular bases of anorexia nervosa, bulimia nervosa and binge eating disorder: shedding light on the darkness. *Journal of Neurogenetics*, *31*(4), 266–287.
<https://doi.org/10.1080/01677063.2017.1353092>

- Delvenne, V., Goldman, S., De Maertelaer, V., & Lotstra, F. (1999). Brain glucose metabolism in eating disorders assessed by positron emission tomography. *International Journal of Eating Disorders*, 25(1), 29–37.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-108X\(199901\)25:1<29::AID-EAT4>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-108X(199901)25:1<29::AID-EAT4>3.0.CO;2-#)
- Delvenne, V., Goldman, S., De Maertelaer, V., Simon, Y., Luxen, A., & Lotstra, F. (1996). Brain hypometabolism of glucose in anorexia nervosa: Normalization after weight gain. *Biological Psychiatry*, 40(8), 761–768. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(95\)00522-6](https://doi.org/10.1016/0006-3223(95)00522-6)
- Douglass, J. D., Dorfman, M. D., Fasnacht, R., Shaffer, L. D., & Thaler, J. P. (2017). Astrocyte IKK β /NF- κ B signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. *Molecular Metabolism*, 6(4), 366–373.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.01.010>
- Drummond, G. S., & Kappas, A. (1982). The cytochrome P-450-depleted animal: an experimental model for in vivo studies in chemical biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(7), 2384–2388.
<https://doi.org/10.1073/pnas.79.7.2384>
- Ehrlich, S., Salbach-Andrae, H., Weiss, D., Burghardt, R., Goldhahn, K., Craciun, E. M., ... Lehmkuhl, U. (2008). S100B in underweight and weight-recovered patients with anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*, 33(6), 782–788.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.03.004>
- Evans, M. C., & Anderson, G. M. (2017). Neuroendocrine integration of nutritional signals on reproduction. *Journal of Molecular Endocrinology*, 58(2), R107–R128.
<https://doi.org/10.1530/jme-16-0212>
- Ferris, H. A., Perry, R. J., Moreira, G. V., Shulman, G. I., Horton, J. D., & Kahn, C. R. (2017). Loss of astrocyte cholesterol synthesis disrupts neuronal function and alters whole-body metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(5), 1189–1194.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1620506114>

Fitzsimons, T. J., & Le Magnen, J. (1969). Eating as a regulatory control of drinking in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 67(3), 273–283.
<https://doi.org/10.1037/h0026772>

Foerde, K., Steinglass, J. E., Shohamy, D., & Walsh, B. T. (2015). Neural mechanisms supporting maladaptive food choices in anorexia nervosa. *Nature Neuroscience*, 18(11), 1571–1573. <https://doi.org/10.1038/nn.4136>

Foerde, K., Steinglass, J., Walsh, B. T., Shohamy, D., & Kostro, K. (2014). Restrictive food intake as a choice - A paradigm for study. *International Journal of Eating Disorders*, 48(1), 59–66. <https://doi.org/10.1002/eat.22345>

Foldi, C. J., Milton, L. K., & Oldfield, B. J. (2017). A focus on reward in anorexia nervosa through the lens of the activity-based anorexia rodent model. *Journal of Neuroendocrinology*, 29(10), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jne.12479>

Foldi, Claire J., Milton, L. K., & Oldfield, B. J. (2017). The Role of Mesolimbic Reward Neurocircuitry in Prevention and Rescue of the Activity-Based Anorexia (ABA) Phenotype in Rats. *Neuropsychopharmacology*, (March), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/npp.2017.63>

Fornai, F., Schluter, O. M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., ... Sudhof, T. C. (2005). Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: Convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(9), 3413–3418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409713102>

Frago, L. M., & Chowen, J. A. (2017). Involvement of astrocytes in mediating the central effects of ghrelin. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3).
<https://doi.org/10.3390/ijms18030536>

Frank, G. K., Shott, M. E., Hagman, J. O., & Mittal, V. A. (2013). Alterations in brain structures related to taste reward circuitry in ill and recovered anorexia nervosa and in bulimia nervosa. *The American Journal of Psychiatry*, 170(10), 1152–1160.

