

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALIMENTARIA POR LOS
NEUROPEPTIDOS CRF, β -ENDORFINA Y GALANINA EN PECES
CIPRÍNIDOS (*Carassius auratus* y *Tinca tinca*).**

V^oB^o, Las directoras



Mercedes Alonso Bedate



María Jesús Delgado Saavedra



Nuria de Pedro Ormeño

Memoria presentada por Nuria de Pedro Ormeño para
obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, 31 de Enero de 1.995

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Animal II de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la codirección de las Dras Mercedes Alonso Bedate y María Jesús Delgado Saavedra, contando con el apoyo económico prestado por la Becas Predoctoral del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia (1991-1994), y el Proyecto de Investigación DGICYT PB 91-0400 subvencionado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.

A mi Familia

A Ernesto

AGRADECIMIENTOS

Durante todos estos años he tenido la oportunidad de trabajar al lado de personas que han permitido que disfrutaré con el trabajo, creo que es lo máximo que podría pedir, disfrutar trabajando. Quiero dar las gracias a mi equipo de investigación, y a todas las personas de dentro y fuera de este departamento, involucradas o no con la "ciencia", sin las que este trabajo no hubiera podido realizarse.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra Mercedes Alonso permitirme incorporarme a su grupo de investigación, ofrecerme lo que estaba a su alcance y confiar en mí. Y a la Dra María Jesús Delgado, que desde el primer día me contagió su ilusión por la investigación, siendo un estímulo y un punto de apoyo muy importante para mí.

A la Dra Mónica de la Fuente, como directora del Departamento, por atender de forma tan agradable cualquier "trámite" que haya necesitado.

Al Dr. Javier Fernández, por iniciarme en el "enigmático" mundo del HPLC y atender mis dudas amablemente.

Quiero agradecer al director del Centro Nacional de Ciprinicultura "Vegas del Guadiana", D. J. Pérez Regadera la donación desinteresada de las tencas utilizadas en esta Tesis.

Como ya he mencionado, quiero agradecer a todas las personas que han pasado por nuestro grupo de investigación, su ayuda, cada una en la medida de sus posibilidades, en tantas y tantas ocasiones, a la hora de inyectar, de obtener muestras, con los ordenadores y en un sinnúmero de situaciones. A Angel Luis, por sus numerosos y valiosos consejos informáticos y científicos cuando yo estaba empezando, y después incluso de marcharse. A Begoña, mi primera compañera de venturas y desventuras en el laboratorio, con la que compartí muchas horas de trabajo durante aquellos largos días en que "tocaban" tiroideas. A Ana, siempre dispuesta a echar una mano. Y a Virtu, que comenzó ayudándome con el mantenimiento de los peces, y con su alegría y nobleza, finalmente se ha convertido en una buena amiga.

A Rosa, por ese *don* de generosidad y amabilidad desmesurada, y ofrecerme todo su cariño desde el primer día que entre en el departamento.

A Mónica y Dolo, por los buenos ratos que pasamos dentro y fuera del departamento.

A Cari y Susana, por enseñarnos que se puede trabajar en grupo y ser buenas compañeras. Gracias por vuestra simpatía y alegría.

A Mari Paz, por ser y hacer tan "dulce" la vida.

Gracias a todas ellas, y a los "chicos del departamento", Manuel, Alberto y Alejandro, y a esas tertulias a la hora de la comida que servían como estímulo para seguir con el trabajo.

A Fernando, por su gran ayuda con la histología y con todo lo relacionado con el material fotográfico de esta Tesis.

Como compañera y amiga, agradezco a María Jesús todo lo que me ha dado durante estos años, que ha sido mucho y no podría reflejar en unas breves líneas, aunque me gustaría resaltar su ilusión, voluntad, constancia y generosidad a la hora de hacer ciencia y de vivir.

A "Chiruca", que aún no habiendo podido estar a mi lado estos años, me dejó presente su ilusión por la vida y su afán incansable por aprender.

A Anita, por estar dispuesta a ayudar siempre, y dedicar su vida, desinteresadamente, al servicio de los demás.

Quiero agradecer a Membrillera y a mis amigos de allí, la posibilidad de evadirme de esta ciudad los fines de semana, disfrutando de un ambiente tranquilo y cordial, que me ha ayudado tanto en los momentos difíciles.

A mi familia, por confiar siempre en mí y apoyarme en todos mis proyectos. Porque soportaron durante estos años mi ausencia de la "vida familiar", permitiéndome, muy especialmente mi madre, dedicar todas las horas del día a este trabajo. Os quiero mucho.

Y como olvidar la inestimable ayuda que supuso el ordenador de mi hermano, pudiendo realizar gran parte de la redacción de esta Tesis en mi casa, siendo mucho más llevaderas las noches y fines de semana de trabajo. Porque se lo compró con mucha ilusión, para apenas luego utilizarlo debido a que he sido una "ocupa" permanente. Gracias por ser siempre tan generoso.

A Ernesto, por su paciencia y continuo apoyo, especialmente en estos últimos meses, y por compartir conmigo con alegría y ternura esta parte de la historia de mi vida. Por ser mi mejor amigo, gracias.

ABREVIATURAS

- A, Adrenalina.
- ACTH, Corticotropina.
- Ago, Agonista.
- AMPc, Adenosín monofosfato cíclico.
- Antago, Antagonista.
- B, Fracción tiroidea unida.
- β -E, β -Endorfina.
- CCK, Colecistoquinina.
- CRF, Factor liberador de corticotropina.
- CV, Coeficiente de variación de la media.
- DA, Dopamina.
- DHBA, 3,4-dihidroxibenzilamina.
- DOPAC, Ácido 3,4-dihidroxifenilacético.
- F, Fracción tiroidea libre.
- f_R , Factor de respuesta.
- Gal, Galanina.
- GH, Hormona de crecimiento.
- Hip., Hipotálamo.
- HMPG, 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol.
- HPLC, Cromatografía líquida de alta resolución.
- HT, Hormonas tiroideas.
- ING, Ingestión de alimento o ingesta.
- ICV, Intracerebroventricular.
- IP, Intraperitoneal.
- ir, Inmunorreactivo.
- K_D , Constante de disociación.
- MSH, Hormona estimuladora de melanóforos.
- NA, Noradrenalina.
- NAT, Serotonina N-acetiltransferasa.
- NPV, Núcleo paraventricular.
- POMC, Proopiomelanocortina.
- Prot., Proteínas.

- RIA, Radioinmunoensayo.
- SNC, Sistema nervioso central.
- SS, Solución salina.
- t_R , Tiempo de retención.
- t_{RR} , Tiempo de retención relativo.
- T_3 , Triyodotironina.
- T_4 , Tiroxina.
- Tg, Tiroglobulina.
- TRH, Hormona liberadora de tirotropina.
- TSH, Hormona liberadora de HT o tirotropina.
- TH, Tirosina hidroxilasa.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. REGULACIÓN DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO EN LOS PECES	2
1.1. Introducción	2
1.2. Áreas encefálicas implicadas	3
1.3. Relación entre la ingesta y el peso corporal	4
1.4. Factores que afectan al comportamiento alimentario	5
1.4.1 SEÑALES SENSORIALES	5
1.4.2 SEÑALES GASTROINTESTINALES	6
1.4.3 FACTORES METABÓLICOS	7
1.4.4 FACTORES HORMONALES	8
1.4.5 FACTORES AMBIENTALES	9
2. NEUROPEPTIDOS COMO REGULADORES DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO	11
2.1. Introducción	11
2.2. CRF	14
2.2.1 ESTRUCTURA	14
2.2.2 DISTRIBUCIÓN	15
2.2.3 RECEPTORES Y MECANISMOS DE ACCIÓN	15
2.2.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA. REGULACIÓN DE LA INGESTA	17
2.3. β -endorfina	19
2.3.1 ESTRUCTURA	19
2.3.2 DISTRIBUCIÓN	20
2.3.3 RECEPTORES Y MECANISMOS DE ACCIÓN	21
2.3.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA. REGULACIÓN DE LA INGESTA	23
2.4. Galanina	26
2.4.1 ESTRUCTURA	26
2.4.2 DISTRIBUCIÓN	27
2.4.3 RECEPTORES Y MECANISMOS DE ACCIÓN	28
2.4.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA. REGULACIÓN DE LA INGESTA	29
2.5. Interacciones neuropéptidos-catecolaminas encefálicas	31
2.5.1 CATECOLAMINAS ENCEFÁLICAS	31
2.5.2 CRF-CATECOLAMINAS	31