<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2013.12101294>

Frank, G. K. W., & Kaye, W. H. (2012). Current status of functional imaging in eating disorders. *International Journal of Eating Disorders*, 45(6), 723–736.

<https://doi.org/10.1002/eat.22016>

Frank, G. K. W., Reynolds, J. R., Shott, M. E., Jappe, L., Yang, T. T., Tregellas, J. R., & O'Reilly, R. C. (2012). Anorexia nervosa and obesity are associated with opposite brain reward response. *Neuropsychopharmacology*, 37(9), 2031–2046.

<https://doi.org/10.1038/npp.2012.51>

Freire-Regatillo, A., Argente-Arizón, P., Argente, J., García-Segura, L. M., & Chowen, J. A. (2017). Non-neuronal cells in the hypothalamic adaptation to metabolic signals. *Frontiers in Endocrinology*, 8(MAR), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00051>

Frintrop, L., Liesbrock, J., Paulukat, L., Johann, S., Kas, M. J., Tolba, R., ... Seitz, J. (2017). Reduced astrocyte density underlying brain volume reduction in activity-based anorexia rats. *World Journal of Biological Psychiatry*, 19(September), 1–11.

<https://doi.org/10.1080/15622975.2016.1273552>

Frintrop, L., Trinh, S., Liesbrock, J., Paulukat, L., Kas, M. J., Tolba, R., ... Seitz, J. (2018). Establishment of a chronic activity-based anorexia rat model. *Journal of Neuroscience Methods*, 293, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.09.018>

Fry, M., & Ferguson, A. V. (2007). The sensory circumventricular organs: Brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior. *Physiology and Behavior*, 91(4), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.04.003>

Fuglset, T. S., Landrø, N. I., Reas, D. L., & Rø, Ø. (2016). Functional brain alterations in anorexia nervosa: A scoping review. *Journal of Eating Disorders*, 4(1).

<https://doi.org/10.1186/s40337-016-0118-y>

Galbraith, R., Chua, S. C., & Kappas, A. (1992). Hypothalamic mechanism for cobalt

protoporphyrin-induced hypophagia and weight loss: inhibition of the feeding response to NPY. *Molecular Brain Research*, 15(3-4), 298-302.
[https://doi.org/10.1016/0169-328X\(92\)90121-Q](https://doi.org/10.1016/0169-328X(92)90121-Q)

Galbraith, R., Drummond, G., Krey, L., & Kappas, A. (1987). Relationship of Suppression of the Androgenic Axis by Cobalt-Protoporphyrin to Its Effects on Weight Loss and Hepatic Heme Oxygenase Induction. *Pharmacology*, 249, 241-249.

Galbraith, R., Furukawa, M., & Li, M. (2006). Possible role of creatine concentrations in the brain in regulating appetite and weight. *Brain Research*, 1101(1), 85-91.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.05.032>

Galbraith, R., Hodgdon, I., Grimm, M. S., & Vizzard, M. A. (2004). Prolonged retention of the anorectic cobalt protoporphyrin in the hypothalamus and the resulting expression of Fos. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(2), R465-R471. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00055.2004>

Galbraith, R., & Jellinck, P. (1989). Cobalt-protoporphyrin, a synthetic heme analogue, feminizes hepatic androgen metabolism in the rat. *Journal of Steroid Biochemistry*, 32(3), 421-426. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(89\)90216-1](https://doi.org/10.1016/0022-4731(89)90216-1)

Galbraith, R., & Jellinck, P. H. (1987). Cobalt-protoporphyrin causes prolonged inhibition of catechol estrogen synthesis by rat liver microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 145(1), 376-383. [https://doi.org/10.1016/S0074-6142\(08\)62750-3](https://doi.org/10.1016/S0074-6142(08)62750-3)

Galbraith, R., & Kappas, A. (1989). Regulation of food intake and body weight by cobalt porphyrins in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(19), 7653-7657.