2.5.3 β -ENDORFINA-CATECOLAMINAS	34
2.5.4 GALANINA-CATECOLAMINAS	34
3. INTERACCIÓN ACTIVIDAD TIROIDEA-ALIMENTACIÓN	34
3.1. Introducción	34
3.1.1 ANATOMÍA DEL TIROIDES EN LOS PECES	35
3.1.2 HORMONAS TIROIDEAS	35
3.1.3 REGULACIÓN DEL EJE TIROIDEO EN LOS PECES	36
3.2. Interacciones de la actividad tiroidea con la alimentación	40
II. OBJETIVOS	42
III. MATERIALES Y MÉTODOS	46
1. MATERIALES	47
1.1. Productos	47
1.2. Instrumental	50
1.3. Material biológico: obtención y mantenimiento	51
2. MÉTODOS	52
2.1. Técnicas de microinyección	53
2.2. Obtención de muestras	56
2.3. Técnicas histológicas	61
2.4. Técnicas analíticas	62
2.4.1 VALORACIÓN DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO	62
2.4.2 VALORACIÓN DE GLUCOSA PLASMÁTICA	63
2.4.3 VALORACIÓN DE GLUCÓGENO HEPÁTICO	64
2.4.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	65
2.4.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEROTONINA N-ACETILTRANSFERASA (NAT)	66
2.4.6 CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS POR RADIOINMUNOENSAYO (RIA)	68
2.4.7 CUANTIFICACIÓN DE CATECOLAMINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	78
2.5. Diseños experimentales	83
2.5.1 CONDICIONES DE MANTENIMIENTO	83
2.5.2 CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN ALIMENTARIO EN <i>T. tinca</i>	84
2.5.3 REGULACIÓN DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO POR EL CRF	86
2.5.4 REGULACIÓN DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO POR β -ENDORFINA	91
2.5.5 REGULACIÓN DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO POR GALANINA	93

2.6. Análisis estadístico de los resultados	94
2.6.1 ANÁLISIS DE REGRESIÓN Y CORRELACIÓN	95
2.6.2 TEST <i>t</i> DE STUDENT	96
2.6.3 ANÁLISIS DE LA VARIANZA Y TEST DE DUNCAN DE COMPARACIONES MÚLTIPLES	96
IV. RESULTADOS	98
1. VALIDACIÓN DE LOS RIAs DE HORMONAS TIROIDEAS Y CORTISOL	142
1.1. Hormonas tiroideas	99
1.2. Cortisol	107
2. VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE CATECOLAMINAS POR HPLC	111
3. CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN ALIMENTARIO EN <i>Tinca tinca</i> . . .	124
3.1. Determinación del patrón alimentario	129
3.2. Determinación de parámetros metabólicos y hormonales	129
4. REGULACIÓN DE LA INGESTA POR EL CRF	140
4.1. Optimización del test de ingesta en <i>Carassius auratus</i>	141
4.2. Administración ICV e IP de CRF. Efecto sobre la ingesta	141
4.3. Interacción CRF-alimentación-hormonas tiroideas	145
4.4. Efecto del ayuno sobre las catecolaminas en hipotálamo	153
4.5. Efecto del antagonista específico del CRF, α -Helical CRF _[9-41]	154
4.6. Cortisol como mediador del efecto del CRF sobre la ingesta	161
4.7. Control catecolaminérgico del efecto del CRF sobre la ingesta	162
5. REGULACIÓN DE LA INGESTA POR LA β -ENDORFINA	168
5.1. Administración ICV e IP de β -Endorfina. Efecto sobre la ingesta	169
5.2. Efecto de la β -Endorfina sobre la ingesta, glucosa, hormonas tiroideas y catecolaminas hipotalámicas	169
5.3. Control por los distintos tipos de receptores opioidérgicos	175
6. REGULACIÓN DE LA INGESTA POR LA GALANINA	180
6.1. Administración ICV e IP de galanina. Efecto sobre la ingesta	181
6.2. Efecto de la galanina sobre la ingesta, glucosa, hormonas tiroideas y catecolaminas hipotalámicas	181
6.3. Efecto del antagonista galantida	181
6.4. Control α -adrenérgico	190

V. DISCUSIÓN	196
1. CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN ALIMENTARIO EN <i>Tinca tinca</i>	195
1.1. Determinación del patrón alimentario	198
1.2. Determinación de parámetros metabólicos y hormonales	199
2. REGULACIÓN DE LA INGESTA POR EL CRF	207
2.1. Efecto del CRF sobre la ingesta	207
2.2. Interacciones CRF-alimentación-hormonas tiroideas	212
2.3. Especificidad del efecto anorético del CRF	216
2.4. Control catecolaminérgico del efecto anorético del CRF	218
3. REGULACIÓN DE LA INGESTA POR β -ENDORFINA	224
3.1. Efecto de la β -endorfina sobre la ingesta	224
3.2. Interacciones β -endorfina-hormonas tiroideas-catecolaminas	225
3.3. Control por los distintos tipos de receptores opioidérgicos	227
4. REGULACIÓN DE LA INGESTA POR GALANINA	230
4.1. Efecto de la galanina sobre la ingesta	230
4.2. Interacciones galanina-hormonas tiroideas-catecolaminas	232
4.3. Especificidad del efecto estimulador de la ingesta por galanina	232
4.4. Control α -adrenérgico	233
VI. CONCLUSIONES	235
VII. BIBLIOGRAFÍA	238

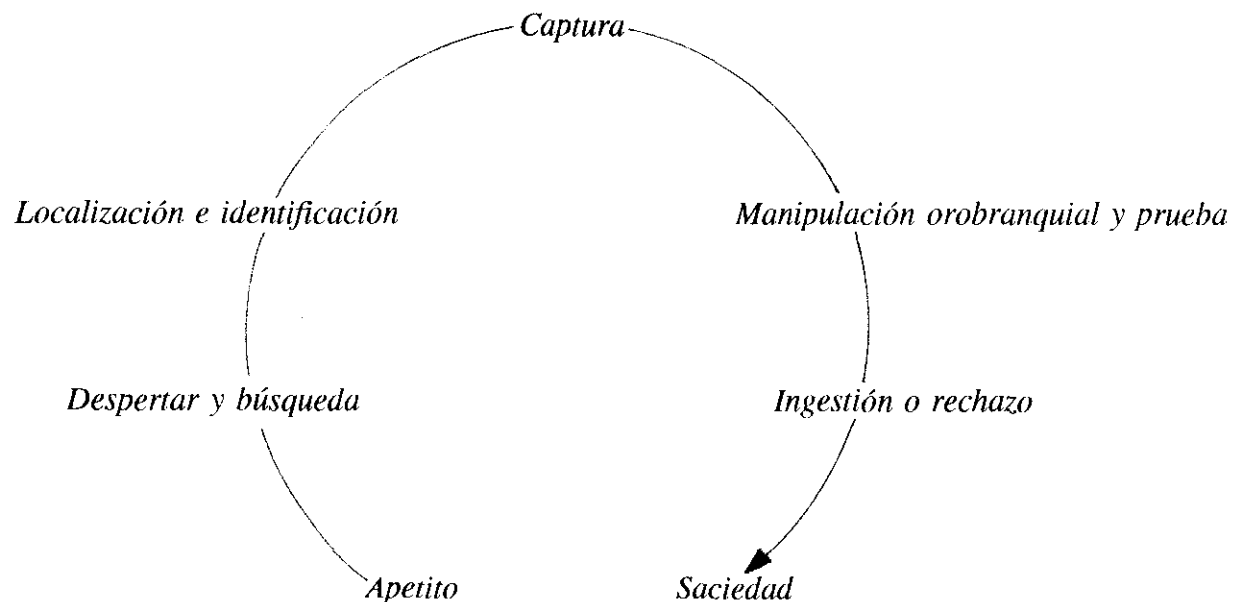
I. INTRODUCCIÓN

1. REGULACIÓN DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO EN LOS PECES.

1.1. Introducción.

Los peces se han adaptado a una gran variedad de ambientes, y esta adaptación al ambiente necesariamente ha llevado implícita una adaptación de su ciclo vital a las fluctuaciones de la disponibilidad de alimento. Parte de esta adaptación puede implicar también la regulación de la ingestión de alimento (Peter, 1979). El conocimiento de los factores que afectan a dicha ingestión de alimento en los peces es muy escaso, a pesar de los numerosos estudios existentes sobre los requerimientos nutritivos para mejorar las tasas de supervivencia y crecimiento de especies de cultivo (Cowey y Sargent, 1979; Ketola, 1982; Pfeffer, 1982; Watanabe, 1982). Por el contrario, la regulación de la ingesta en otros vertebrados, especialmente en los mamíferos, ha sido ampliamente estudiada y, por tanto, aunque hemos intentado revisar la escasa literatura existente en los peces, tomaremos como referencia los conocimientos más sólidamente establecidos en los mamíferos.

En un intento de esquematizar la respuesta del pez ante la sensación de apetito, es decir, el "comportamiento alimentario", Knights (1985) considera la siguiente secuencia estereotipada de seis etapas:



La causa que desencadena la compleja trama de componentes del comportamiento alimentario es la aparición de la sensación de apetito cuya eliminación es el objetivo último de dicho comportamiento. Los mecanismos (físicos y químicos) de detección del alimento ofrecido, así como sus características físicas y organolépticas en general (presentación, textura, sabor, ...), conducirán a su aceptación e ingestión, o rechazo y, en consecuencia, a la neutralización o no de la sensación de apetito que desencadenó el proceso.

1.2. Áreas encefálicas implicadas.

Está ampliamente admitido que el hipotálamo desempeña un papel central en el control nervioso de la ingestión de alimento en mamíferos (Bernardis y Bellinger, 1987; Guyton, 1991; Rolls y Mora, 1992; Bernardis y Bellinger 1993; Bray, 1993; Hoebel y Hernández, 1993). La estimulación eléctrica del hipotálamo lateral aumenta tanto la frecuencia de alimentación, como la cantidad de alimento ingerido en cada comida, incluso en animales previamente saciados. Por otra parte, si se estimulan los núcleos ventromediales del hipotálamo, el resultado será de saciedad completa aunque el animal estuviera previamente en ayuno. En los experimentos de lesión de cualquiera de estas áreas hipotalámicas específicas se han obtenido resultados exactamente opuestos a la estimulación de las mismas. El hipotálamo lateral se ha denominado, por tanto, "centro del hambre" y el hipotálamo ventromedial "centro de la saciedad".