Galbraith, R., & Kappas, A. (1991a). Intracerebroventricular Administration of Cobalt Protoporphyrin Elicits Prolonged Weight-Reduction in Rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 261(6), 1395-1401.

- Galbraith, R., & Kappas, A. (1991b). Regulation of food intake and body weight in rats by the synthetic heme analogue cobalt protoporphyrin. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 261, 1388–1394.
- Galbraith, R., Kow, L.-M., Pfaff, D., & Kappas, A. (1992). Injection of cobalt protoporphyrin into the medial nuclei of the hypothalamus elicits weight loss. *The American Journal of Physiology*, 263(4), 805–812.
- Galbraith, R., & Krey, L. (1989). Cobalt-protoporphyrin suppresses testosterone secretion by multiple interactions within the brain-pituitary-testicular axis. *Neuroendocrinology*, 49(6), 641–648. <https://doi.org/10.1159/000125181>
- García-Cabezas, M. Á., John, Y. J., Barbas, H., & Zikopoulos, B. (2016). Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10(November), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00107>
- García-Cáceres, C., Yi, C. X., & Tschöp, M. H. (2013). Hypothalamic Astrocytes in Obesity. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 42(1), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2012.11.003>
- Gauthier, C., Hassler, C., Mattar, L., Launay, J. M., Callebert, J., Steiger, H., ... Godart, N. (2014). Symptoms of depression and anxiety in anorexia nervosa: Links with plasma tryptophan and serotonin metabolism. *Psychoneuroendocrinology*, 39(1), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.09.009>
- Green, B., Griffiths, E., & Almond, S. (2017). Neuropsychiatric symptoms following metal-on-metal implant failure with cobalt and chromium toxicity. *BMC Psychiatry*, 17(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12888-016-1174-1>
- Hardie, D. G., & Ashford, M. L. J. (2014). AMPK: Regulating Energy Balance at the Cellular and Whole Body Levels. *Physiology*, 29(2), 99–107. <https://doi.org/10.1152/physiol.00050.2013>

- Harrold, J. A., Dovey, T. M., Blundell, J. E., & Halford, J. C. G. (2012). CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*, *63*(1), 3–17.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.01.007>
- Hebebrand, J., Exner, C., Hebebrand, K., Holtkamp, C., Casper, R. C., Remschmidt, H., ... Klingenspor, M. (2003). Hyperactivity in patients with anorexia nervosa and in semistarved rats: Evidence for a pivotal role of hypoleptinemia. *Physiology and Behavior*, *79*(1), 25–37. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00102-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00102-1)
- Herholz, K., Krieg, J. C., Emrich, H. M., Pawlik, G., Beil, C., Pirke, K. M., ... Heiss, W. D. (1987). Regional cerebral glucose metabolism in anorexia nervosa measured by positron emission tomography. *Biological Psychiatry*, *22*(1), 43–51.
[https://doi.org/10.1016/0006-3223\(87\)90128-4](https://doi.org/10.1016/0006-3223(87)90128-4)
- Hilton, D. A., & Shivane, A. G. (2015). Normal Histology and Commonly Used Stains. En *Neuropathology Simplified: A Guide for Clinicians and Neuroscientists* (1st ed., pp. 1–16). United Kingdom: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14605-8>
- Hoffman, K. L. (2015). What can animal models tell us about depressive disorders? En *Modeling Neuropsychiatric Disorders in Laboratory Animals* (pp. 35–86). United States of America: Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100099-1.00002-9>
- Horndasch, S., O'Keefe, S., Lamond, A., Brown, K., & McCabe, C. (2016). Increased anticipatory but decreased consummatory brain responses to food in sisters of anorexia nervosa patients. *British Journal of Psychiatry Open*, *2*(4), 255–261.
<https://doi.org/10.1192/bjpo.bp.115.002550>
- Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. (s/f). *Citología vaginal en ratas*. México. Recuperado de www.innn.salud.gob.mx
- Jahng, J. W., Houpt, T. A., Kim, S. J., Joh, T. H., & Son, J. H. (1998). Neuropeptide Y mRNA and serotonin innervation in the arcuate nucleus of anorexia mutant mice. *Brain*