Muy pronto surgieron problemas de interpretación del control de la ingestión de alimento basado en este sencillo modelo de un centro cerebral doble, de hambre y saciedad. Así, aunque el papel del hipotálamo lateral y ventromedial parece claro en este proceso, también intervienen otras áreas hipotalámicas como el núcleo paraventricular (NPV) y núcleo dorsomedial, y extrahipotalámicas como el sistema límbico, que parecen interactuar tanto sobre áreas laterales como ventromediales del hipotálamo.

En los **peces**, las técnicas de investigación utilizadas han sido similares a las descritas para mamíferos, esto es, estimulación eléctrica o lesión de áreas concretas del sistema nervioso central (SNC).

Grim (1960) realizó los primeros estudios de estimulación eléctrica relacionados con la alimentación en peces, demostrando que la estimulación del tracto olfatorio y regiones del telencéfalo dorsal desencadenaba respuestas alimentarias en *Carassius auratus*. Posteriormente se llevaron a cabo experimentos similares estimulando otras áreas encefálicas

en *C. auratus* y se ampliaron los estudios a otras especies de peces (véase rev. Demski, 1983). Concretamente en perciformes (*Lepomis macrochirus*), Demski y Knigge (1971) demostraron que la estimulación eléctrica de la región que rodea al receso lateral del tercer ventrículo producía respuestas alimentarias. Resultados similares fueron obtenidos posteriormente también en el perciforme *Tilapia macrocephala* (Demski, 1973) y en el propio *C. auratus* (Savage y Roberts, 1975).

Los experimentos con tilapia (Demski, 1973) sugerían que el telencéfalo estaba implicado en el comportamiento alimentario, ya que la estimulación eléctrica de fibras del tracto olfatorio procedentes del telencéfalo y que se dirigen hacia la región preóptica y continúan hacia el lóbulo inferior del hipotálamo también provoca respuestas alimentarias. Sin embargo, dado que la ablación completa o prácticamente completa del telencéfalo no anula totalmente la conducta alimentaria en *C. auratus* (Savage, 1969), se piensa que esta región no es una parte esencial en el control nervioso de la alimentación en los teleósteos.

El conjunto de datos anteriores sugiere que el lóbulo inferior del hipotálamo (también llamado lóbulo lateral) está involucrado en el control del comportamiento alimentario en los peces, especialmente en la iniciación del mismo, no existiendo evidencias de una función hipotalámica o de otras áreas del SNC relacionadas con la saciedad.

1.3. Relación entre la ingesta y el peso corporal.

Si como se ha expuesto repetidamente para mamíferos (Guyton, 1991; Langhans y Scharrer, 1992; Rolls y Mora, 1992), un animal tiende a ajustar su ingestión cuantitativa de alimentos a la ingesta necesaria para mantener un peso corporal de referencia ("set-point"), variable según sexo, edad, estaciones, etc., parece inmediato que la propia composición del alimento ofrecido o conseguido influya en la cantidad del mismo que el animal ingiere. Expuesto en otros términos, el animal debe poseer la capacidad de ajustar la magnitud de su ingesta a la de sus requerimientos de nutrientes.

Los primeros estudios que ofrecían información al respecto en peces fueron los de Rozin y Mayer en 1961 con el pez dorado (*C. auratus*). Basados en diseños experimentales de condicionamiento operante en los que el pez aprende a seleccionar la cantidad de alimento que desea ingerir o el tipo del mismo mediante el golpeo de una barra conectada a un dispensador de alimento, es decir, se permite que cada animal de forma individual regule su propia ingesta, se estableció que cada pez tiene su propio ritmo diario de alimentación.

Además, se demostró que los peces ajustaban su ingestión de alimento (número de veces que golpeaban la barra) a la cantidad de nutrientes ofrecidos en cada dispensación. Así, cuando se ofrecían gránulos de menor tamaño o cuando, aún siendo del mismo tamaño, el contenido nutritivo era menor por adición de un elemento inerte, los peces para compensarlo acudían más veces al dispensador, de manera que se mantenía el mismo grado de ingesta de nutrientes. Por tanto la regulación de la ingestión de alimento parece ser, básicamente, una regulación de la ingesta de calorías para mantener un determinado peso corporal de referencia.

Estudios similares en otras especies de peces (Peter, 1979; Cuenca y García Gallego, 1987) conducen a la hipótesis de que el volumen de ingesta está en función inversa del contenido calórico de la dieta ofrecida.

Otro tipo de evidencias, en este sentido, surgen de experimentos de ayuno y realimentación (véase rev. Holmgren y cols, 1983) demostrándose que la ingesta aumenta tras un período de ayuno o restricción de alimento (durante el cual el peso corporal disminuye como consecuencia de utilizar las reservas para mantener el metabolismo) con el fin de recuperar el valor normal del peso corporal.

1.4. Factores que afectan al comportamiento alimentario.

1.4.1 SEÑALES SENSORIALES.

La eficacia en la búsqueda, localización e identificación del alimento (etapas descritas al principio de este capítulo: Knights, 1985) depende de una serie de señales visuales, químicas y físicas (Cuenca y García Gallego, 1987).

a) Señales visuales.

El estímulo visual para identificar e ingerir el alimento depende de numerosos factores como el tamaño, color, contraste y movimiento de las partículas de alimento, la intensidad de la luz y el grado de turbidez del agua (Cuenca y García Gallego, 1987; Valentincic y Caprio, 1994a). Así, por ejemplo, una luminosidad de 10^{-1} lux, es el umbral inferior a partir del cual deja de ser efectiva la localización del alimento para la mayoría de las especies de peces estudiadas.

b) Señales químicas.

Las preferencias alimentarias en la ingesta en los peces, así como en otros animales, constituyen un proceso selectivo gobernado por la composición química del alimento y por la quimiosensibilidad de los peces a ciertos componentes del mismo. Los peces reciben los estímulos químicos a través del olfato y el gusto, ya que al contrario que en los animales terrestres, la quimiorrecepción tiene lugar, en su totalidad, en el medio acuático (Cuenca y García Gallego, 1987).

Dado el interés de formular dietas con estimulantes alimentarios destinadas a especies de cultivo, en los últimos años se ha avanzado considerablemente en la identificación de sustancias químicas específicas que actúan como estimulantes alimentarios (véase rev. Fletcher, 1984a). Cabe destacar el papel que juegan los aminoácidos en la estimulación química de la alimentación (Valentincic y Caprio, 1994a y b; Valentincic y cols, 1994). En muchas ocasiones, se ha encontrado que los compuestos identificados como atrayentes químicos coinciden o están relacionados con compuestos nitrogenados abundantes en los organismos de los que se alimentan los peces en su hábitat natural.

c) Señales físicas.

Posteriormente a la localización se produce la identificación del alimento con las partículas ya en la boca. El alimento es manipulado antes de ser deglutido, y en este momento, además del sabor, se prueban la dureza, abrasividad, y la facilidad para deglutir el alimento, llegando como resultado a ingerirlo o expulsarlo.

Knights (1983) encontró que la forma y la simetría de las partículas del alimento son importantes, produciéndose un gran rechazo a gránulos que presentaban una relación longitud/diámetro grande. Así, el límite inferior del tamaño óptimo viene determinado por la facilidad de localización de las partículas, mientras que el límite superior viene dictado por la morfometría de la boca. Para alimentos blandos se ha encontrado una relación 1:1 entre el diámetro óptimo de la partícula y la anchura de la boca, mientras que para las dietas duras y/o abrasivas, dicha relación está comprendida entre 0,4-0,6.

1.4.2 SEÑALES GASTROINTESTINALES.

La información de la presencia de alimento en el tracto gastrointestinal puede ser obtenida a partir de tres mecanismos: distensión gastrointestinal, liberación de hormonas gastrointestinales y a través de los efectos de los nutrientes absorbidos (Bray, 1993).

La distensión mecánica del estómago o el intestino delgado ha sido considerada como uno de los estímulos para inducir sensación de saciedad en mamíferos (Guyton, 1991; Rolls y Mora, 1992). En peces, también existen estudios que relacionan la aparición de la sensación de hambre con el grado de vaciamiento gástrico (Grove y cols, 1978). En algunas especies se han encontrado correlaciones estrechas entre el tiempo necesario para vaciar el estómago y el requerido para que aparezca de nuevo la sensación de apetito tras una comida. Sin embargo, existen otros datos que sugieren que el vaciado gástrico por sí sólo no controla la cantidad de alimento ingerido (véase rev. Fänge y Grove, 1979; Holmgren y cols, 1983; Fletcher, 1984a).

Aunque existen numerosas hormonas gastrointestinales implicadas en la regulación de la alimentación en mamíferos, como la colecistoquinina (CCK), bombesina, péptido liberador de gastrina, somatostatina, motilina, etc. (Johnson, 1987; Morley, 1987; Morley y Silver, 1991), no hay por el momento datos en este sentido en peces.