- Research*, 790(1-2), 67-73. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00049-3)
- Kalat, J. W., & Rozin, P. (1973). "Learned safety" as a mechanism in long-delay taste-aversion learning in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 83(2), 198-207. <https://doi.org/10.1037/h0034424>
- Kang, D.-W., Jahng, J. W., Lee, J.-H., Kim, B.-T., Kim, J. G., & Kim, H. J. (2007). Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. *Brain Research*, 1150, 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.080>
- Kaye, W. (2008). Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. *Physiology and Behavior*, 94(1), 121-135. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.11.037>
- Kelley, A. E. (1993). Locomotor activity and exploration. En F. van Haaren (Ed.), *Methods in Behavioral Pharmacology* (1st ed., pp. 499-518). United States of America: Elsevier.
- Kissileff, H. R. (1969). Food-associated drinking in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 67(3), 284-300. <https://doi.org/10.1037/h0026773>
- Klein, S. M., Vykoukal, J., Lechler, P., Zeitler, K., Gehmert, S., Schreml, S., ... Prantl, L. (2012). Noninvasive in vivo assessment of muscle impairment in the mdx mouse model - A comparison of two common wire hanging methods with two different results. *Journal of Neuroscience Methods*, 203(2), 292-297. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.10.001>
- Kolar, D. R., Mejía, D. L., Mebarak, M., & Hoek, H. (2016). Epidemiology of eating disorders in Latin America. *Current Opinion in Psychiatry*, 29(6), 363-371. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000279>
- Kwon, Y. H., Kim, J., Kim, C. S., Tu, T. H., Kim, M. S., Suk, K., ... Yu, R. (2017). Hypothalamic lipid-laden astrocytes induce microglia migration and activation. *FEBS Letters*, 591(12), 1742-1751. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12691>

- Lee, T. J., & Kinzig, K. P. (2017). Repeated adolescent activity-based anorexia influences central estrogen signaling and adulthood anxiety-like behaviors in rats. *Physiology and Behavior*, 171, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.12.039>
- Li, M., Vizzard, M. A., Jaworski, D. M., & Galbraith, R. (2006). The weight loss elicited by cobalt protoporphyrin is related to decreased activity of nitric oxide synthase in the hypothalamus. *Journal of Applied Physiology*, 100(6), 1983–1991. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01169.2005>
- Lindfors, C., Nilsson, I. A. K., Garcia-Roves, P. M., Zuberi, A. R., Karimi, M., Donahue, L. R., ... Johansen, J. E. (2011). Hypothalamic mitochondrial dysfunction associated with anorexia in the anx/anx mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(44), 18108–18113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114863108>
- Ling, E. A., Paterson, J. A., Privat, A., Mori, S., & Leblond, C. P. (1973). Investigation of glial cells in semithin sections. I. Identification of glial cells in the brain of young rats. *Journal of Comparative Neurology*, 149(1), 43–71. <https://doi.org/10.1002/cne.901490104>
- Lock, J. (2015). An Update on Evidence-Based Psychosocial Treatments for Eating Disorders in Children and Adolescents. *Journal of Clinical Child and Adolescent Psychology*, 44(5), 707–721. <https://doi.org/10.1080/15374416.2014.971458>
- Loy, I., & Hall, G. (2002). Taste aversion after ingestion of lithium chloride: An associative analysis. *Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B: Comparative and Physiological Psychology*, 55(4), 365–380. <https://doi.org/10.1080/02724990244000070>
- Maltais, L. J., Lane, P. W., & Beamer, W. G. (1984). Anorexia, a recessive mutation causing starvation in preweanling mice. *Journal of Heredity*, 75(6), 468–472. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a109987>
- Mancilla-Díaz, J. M., Franco-Paredes, K., Vázquez-Arévalo, R., López-Aguilar, X., Álvarez-