Los efectos de los nutrientes absorbidos en la regulación de la ingesta se desarrollan más detalladamente a continuación, incluidos en el apartado de factores metabólicos.

1.4.3 FACTORES METABÓLICOS.

Los niveles circulantes de determinados metabolitos y, en estrecha relación con ellos, los de algunas hormonas, parecen jugar un importante papel en la regulación de la alimentación en mamíferos (Guyton, 1991; Langhans y Scharrer, 1992; Rolls y Mora, 1992; Bray, 1993). Uno de los modelos más sólidamente establecidos dentro de este campo ha sido el de la teoría glucostática, según la cual, los niveles plasmáticos de glucosa serían monitorizados por receptores situados en el hipotálamo o en localizaciones periféricas (sistema porta hepático), estimulando o inhibiendo el comportamiento alimentario dependiendo de niveles bajos o altos de glucosa en sangre. Estudios similares han demostrado un efecto semejante en función de las concentraciones sanguíneas de aminoácidos o productos de la degradación de lípidos, lo que ha llevado a la elaboración de las teorías de regulación aminostática y lipostática. Es decir, cuando disminuye la disponibilidad de cualquiera de los tres tipos principales de nutrientes, el animal incrementa automáticamente su ingestión de alimento, con lo que logrará recuperar finalmente concentraciones normales de nutrientes en sangre.

La situación en los peces es un tanto incierta encontrándonos con numerosas contradicciones (véase rev. Holmgren y cols, 1983). Efectivamente, si bien algunos autores como Bellamy (1968) demostraron que cuanto más baja era la glucemia que precedía a la comida, más intensa era ésta; otros autores encontraron justamente lo contrario (Magnuson, 1969).

El nivel plasmático de aminoácidos libres está correlacionado con la dieta en los peces, incrementando después de la alimentación (Brown y Cameron, 1991; Anderson y Braley, 1993). Por otro lado, se ha descrito que una dieta deficiente en determinados aminoácidos esenciales o en proteínas provoca una ingesta reducida (véase rev. Ketola, 1982).

No está claro si los metabolitos lipídicos pueden actuar como señal del estado nutricional en peces. No obstante, el hecho de que exista un tejido adiposo movilizable en períodos de restricción alimentaria, y que se hayan detectado ciclos de almacenamiento de grasa corporal, establece la posibilidad de que los metabolitos lipídicos (ácidos grasos libres, glicerol u otros) desempeñen un papel en el comportamiento alimentario de estos animales (véase rev. Fletcher, 1984a).

1.4.4 FACTORES HORMONALES.

Se ha demostrado que numerosas hormonas pueden afectar a la regulación de la ingesta mediante un incremento o una disminución del apetito en vertebrados, aspecto especialmente estudiado en los mamíferos (Morley y Silver, 1991; Langhans y Scharrer, 1992; Bray, 1993).

Por otra parte también está ampliamente estudiado el efecto de la administración exógena de hormonas (en la dieta o inyectadas) sobre el crecimiento en numerosas especies de peces (véase rev. Donaldson y cols, 1979). No obstante, en todos los casos se plantea la cuestión del nivel al que la hormona ejerce su efecto, ya que podrían actuar estimulando la ingesta y/o mejorando la eficacia de conversión del alimento. Por ejemplo, la hormona de crecimiento (GH) (Johnsson y Björnsson, 1994) y los esteroides sexuales (Higgs y cols, 1982) incrementan tanto la ingesta como los índices de conversión del alimento (relación entre el alimento consumido y el peso ganado), mientras que el efecto de las hormonas tiroideas sobre el apetito parece estar mediado por una mejora en dichos índices. Por otra parte, la acción de una hormona puede ser directa o estar mediada a su vez por los efectos

de otras hormonas, como se sugiere que podría ocurrir con las hormonas tiroideas que estimulan la GH, o los esteroides que estimulan la función tiroidea en los peces (Higgs y cols, 1982).

1.4.5 FACTORES AMBIENTALES.

a) Temperatura.

Ya en 1961, Rozin y Mayer demostraron que cuando disminuía la temperatura del agua 10°C (de 25°C a 15°C) el pez dorado comía menos, y cuando la temperatura se incrementaba otra vez, la ingesta también lo hacía. Así, una variación de la temperatura, provocaba otra, en la misma dirección, en la cantidad de alimento ingerido, y de una magnitud similar a aquella con la que la tasa metabólica resultaba modificada por la temperatura. Por tanto, los autores concluyeron que la ingestión calórica o de alimento será la que permita mantener la tasa metabólica.

Resultados similares se han obtenido en otros teleósteos como la perca (*Micropterus salmoides*), cuyo crecimiento era mayor a 25°C y menor a 18°C, en un intervalo de temperaturas entre 18 y 30°C (Niimi y Beamish, 1974).

Las variaciones estacionales de temperatura van a desempeñar también un papel muy importante en la regulación de la ingesta. Por ejemplo, algunas especies dejan de alimentarse en los meses fríos, perdiendo incluso algo de peso, y alcanzan un máximo de ingesta y crecimiento en los más cálidos (Lagler y cols, 1984; Zanuy y Carrillo, 1985; Hairston, 1994a).

b) Fotoperíodo.

La influencia de la luz diurna sobre la ingesta en peces fue puesta de manifiesto por Krunk (1963). La luz parece ser uno de los principales sincronizadores naturales de los ritmos de actividad en peces (Mantefiel y cols, 1978). No obstante, existen datos recientes que demuestran un origen endógeno del ritmo circadiano de la actividad alimentaria en *Oncorhynchus mykiss*, indicando que la luz no es el factor determinante de dicho ritmo (Cuenca y De La Higuera, 1994a).

Algunos peces son predominantemente nocturnos y encuentran su alimento mediante el olfato y el gusto, mientras que otros se alimentan principalmente ayudándose con la vista, siendo más activos durante las horas del día. En este caso puede resultar importante el

número de horas con luz diaria, de manera que los días largos pueden ser de utilidad para lograr un crecimiento rápido (Lagler y cols, 1984).

c) Oxígeno disponible.

La ingestión de alimento produce un incremento en la respiración. La magnitud y duración de este incremento, conocido como la acción dinámica específica (ADE) del alimento consumido, depende de las propiedades físicas y nutricionales del alimento. La ADE se debe, principalmente, a la desaminación de los aminoácidos, proceso que está limitado por el oxígeno disponible (Fletcher, 1984a). En los peces, la ADE aumenta abruptamente después de la alimentación hasta alcanzar un máximo, para después decrecer más o menos regularmente hasta un punto que se puede considerar nuevamente de "pre-alimentación" (Vahl, 1979). Además, ese aumento en el consumo de oxígeno puede limitar su disponibilidad para otras actividades, como la localización de la presa (Tandler y Beamish, 1981), lo que indirectamente afectaría también al comportamiento alimentario en los peces.

d) Alimento disponible.

En la naturaleza los organismos que pueden servir de alimento a los peces no siempre están disponibles, desde el punto de vista numérico, de forma constante, debido a las fluctuaciones naturales en su abundancia. Esas fluctuaciones son a menudo cíclicas y se deben a factores propios de su desarrollo biológico, a condiciones climáticas, etc., y determinarán, a su vez, fluctuaciones en la ingesta de los peces. Las migraciones de los peces reflejan, a menudo, la necesidad de búsqueda de una fuente particularmente abundante de comida (Lagler y cols, 1984).

e) Interacciones intra- e interespecíficas.

En algunas especies de salmónidos, se han descrito efectos de interacciones intraespecíficas en el comportamiento alimentario. Por ejemplo, la jerarquía social desarrollada en poblaciones de *Salmo salar* durante la escasez de alimento determina que sólo los individuos dominantes consigan la cantidad adecuada de alimento (Fenderson y cols, 1968). De forma similar, en el ateriniforme *Oryzias latipes* (Magnuson, 1962) ante una reducción del alimento suministrado, los peces mayores resultaban socialmente dominantes y territoriales excluyendo a los subordinados del área de alimentación por interacción agresiva, lo que implica, por tanto, una ingesta mayor de alimento y mayor tasa de

crecimiento para los dominantes. De esta manera, la competición por el alimento parece ser uno de los mecanismos responsables del crecimiento heterogéneo en los peces (Volpato y Fernandes, 1994).

En contraste con lo anterior, Olla y Samet (1974) e Ishiwata (1979) encontraron una facilitación social en perciformes, donde los animales aislados dejaban de comer. Sin embargo, si se aíslan pero tienen la posibilidad de ver a un grupo comiendo, rápidamente iniciaban la ingesta.

Aunque no se han demostrado efectos de interacciones interespecíficas en el comportamiento alimentario de los peces, se han descrito alteraciones en la selección de alimento como consecuencia de interacciones entre distintas especies de salmónidos (Schultz y Northcote, 1972; Nilsson y Northcote, 1981) y entre distintas especies de perciformes (Hairston, 1994b).

2. NEUROPEPTIDOS COMO REGULADORES DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO.

2.1. Introducción.

El perfeccionamiento de las técnicas inmunohistoquímicas ha servido para demostrar morfológicamente la presencia en las neuronas no sólo de los neurotransmisores clásicos, sino también de un número cada vez más elevado de moléculas de naturaleza peptídica, los neuropéptidos, implicados en la comunicación intercelular y presentes en todo el reino animal (Brownstein, 1994). Además, ha resultado prácticamente general la localización de estos péptidos tanto en el cerebro, como en el tracto digestivo y otras muchas ubicaciones, pudiéndose hablar actualmente con propiedad de un verdadero *sistema nervioso peptidérgico*, de importancia fundamental en la regulación neuroendocrina central y periférica (Prieto, 1990).