- Rayón, G., & Téllez-Girón, M. T. O. (2007). A Two-Stage Epidemiologic Study on Prevalence of Eating Disorders in Female University Students in Mexico. *European Eating Disorders Review*, 15, 463–470. <https://doi.org/10.1002/erv>
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2005). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4a), 609–614. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000400008>
- Marcondes, Fernanda Klein, Miguel, K. J., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology and Behavior*, 74(4–5), 435–440. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00593-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00593-5)
- Masoro, E. J. (1988). Food restriction in rodents: An evaluation of its role in the study of aging. *Journals of Gerontology*, 43(3), B59–64. <https://doi.org/10.1093/geronj/43.3.B59>
- Mattar, L., Thiébaud, M. R., Huas, C., Cebula, C., & Godart, N. (2012). Depression, anxiety and obsessive-compulsive symptoms in relation to nutritional status and outcome in severe anorexia nervosa. *Psychiatry Research*, 200(2–3), 513–517. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2012.04.032>
- Milton, L. K., Oldfield, B. J., & Foldi, C. J. (2018). Evaluating anhedonia in the activity-based anorexia (ABA) rat model. *Physiology and Behavior*, 194, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.06.023>
- Morgane, P. J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., ... Galler, J. R. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17(1), 91–128. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80234-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80234-9)
- Morton, G., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443(7109), 289–295.

<https://doi.org/10.1038/nature05026>

Morton, G., Meek, T., & Schwartz, M. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(6), 367–378.

<https://doi.org/10.1038/nrn3745>

Mrosovsky, N., & Sherry, D. F. (1980). Animal Anorexias. *Science*, 207(4433), 837–842.

<https://doi.org/10.1126/science.6928327>

Nachman, M. (1970). Learned taste and temperature aversions due to lithium chloride sickness after temporal delays. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 73(1), 22–30. <https://doi.org/10.1037/h0029807>

Naik, A. A., Patro, N., Seth, P., & Patro, I. K. (2017). Intra-generational protein malnutrition impairs temporal astrogenesis in rat brain. *Biology Open*, 6(7), 931–942.

<https://doi.org/10.1242/bio.023432>

Nilsson, I. A. K. (2019). The anx/anx Mouse – A Valuable Resource in Anorexia Nervosa Research. *Frontiers in Neuroscience*, 13(February), 1–7.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00059>

Nilsson, I. A. K., Thams, S., Lindfors, C., Bergstrand, A., Cullheim, S., Hökfelt, T., & Johansen, J. E. (2011). Evidence of hypothalamic degeneration in the anorectic anx/anx mouse.

GLIA, 59(1), 45–57. <https://doi.org/10.1002/glia.21075>

O’Hara, C. B., Campbell, I. C., & Schmidt, U. (2015). A reward-centred model of anorexia nervosa: A focussed narrative review of the neurological and psychophysiological literature. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 52, 131–152.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.02.012>

Orozco-Ibarra, M., & Pedraza-Chaverrí, J. (2010). Hemo oxigenasa: Aspectos básicos y su importancia en el sistema nervioso central. *Archivos de Neurociencia*, 15(1), 47–55.

Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/arcneu/ane-2010/ane101j.pdf>