Los neuropéptidos pueden actuar de una o varias de las siguientes maneras (Prieto, 1990):

- Localmente en sitios periféricos, como componentes del sistema nervioso autónomo.
- A nivel central, como péptidos del cerebro.

- Como neurohormonas, alcanzando los correspondientes órganos diana por la circulación general o mediante sistemas especiales (sistema porta-hipofisario).

Muchos de estos péptidos han sido localizados en áreas del SNC clásicamente conocidas por su papel en la regulación de la ingesta. Actualmente, sabemos que numerosos neuropéptidos modulan la regulación del apetito; algunos estimulan la ingesta cuando son inyectados en el núcleo paraventricular o ventromedial, como es el caso del neuropéptido Y, la galanina, los péptidos opioides, etc.; mientras que otros, como la bombesina, CCK, glucagón, insulina, neurotensina, somatostatina, factor liberador de corticotropina (CRF), etc., la inhiben (véase rev. Morley y cols, 1985; Leibowitz, 1986; Morley, 1987; Wilber, 1989; Blundell, 1991; Morley y Silver, 1991; Bray, 1992; Leibowitz, 1992).

La mayoría de los estudios realizados sobre el papel central de los neuropéptidos en la regulación de la alimentación han sido básicamente de naturaleza farmacológica, constituyendo un primer paso fundamental para alcanzar un entendimiento fisiológico, aunque ciertas precauciones son necesarias cuando se pretende extrapolar a la situación fisiológica (Morley y cols, 1985). Para asignar un verdadero papel fisiológico a un neuropéptido, Prieto (1990) considera los siguientes criterios:

- Es necesario demostrar por técnicas inmunocitoquímicas su presencia en terminaciones nerviosas.
- Debe comprobarse que el neuropéptido se libera al estimular las células nerviosas correspondientes.
- El resultado de esta estimulación no debe anularse totalmente tras el bloqueo de la neurotransmisión clásica, tanto adrenérgica como colinérgica.
- La administración del neuropéptido exógeno debe producir resultados similares.
- El bloqueo de la acción del neuropéptido debe ir acompañado por el cese de la respuesta a la estimulación nerviosa. La dificultad de este último aspecto estriba en que, de momento, no siempre se dispone de antagonistas específicos para todos los neuropéptidos.

Por otra parte, Wilber (1989) estableció unos criterios que deben cumplir los péptidos para poder ser considerados como factores reguladores del apetito:

- Los péptidos deben poseer una actividad bien definida en una localización neuroanatómica específica (por ejemplo, la saciedad localizada en núcleos ventromediales hipotalámicos)

correlacionada con una respuesta alimentaria (anorexia, siguiendo con el mismo ejemplo, cuando es un péptido inhibidor).

- La inhibición de la acción de un determinado péptido por neutralización con anticuerpos o con un agente bloqueante del receptor específico, debe eliminar selectivamente la respuesta.
- Las concentraciones endógenas de un péptido concreto fluctuarán con la modificación del estado nutricional.
- La afinidad de un péptido por un receptor puede cambiar en función de modificaciones nutricionales.

Uno de los mayores problemas a la hora de estudiar la regulación central de la ingesta por neurotransmisores clásicos o neuropéptidos es la especificidad del efecto. Después de la administración de un neuropéptido, la ingesta se puede producir por un incremento específico del hambre, o secundariamente por un aumento en la activación general del organismo con el consecuente incremento de la utilización de energía, o por una alteración en la homeostasis de nutrientes del medio interno. De manera similar, también existen problemas con la interpretación de los resultados obtenidos con neuropéptidos que reducen la ingesta. Una disminución de la ingestión de alimento puede ser producida por una reducción específica del hambre, o por una *disminución en la capacidad para masticar y/o deglutir*, o debido a la producción de una aversión generalizada. En general, resulta difícil discriminar cual de estos factores o combinación de ellos realmente determina el efecto observado sobre la ingesta tras la administración de un neuropéptido (Morley y cols, 1985).

Teniendo estas cuestiones en mente, pasaremos a describir con más detalle la información disponible en la actualidad en relación con tres neuropéptidos concretos: el CRF o CRH (factor u hormona liberador/a de corticotropina), incluido dentro del grupo de neuropéptidos inhibidores del apetito, y como estimuladores del mismo, la β -endorfina perteneciente a la familia de péptidos opioides, y la galanina. En cada uno de ellos analizaremos primero otros aspectos como su estructura, distribución, receptores, mecanismos de acción, etc.

2.2. CRF.

2.2.1 ESTRUCTURA.

El CRF es considerado el principal regulador fisiológico de la secreción de corticotropina (ACTH), β -endorfina y otros péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC) del lóbulo anterior de la hipófisis (Vale y cols, 1981; Brown y cols, 1982a). En 1981, el grupo de Vale (Vale y cols, 1981; Spiess y cols, 1981) aisló dicho factor liberador de ACTH y β -endorfina, a partir de extractos de hipotálamo ovino, y lo caracterizaron como un péptido de 41 aminoácidos (CRF-41 ovino, oCRF) cuya estructura primaria es la siguiente:

H-Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂

Posteriormente, la secuencia de este péptido fue determinada en otras especies de mamíferos: rata, humano, gato, cabra, cerdo, vaca y caballo, conteniendo en todos los casos 41 aminoácidos y una estructura primaria similar (véase rev. Gillies y cols, 1989; Dunn y Berridge, 1990; Sherwood y Parker, 1990; Owens y Nemeroff, 1991; Rondeel y Jackson, 1993).

En los peces se desconoce la secuencia de aminoácidos del CRF, aunque se ha demostrado la presencia de un CRF de 41 aminoácidos en *Catostomus commersoni* (perciforme), y que difiere del CRF humano sólo en dos aminoácidos (Okawara y cols, 1988). La estructura del oCRF es también similar a la de otros péptidos conocidos, como angiotensinógeno, sauvagina y urotensina I (Vale y cols, 1981). La sauvagina (péptido de 40 aminoácidos aislado de la piel de la rana *Phyllomedusa sauvagei*) y la urotensina I (péptido de 41 aminoácidos aislado de la urohipófisis en dos especies de peces, *Catostomus cyprinus* y *Catostomus catostomus*) presentan más de un 50% de residuos idénticos a los del CRF ovino (Sherwood y Parker, 1990; Owens y Nemeroff, 1991). Todo ello demuestra que la secuencia de aminoácidos del CRF ha sido altamente conservada a lo largo del proceso evolutivo (Lederis y cols, 1990).

2.2.2 DISTRIBUCIÓN.

Cuerpos celulares y fibras inmunorreactivas (ir) al CRF han sido localizados de forma heterogénea en todo el SNC, siendo la población de neuronas CRF-ir de la región parvocelular del NPV del hipotálamo la principal fuente de liberación de CRF. Dichas neuronas envían proyecciones, principalmente, a la eminencia media, aunque algunas fibras son proyectadas a otros núcleos hipotalámicos y otras áreas cerebrales extrahipotalámicas (Merchenthaler y cols, 1982; Swanson y cols, 1983).

Aparte del SNC, se ha observado, también en mamíferos, inmunorreactividad al CRF en numerosos tejidos, tales como ganglios simpáticos, tejido cromafín de la médula adrenal, testículo y tracto gastrointestinal (véase rev. Dunn y Berridge, 1990; Owens y Nemeroff, 1991).

La distribución de células y fibras CRF-ir en el SNC también ha sido estudiada en vertebrados no mamíferos: aves (Bons y cols, 1988), reptiles (Mancera y cols, 1991; López Avalos y cols, 1993), anfibios (Olivereau y cols, 1987) y peces (Olivereau y cols, 1984; Fryer y Lederis, 1986; Olivereau y Olivereau 1988; González y cols, 1992; Coto-Montes y cols, 1994). Concretamente, se han identificado dos grupos separados de células CRF-ir, en el núcleo preóptico (predecesor de los núcleos supraóptico y paraventricular de los mamíferos) proyectando a la eminencia media, y en el núcleo *tuberis lateralis* en ciertas especies de peces (Yulis y cols, 1986). Parte de las fibras del tracto hipotálamo-hipófisis acaban directamente en la *pars distalis*, cerca de las células productoras de ACTH; mientras que otras muchas alcanzan el lóbulo neurointermedio y terminan cerca de células productoras de la hormona estimulante de melanóforos, MSH (Olivereau y Olivereau, 1988). Proyecciones CRF-ir también se han descrito en otras áreas cerebrales de los peces, incluyendo el núcleo *recessus lateralis*, telencéfalo, techo mesencefálico, etc. (González y cols, 1992).

2.2.3 RECEPTORES Y MECANISMOS DE ACCIÓN.

Las acciones del CRF en el SNC y la hipófisis están mediadas por receptores de membrana específicos, que muestran similares características cinéticas y farmacológicas en ambos órganos de los mamíferos (Grigoriadis y cols, 1992). Son receptores acoplados a proteínas G, que a su vez median la estimulación de adenilato ciclasa, produciendo en última instancia un incremento del AMP cíclico (AMPC) celular, segundo mensajero asociado a la

activación de los receptores de CRF. La unión de CRF o análogos de éste es saturable, reversible y de alta afinidad con una constante de disociación (K_D) en el rango nanomolar (Owens y Nemeroff, 1991).

La **localización** por autorradiografía de los receptores de CRF constituye una base anatómica importante para la interpretación fisiológica de algunas de las acciones del CRF dentro del SNC (Dunn y Berridge, 1990; Grigoriadis y cols, 1992). Una alta densidad de receptores de CRF se han localizado en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis, bulbo olfatorio, corteza cerebral, amígdala y cerebelo en los mamíferos (Piekut y Knigge, 1989; Grigoriadis y cols, 1992). También se han identificado en tejidos periféricos, como la médula adrenal, ganglios simpáticos, bazo y en menor cantidad en testículo, hígado y riñón (Owens y Nemeroff, 1991). La demostración de receptores funcionales de CRF en el SNC y periferia concuerda con el importante papel que desempeña este neuropéptido integrando repuestas autonómicas, comportamentales e inmunes de un organismo frente a estímulos como el estrés (Grigoriadis y cols, 1992).

Como hemos visto anteriormente los receptores comparten características similares en diferentes tejidos, y también en una gran variedad de especies de mamíferos estudiadas (Grigoriadis y cols, 1992). A pesar de los escasos estudios sobre receptores de CRF en otros vertebrados, parece posible pensar en una gran similitud a los de mamíferos, como ocurría con la estructura primaria del péptido, pudiendo existir así receptores equivalentes en los **peces** (Coto-Montes y cols, 1994). Concretamente en la carpa dorada (*C. auratus*) se han demostrado sitios de unión para urotensina I y CRF en células aisladas del lóbulo anterior e intermedio de la hipófisis (Fryer y Lederis, 1986).

Se conoce poco acerca de la terminación de la acción del CRF tras su liberación sináptica. No obstante, hay evidencias de que el CRF puede ser degradado por una o más peptidasas, o puede producirse una internalización y metabolismo del complejo receptor-CRF tras la activación del receptor. También se ha sugerido la unión del CRF a proteínas de unión como un método complementario, junto a los dos anteriores, para la terminación de la acción del CRF. Estos tres mecanismos pueden representar una modulación a largo plazo de la neurotransmisión por el CRF (Owens y Nemeroff, 1991).

2.2.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA. REGULACIÓN DE LA INGESTA.

El CRF, como ya se mencionó anteriormente, activa el eje hipófisis-adrenal en situaciones normales y estresantes en vertebrados, incluyendo los peces (Peter y Fryer, 1983; Fryer y Lederis, 1986; Tran y cols, 1990). Además de estas acciones neuroendocrinas, se considera que actúa en el SNC coordinando las repuestas fisiológicas y comportamentales al estrés, produciendo su administración aguda en los mamíferos una gran variedad de efectos similares a los observados cuando los animales son expuestos a una situación estresante. Por ejemplo, el CRF estimula el sistema nervioso autónomo y comportamientos como la actividad locomotora, aseo, etc.; e inhibe la secreción de determinadas hormonas y funciones gastrointestinales en general, atenuando comportamientos como la reproducción, exploración, alimentación, etc. (véase rev. Dunn y Berridge, 1990; Owens y Nemeroff, 1991). A continuación, desarrollaremos con más detalle este último aspecto, es decir, la regulación del comportamiento alimentario por el CRF.

a) Efectos agudos del CRF en la ingesta.

En 1982, Britton y colaboradores por un lado, y Morley y Levine por otro, demostraron simultáneamente que el CRF era un potente agente anoréxico después de su administración central en ratas. Desde entonces, numerosos estudios han sido llevados a cabo utilizando diferentes dosis, en una gran variedad de situaciones y en diferentes especies de mamíferos (véase rev. Glowa y cols, 1992).

Cuando se compara la ruta de administración del CRF, se ha puesto de manifiesto que, generalmente, sólo las inyecciones intracerebroventriculares (ICV) reducen la ingesta (Parrot, 1990; Glowa y cols, 1992). Por tanto, la falta de efecto tras la administración periférica apoya sustancialmente la mediación central del efecto anorético del CRF (Glowa y cols, 1992).

El CRF inhibe el apetito en ratas a las que se privaba de alimento, tanto en ambientes familiares como desconocidos (Britton y cols, 1982). Dicho efecto también se observó en ratas con acceso libre a la comida (Gosnell y cols, 1983). Asimismo, se ha demostrado que el CRF reduce la ingesta estimulada por fármacos, tales como muscimol, noradrenalina, dinorfina e insulina, conocidos por estimular la alimentación a través de diferentes mecanismos (véase rev. Dunn y Berridge, 1990; Owens y Nemeroff, 1991). Por otro lado, la administración central del CRF reduce el apetito en rata y ratón normales o genéticamente obesos (Glowa y cols, 1992; Drescher y cols, 1994), siendo más eficaz en los animales

obesos. Esto sugiere que una desregulación de las acciones del CRF dentro del SNC podría contribuir al desarrollo de la obesidad.

Los estudios realizados para localizar los sitios de acción del CRF dentro del SNC ponen de manifiesto que el CRF reduce el apetito sólo cuando es inyectado en el NPV, no reduciéndolo cuando es inyectado en otras áreas cerebrales, como el hipotálamo lateral y ventromedial, *globus pallidus* o estriado (véase rev. Morley, 1987).

Como ya hemos mencionado, la disminución de la ingesta como respuesta a la administración central de CRF ha sido demostrada en mamíferos, concretamente en la rata (Britton y cols, 1982; Morley y Levine, 1982; Gosnell y cols, 1983; Arase y cols, 1988), ratón (Rosenthal y Morley, 1989; Drescher y cols, 1994), conejo (Opp y cols, 1989), cerdo (Parrot, 1990) y mono (Glowa y Gold, 1991; Glowa y cols, 1991). En la bibliografía no se han encontrado estudios concernientes al posible efecto del CRF como regulador de la alimentación en otros vertebrados, salvo un trabajo preliminar de nuestro laboratorio, que demostraba que el CRF podía actuar como un potente inhibidor de la ingesta en larvas del anfibio anuro *Rana perezi* (Corpas y cols, 1991).

b) Alteraciones de los efectos del CRF en la ingesta.

Se ha demostrado que ni la hipofisectomía (Morley y Levine, 1982) ni la vagotomía (Gosnell y cols, 1983) modifican la reducción de apetito inducida por el CRF, lo que sugiere que dicho efecto no es dependiente ni del vago, ni de la liberación de ACTH u otros péptidos hipofisarios derivados de la POMC. Gosnell y colaboradores (1983) también examinaron los efectos de la adrenalectomía, demostrando que la desmedulación adrenal atenúa el efecto anorético del CRF, sugiriendo así que la adrenalina periférica puede ser parcialmente responsable de la inhibición del apetito por CRF.

Como en otros comportamientos inducidos por el CRF, la reducción de la ingesta tras administración central del péptido puede ser bloqueada por el antagonista del CRF, α -"helical" CRF_[9-41] (Krahn y cols, 1986; Heinrichs y Koob, 1992). Este antagonista revierte también parcialmente la reducción del apetito debido a estrés, lo que indica que cambios en la liberación del CRF endógeno inducidos por un agente estresante pueden desempeñar un papel en la anorexia inducida por estrés.

Existe una gran controversia en lo que se refiere a los efectos observados sobre la ingesta y el peso corporal después de la administración crónica de CRF, generalmente durante siete días. Mientras que Arase y cols (1988) encontraron que la infusión de CRF en

el tercer ventrículo durante 7 días reducía el peso sin reducir significativamente la ingesta (posibilidad de tolerancia a las acciones anoréticas del CRF), otros autores han demostrado que se reducen ambos parámetros, bien de forma correlacionada o no (véase Glowa y cols, 1992).

2.3. β -endorfina.

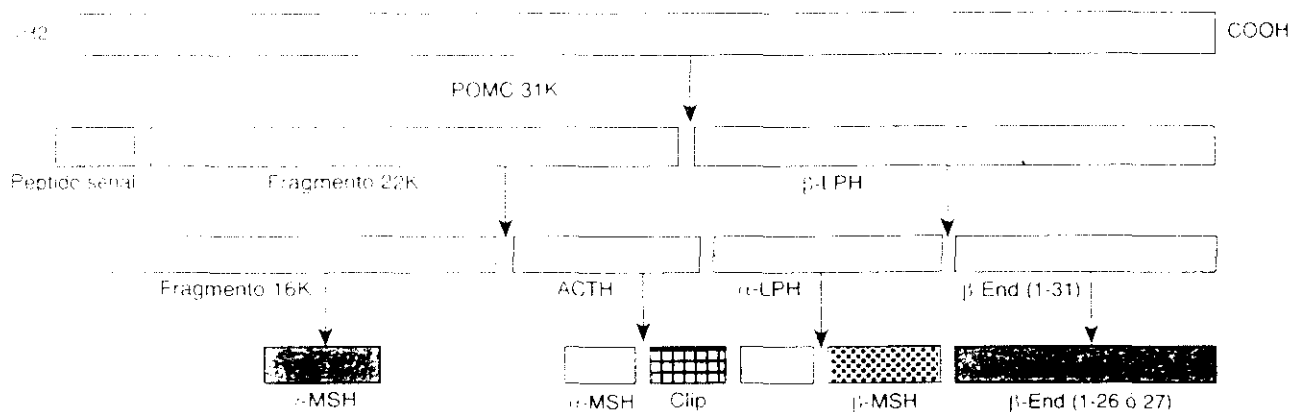
2.3.1 ESTRUCTURA.