- Pare, W. P. (1965). Stress and consummatory behavior in the albino rat. *Psychological Reports*, 16(2), 399–405.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2466/pr0.1965.16.2.399>
- Parker, J. A., & Bloom, S. R. (2012). Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology*, 63(1), 18–30.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.02.004>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.). China: Academic Press.
- Paz, M. M., Valente, G. B., Tasca, C. I., de Mattos, A. G., & Pureur, R. P. (1991). Malnutrition induces an increase in intermediate filament protein content of rat cerebral cortex. *The Journal of Nutrition*, 121(9), 1349–1354. Recuperado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=1908892
- Peic, D., & Hernández, V. (2016). Countee. Krushka Design D de RL de CV. Recuperado de <https://www.counteeapp.com/>
- Randaccio, L., Geremia, S., Demitri, N., & Wuerges, J. (2010). Vitamin B12: Unique metalorganic compounds and the most complex vitamins. *Molecules*, 15(5), 3228–3259. <https://doi.org/10.3390/molecules15053228>
- Reyes-Haro, D., Labrada-Moncada, F. E., Miledi, R., & Martínez-Torres, A. (2015). Dehydration-induced anorexia reduces astrocyte density in the rat corpus callosum. *Neural Plasticity*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/474917>
- Reyes-Haro, D., Labrada-Moncada, F. E., Varman, D. R., Krüger, J., Morales, T., Miledi, R., & Martínez-Torres, A. (2016). Anorexia Reduces GFAP+ Cell Density in the Rat Hippocampus. *Neural Plasticity*, 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/2426413>
- Reynolds, E. (2006). Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurology*,

5(11), 949–960. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70598-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70598-1)

Richard, D. (2015). Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(8), 489–501.

<https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.103>

Rogge, G., Jones, D., Hubert, G. W., Lin, Y., & Kuhar, M. J. (2008). CART peptides: Regulators of body weight, reward and other functions. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(10), 747–758. <https://doi.org/10.1038/nrn2493>

Ross, R. A., Mandelblat-Cerf, Y., & Versteegen, A. M. J. (2016). Interacting neural processes of feeding, hyperactivity, stress, reward, and the utility of the activity-based anorexia model of anorexia nervosa. *Harvard Review of Psychiatry*, 24(6), 416–436.

<https://doi.org/10.1097/HRP.0000000000000111>

Rossi, M. A., & Stuber, G. D. (2017). Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. *Cell Metabolism*, 27(1), 42–56.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.021>

Sam, A. H., Troke, R. C., Tan, T. M., & Bewick, G. A. (2012). The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology*, 63(1), 46–56.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.10.008>

Scheurink, A. J. W., Boersma, G. J., Nergårdh, R., & Södersten, P. (2010). Neurobiology of hyperactivity and reward: Agreeable restlessness in Anorexia Nervosa. *Physiology and Behavior*, 100(5), 490–495. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.03.016>

Sclafani, A., Bahrani, M., Zukerman, S., & Ackroff, K. (2010). Stevia and saccharin preferences in rats and mice. *Chemical Senses*, 35(5), 433–443.

<https://doi.org/10.1093/chemse/bjq033>

Sclafani, A., Thompson, B., & Smith, J. C. (1998). The rat's acceptance and preference for sucrose, maltodextrin, and saccharin solutions and mixtures. *Physiology and Behavior*,

63(4), 499–503. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00478-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00478-2)

Sheikh, I. (2016). Cobalt Poisoning: A Comprehensive Review of the Literature. *Journal of Medical Toxicology and Clinical Forensic Medicine*, 2(2), 1–6.

<https://doi.org/10.21767/2471-9641.100017>

Shimizu, N., Oomura, Y., & Kai, Y. (1989). Stress-induced anorexia in rats mediated by serotonergic mechanisms in the hypothalamus. *Physiology and Behavior*, 46(5), 835–841. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90045-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90045-0)

Siegfried, Z., Berry, E. M., Hao, S., & Avraham, Y. (2003). Animal models in the investigation of anorexia. *Physiology and Behavior*, 79(1), 39–45. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00103-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00103-3)

Simerly, R. (2015). Organization of the Hypothalamus. En G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System* (4th ed., pp. 267–294). Academic Press.

Sisó, S., Jeffrey, M., & González, L. (2010). Sensory circumventricular organs in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 120(6), 689–705. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0743-5>

Smith, G. (1989). Animal Models of Human Eating Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 575, 63–74. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb53233.x>

Smith, J. C., & Sclafani, A. (2002). Saccharin as a sugar surrogate revisited. En *Appetite* (Vol. 38, pp. 155–160). Elsevier. <https://doi.org/10.1006/appe.2001.0467>

Smith, P., & Ferguson, A. (2008). Neurophysiology of hunger and satiety. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 14(2), 96–104. <https://doi.org/10.1002/ddrr.13>

Smith, T., Drummond, G., & Kappas, A. (1986). Cobalt-Protoporphyrin Suppresses Thyroid and Testicular Hormone Concentrations in Rat Serum : A Novel Action of this Synthetic Heme Analogue. *Pharmacology*, 34, 9–16.