La β -endorfina, término que resulta de la contracción de endógeno y morfina, es un péptido de 31 aminoácidos derivado de la proopiomelanocortina (POMC) que forma parte de la familia de **péptidos opioides**. Aunque la intención inicial fue denominar "opioide" sólo a los péptidos endógenos que poseían una actividad "opiácea", hoy en día, la mayoría de los autores utilizan el término "opioide" para referirse a todas las drogas, tanto sintéticas como naturales, que tienen acciones semejantes a la morfina (Olson y cols, 1991). En la presente Memoria, se utilizará también, únicamente, el término "opioide".

Los pentapéptidos metionina-encefalina (Met-encefalina) y leucina-encefalina (Leu-encefalina) fueron los primeros péptidos opioides endógenos aislados, del encéfalo porcino, e identificados como tales (Hughes y cols, 1975). Posteriormente se han aislado al menos otros 16 péptidos opioides de tejidos como el hipotálamo, la hipófisis y las adrenales, que comparten todos una estructura Met- o Leu-encefalina, y derivan de uno de los tres precursores comunes, proencefalina, POMC o prodinorfina, presentes en mamíferos (véase rev. Baile y cols, 1986; Dores, 1990; Dores y cols, 1990; Simon, 1991; Dalayeun y cols, 1993; Dores y cols, 1993a; Simon y Hiller, 1994). Concretamente, en 1976, Li y Chung aislaron de la hipófisis de camello un péptido de 31 aminoácidos, la β -endorfina, que representa la secuencia 61-91 de la β -lipotropina y que junto a la ACTH deriva de un precursor común, la POMC, que fue caracterizado posteriormente (Nakanishi y cols, 1979) (Ilustr. 1). La secuencia de aminoácidos de la β -endorfina es la siguiente:

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Lys-Gly-Glu

En otras especies de mamíferos, como la rata, oveja, vaca y humanos, así como en ciertas especies de aves, anfibios y peces, se ha establecido la estructura de la β -endorfina, observándose una gran similitud de dichas secuencias entre los tetrápodos por un lado, y entre los peces por otro, encontrándose diferencias en la región C-terminal cuando se comparan ambos grupos (Dores y cols, 1990).



Ilustr. 1. Esquema de la molécula de proopiomelanocortina (POMC) y los péptidos derivados a partir de ella (tomado de López-Calderón, 1992). ACTH, corticotropina; End, endorfina; LPH, lipotropina; MSH, hormona estimulante de melanóforos.

El sistema POMC en los peces presenta similitudes con el de otros vertebrados en cuanto a sus productos finales, y se puede considerar que dicho sistema en gnatóstomos ha sido altamente conservado (Dores y cols, 1993a y b). Respecto a la β -endorfina, se han purificado, y en algunos casos aislado, diferentes formas de endorfina a partir de la hipófisis de tres peces pertenecientes a órdenes muy diferentes (salmoniformes, *Oncorhynchus keta*: Kawauchi y cols, 1980; dipnoos, *Neoceratodus forsteri*: Dores y cols, 1988a; polipteriformes, *Calamoichthys calabricus*: Dores y cols, 1993b). Recientemente, se han detectado formas *N*-acetiladas de β -endorfina también en los holósteos (*Amia* y *Lepisosteus*: Dores y cols, 1994).

2.3.2 DISTRIBUCIÓN.

Las regiones encefálicas que presentan más inmunorreactividad a la β -endorfina han sido localizadas en el hipotálamo, cerebro medio, amígdala y tronco cerebral de la rata (véase rev. Baile y cols, 1986). Las concentraciones más altas de β -endorfina se han encontrado en el hipotálamo, concretamente en los cuerpos celulares del núcleo arcuado, eminencia media y borde ventromedial del tercer ventrículo, y en axones y terminales a lo

largo de las paredes del tercer ventrículo. Estos axones se extienden dorsal y lateralmente desde el hipotálamo hasta la amígdala y el hipocampo. Se han descrito otras estructuras encefálicas conteniendo β -endorfina, como el núcleo del tracto solitario, NPV y *locus coeruleus*, y proyecciones β -endorfina-ir hacia el área preóptica y la médula oblonga (véase rev. Simon y Hiller, 1994). En general, parece que son más frecuentes las regiones encefálicas que contienen fibras nerviosas y terminales que transportan y liberan los péptidos opioides, que las áreas que contienen cuerpos celulares que producen dichos péptidos (Simon y Hiller, 1994).

Además de estas regiones encefálicas, en la rata se ha observado material β -endorfina-ir en el líquido cefalorraquídeo y en la hipófisis, encontrándose la mayoría de la inmunorreactividad (90%) en el lóbulo neurointermedio, y a nivel periférico en el tracto gastrointestinal, páncreas y ovario (véase rev. Baile y cols, 1986).

La presencia de sustancias inmunológicamente relacionadas con las endorfinas ha sido demostrada en el encéfalo e hipófisis de diferentes especies de peces teleósteos (Follénus y Dubois, 1978a y b; Dubois y cols, 1979). Concretamente, se ha observado inmunorreactividad a la β -endorfina en el hipotálamo de lampreas (Nozaki y Gorbman, 1984) y perciformes (Vallarino, 1985), encontrando cuerpos celulares y fibras-ir en la región paraventricular y en los núcleos preóptico y *tuberis lateralis*. Aunque presenta una distribución más restringida que en el encéfalo de mamíferos, también se ha detectado β -endorfina-ir en otras áreas extrahipotálamicas, como el cerebelo (Vallarino, 1985) y la hipófisis (Dores y cols, 1988b).

2.3.3 RECEPTORES Y MECANISMOS DE ACCIÓN.

El desarrollo de ligandos que se unen con alta especificidad y afinidad a los receptores opioides ha sido utilizado para estudios de unión al receptor, así como para estudios anatómicos, fisiológicos y farmacológicos. Los resultados de estos trabajos sugirieron inicialmente la existencia de, al menos, 3 tipos de receptores opioides: mu (μ), kappa (κ) y sigma (σ). El descubrimiento de las encefalinas llevó a la descripción de otro tipo de receptor que se le denominó delta (δ), y desde entonces se han postulado otros tipos de receptores, uno de ellos específico para la β -endorfina, el receptor épsilon (ϵ). Sin embargo, actualmente se piensa que el receptor σ no es un verdadero receptor opioide ya que sus acciones no son revertidas por el antagonista opioide naloxona, prueba ampliamente aceptada para definir

receptores opioides. La clasificación actual considera a los **receptores μ , κ y δ** como los principales tipos de receptores opioides, describiéndose los subtipos μ_1 y μ_2 ; κ_1 , κ_2 y κ_3 ; y δ_1 y δ_2 (véase rev. Simon, 1991; Pasternak, 1993; Fowler y Fraser, 1994; Simon y Hiller, 1994; Uhl y cols, 1994). De forma general, los receptores κ median las acciones de los péptidos que derivan del precursor prodinorfina y los δ median las acciones de las encefalinas. Como ligando endógeno del receptor μ se ha sugerido la β -endorfina y la morfina, presentando también cierta afinidad por las encefalinas. Concretamente, la β -endorfina tiene preferencia por los receptores μ y δ , mostrando poca afinidad por los receptores κ (Akil y cols, 1981).

Existen evidencias de que los receptores opioidérgicos utilizan el AMPc como segundo mensajero. La activación del receptor provoca una inhibición de la adenilato ciclasa vía una de las proteínas G inhibitoras, y también se ha demostrado su acoplamiento directamente a canales iónicos mediante una proteína G_o (véase rev. Fowler y Fraser, 1994; Simon y Hiller, 1994; Uhl y cols, 1994). Mientras que los receptores μ y δ median la activación de canales de potasio, la unión a receptores κ inhibe los canales de calcio voltaje-dependientes (véase rev. Simon, 1991; Brownstein, 1993). Recientemente, se ha demostrado que el receptor μ también puede acoplarse a la inhibición de la producción de inositol trifosfato (IP_3) (Johnson y cols, 1994). La unión de ligandos endógenos o sintéticos al receptor opioide es saturable y de alta afinidad, con una K_D en el intervalo 10^{-11} - 10^{-7} M (Simon y Hiller, 1994).

La **distribución** de los tres tipos de receptores varía entre las distintas regiones del SNC y para una región determinada entre las distintas especies estudiadas (Simon, 1991). Los receptores μ han sido localizados en numerosas regiones del SNC en los mamíferos, encontrándose altas densidades en el tálamo, amígdala, caudado putamen, hipocampo y núcleo *accumbens* y del tracto solitario, mientras que una escasa o nula unión se encontró en el hipotálamo. Un patrón de distribución similar se ha encontrado para los receptores δ , a excepción del tálamo. En cambio, para los receptores κ la distribución es diferente, con altas densidades en el tálamo y el hipotálamo, concretamente en el NPV, no detectándose en el hipocampo (véase rev. Fowler y Fraser, 1994).