- Steinglass, J. E., & Walsh, B. T. (2016). Neurobiological model of the persistence of anorexia nervosa. *Journal of Eating Disorders*, 4(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1186/s40337-016-0106-2>
- Tasneem, A. (2018). Neurobiological Underpinnings of Anorexia Nervosa. *University of Toronto Medical Journal*, 95(2), 41–44.
- Thunell, S. (2000). Porphyrins, porphyrin metabolism and porphyrias. I. Update. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 60(7), 509–540.
<https://doi.org/10.1080/003655100448310>
- Titova, O. E., Hjorth, O. C., Schiöth, H. B., & Brooks, S. J. (2013). Anorexia nervosa is linked to reduced brain structure in reward and somatosensory regions: A meta-analysis of VBM studies. *BMC Psychiatry*, 13(110), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-13-110>
- Treasure, J., Claudino, A. M., & Zucker, N. (2010). Eating disorders. *The Lancet*, 375, 583–593. <https://doi.org/10.1201/9781315380612>
- Turner, M. B., Corp, E. S., & Galbraith, R. (1994). Lack of NPY-induced feeding in cobalt protoporphyrin-treated rats is a postreceptor defect. *Physiology and Behavior*.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90336-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90336-0)
- Unikel-Santoncini, C., Bojórquez-Chapela, I., Villatoro-Velázquez, J., Fleiz-Bautista, C., & Medina-Mora Icaza, M. E. (2006). Conductas alimentarias de riesgo en población estudiantil del Distrito Federal: Tendencias 1997-2003. *Revista de Investigación Clínica*, 58(1), 15–27.
- Val-Laillet, D., Aarts, E., Weber, B., Ferrari, M., Quaresima, V., Stoeckel, L. E., ... Stice, E. (2015). Neuroimaging and neuromodulation approaches to study eating behavior and prevent and treat eating disorders and obesity. *NeuroImage: Clinical*, 8, 1–31.
<https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.03.016>

- Valassi, E., Scacchi, M., & Cavagnini, F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(2), 158–168.
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2007.06.004>
- Van Leeuwen, S. D., Bonne, O. B., Avraham, Y., & Berry, E. M. (1997). Separation as a new animal model for self-induced weight loss. *Physiology and Behavior*, 62(1), 77–81.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00144-3)
- Woods, S. C., & D'Alessio, D. A. (2008). Central control of body weight and appetite. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(11 SUPPL. 1), 37–50.
<https://doi.org/10.1210/jc.2008-1630>
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Yasoshima, Y., & Sakai, N. (1994). Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behavioural Brain Research*, 65(2), 123–137.
[https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90097-3](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90097-3)
- Yang, L., Qi, Y., & Yang, Y. (2015). Astrocytes Control Food Intake by Inhibiting AGRP Neuron Activity via Adenosine A1 Receptors. *Cell Reports*, 11(5), 798–807.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.002>
- Zgheib, S., Méquinion, M., Lucas, S., Leterme, D., Ghali, O., Tolle, V., ... Chauveau, C. (2014). Long-Term physiological alterations and recovery in a mouse model of separation associated with time-restricted feeding: A tool to study anorexia nervosa related consequences. *PLoS ONE*, 9(8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103775>
- Zipfel, S., Giel, K. E., Bulik, C. M., Hay, P., & Schmidt, U. (2015). Anorexia nervosa: Aetiology, assessment, and treatment. *The Lancet Psychiatry*, 2(12), 1099–1111.
[https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(15\)00356-9](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(15)00356-9)

Anexos

Anexo 1. Correlación de los resultados de conducta entre el evaluador y un observador externo.