La presencia de receptores opioides en nervios periféricos también se ha establecido en los mamíferos (Pasternak, 1993).

Estudios autorradiográficos han puesto de manifiesto la presencia de sitios de unión de opioides en el encéfalo de los peces (carpa dorada: Pert y cols, 1974; trucha, anguila y lamprea: Bird y cols, 1988; raya: Nicholson y cols, 1994). Se han encontrado diferencias en la distribución de estos sitios de unión entre las especies de teleósteos estudiadas, de manera que, por ejemplo, mientras que en la trucha y la anguila las densidades más altas de sitios de unión de opioides se observaron en el cerebelo (Bird y cols, 1988), en la carpa dorada la detección de sitios de unión de opioides en dicha zona del encéfalo fue despreciable (Pert y cols, 1974).

A pesar de la descripción de sitios de unión de opioides en distintas especies de peces, su clasificación resultaba difícil al no existir radioligandos y competidores selectivos. Recientemente, dicha clasificación ha sido posible por primera vez en la carpa dorada (Brooks y cols, 1994), indicando que la mayoría de los sitios de unión corresponden a sitios κ , concretamente parece que κ_3 , y el resto a sitios μ , no detectándose unión de ligandos κ_1 , κ_2 , ni δ .

La existencia de receptores opioides ha sido, así, firmemente establecida en todos los vertebrados estudiados, desde los mixinos hasta humanos, así como en algunos invertebrados. Una de las posibles razones para esta conservación de receptores es que actúen como mediadores de ciertas funciones fisiológicas que confieran al organismo una ventaja selectiva (Simon, 1991; Simon y Hiller, 1994).

Por lo que respecta a los mecanismos de degradación de los péptidos opioides, se sabe que las encefalinas son hidrolizadas por peptidasas, de manera que el péptido biológicamente activo da lugar a fragmentos inactivos. Estas peptidasas incluyen, entre otras, una metaloendopeptidasa y una aminopeptidasa-N, que también pueden atacar a otros péptidos opioides como la β -endorfina (Simon y Hiller, 1994).

2.3.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA. REGULACIÓN DE LA INGESTA.

A partir de la observación de los efectos farmacológicos de los péptidos opioides y sus antagonistas, y de su distribución anatómica en regiones conocidas por controlar actividades fisiológicas y comportamentales, se han descrito numerosas funciones en las que intervienen dichos péptidos en todos los vertebrados estudiados. Así, los péptidos opioides están implicados en la percepción del dolor, en los mecanismos que median las repuestas al estrés, en la regulación de la respiración y la temperatura, en el desarrollo de tolerancia y

dependencia física al fármaco opioide, así como en la modulación de funciones gastrointestinales, hepáticas, cardiovasculares y diuréticas. El comportamiento sexual, maternal, alimentario, bebida, aseo, y actividad locomotora son patrones comportamentales influenciados también por los péptidos opioides. Además, son capaces de interactuar con los sistemas inmune y endocrino, incrementando la liberación de GH, ACTH, prolactina y hormona antidiurética, y reduciendo los niveles circulantes de TRH, hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH), y están relacionados con ciertos desórdenes psiquiátricos (Olson y cols, 1991, 1992 y 1993; Dalayoun y cols, 1993; Simon y Hiller, 1994).

A continuación profundizaremos en el papel que desempeñan los péptidos opioides en general, y la β -endorfina en particular, en la regulación de la ingesta.

a) Efectos agudos de la β -endorfina en la ingesta.

Un año después de aislar y caracterizar la β -endorfina, Grandison y Guidotti (1977) demostraron que la inyección de este opioide endógeno en la región ventromedial del hipotálamo incrementaba la ingesta en las ratas. Estudios similares en la misma especie indicaron también un aumento de la alimentación cuando la β -endorfina se administraba en el NPV (Leibowitz y Hor, 1982) o intracerebroventricularmente (McKay y cols, 1981; Oroscó y cols, 1989). En cambio, su administración periférica a las mismas dosis no modificaba el comportamiento alimentario (McKay y cols, 1981), sugiriendo que la acción de la β -endorfina en la regulación de la ingesta es central.

Los opioides parecen controlar específicamente la ingesta de grasas y además potencian la ingesta de proteínas, de manera que intervienen en el balance de la ingesta y almacenamiento de estos dos tipos de nutrientes (Leibowitz, 1992).

b) Alteraciones de los efectos de la β -endorfina en la ingesta.

El papel que desempeñan los péptidos opioides en la regulación de la alimentación se ha puesto de manifiesto por la utilización de drogas que bloquean los receptores opioidérgicos. El antagonista general **naloxona** ha sido ampliamente utilizado, demostrándose que inhibe la ingesta tanto administrado central como periféricamente en numerosas especies: rata, ratón, gato, zorro, tigre, conejo, cerdo, pollo, paloma, incluso en moluscos (véase rev. Baile y cols, 1986; Morley, 1987) y en una gran variedad de situaciones que incluyen la

alimentación espontánea e inducida por ayuno, estrés, noradrenalina, etc. (véase rev. Levine y cols, 1985).

El desarrollo en los últimos años de ligandos (agonistas y antagonistas) específicos para los diferentes subtipos de receptores opioidérgicos ha permitido identificar el o los receptor(es) responsables de la regulación de la ingesta por opioides en la rata. De los numerosos estudios existentes en este sentido, se puede concluir que los tres tipos de receptores μ , κ y δ son capaces de mediar los efectos de los opioides en el comportamiento alimentario (véase rev. Morley, 1987; Olson y cols, 1991, 1992 y 1993), aunque la magnitud de la respuesta, o a veces incluso su ausencia, depende de las condiciones experimentales. Por ejemplo, en función de la región del SNC en la que se administren dichos ligandos, o del tipo de dieta que se ofrezca, puede variar el tipo o tipos de receptores opioidérgicos implicados en la regulación de la ingesta (Carr y cols, 1991; Beczkowska y cols, 1992 y 1993; Bakshi y Kelley, 1993; Carr y Papadouka, 1994; Koch y Bodnar, 1994; Papadouka y Carr, 1994).

La administración ICV de β -endorfina durante tres días provoca un descenso en la ingesta y el peso corporal en las ratas (véase rev. Baile y cols, 1986), lo que concuerda con los efectos de otros péptidos opioides administrados crónicamente (Levine y cols, 1985; Olson y cols, 1992; Shaw, 1993; Gosnell y Krahn, 1993).

Se han descrito modificaciones del sistema opioide relacionadas con el estado nutricional y que reflejan cambios en el estado de hambre o saciedad en las ratas (véase rev. Baile y cols, 1986; Olson y cols, 1991). Así, el ayuno durante 2 ó 3 días provoca un descenso en el contenido hipotálamico de β -endorfina en las ratas (Gambert y cols, 1980). En este sentido, Baile y cols (1986) han sugerido que las concentraciones hipotálamicas de dicho péptido son incrementadas durante períodos de saciedad. En cambio, períodos de ayuno prolongados aumentan los niveles de β -endorfina en la hipófisis e hipotálamo posterior y los disminuyen en el núcleo supraquiasmático (véase rev. Baile y cols, 1986). Los niveles plasmáticos de β -endorfina aumentan en la primera fase de ayuno (5 días) en humanos, siendo más una respuesta al estrés ocasionado por el ayuno que un cambio asociado a modificaciones de peso corporal (Komaki y cols, 1990).

Además, se ha demostrado que en roedores genéticamente obesos los niveles plasmáticos e hipotálamo-hipofisarios de β -endorfina se encuentran elevados (Khawaja y cols,

1991). De manera similar, en pacientes obesos se han observado niveles plasmáticos de β -endorfina elevados (Balon-Perin y cols, 1991), que, sin embargo, no se ven modificados por variaciones de la ingesta como ocurría en individuos normales. Todo ello, junto con el hecho de que los animales obesos respondían más a los efectos de la naloxona en la ingesta, indica que la β -endorfina está involucrada en el desarrollo de la obesidad (Baile y cols, 1986).

2.4. Galanina.

2.4.1 ESTRUCTURA.

Tatemoto y colaboradores aislaron e identificaron en 1983 un nuevo péptido biológicamente activo en extractos de intestino delgado porcino que denominaron galanina, haciendo mención a los residuos de sus extremos N- y C-terminales, que eran glicina y alanina respectivamente. La secuencia completa de aminoácidos (29) de dicho péptido es la siguiente:

Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala-Ile-Asp-Asn-His-Arg-Ser-Phe-His-Asp-Lys-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH₂

El tetrapéptido C-terminal amida de la galanina es estructuralmente similar a la región correspondiente de la sustancia P y la secuencia N-terminal de seis aminoácidos de la galanina es similar a la de la POMC. En cambio, no se encontraron similitudes estructurales entre la galanina y el CRF, aunque ambos péptidos contienen la misma estructura C-terminal alanina amida (Tatemoto y cols, 1983). A pesar de estas similitudes parciales, la secuencia de aminoácidos de la galanina porcina no presenta homología a la de péptidos de otras familias, por lo que se la consideró el primer péptido de una nueva familia.

La estructura de la galanina ha sido establecida en otros mamíferos, concretamente, en la rata, perro, vaca, oveja y humanos; así como en aves (pollo), mostrando una gran similitud a la secuencia descrita para la galanina porcina (véase res. Ahrén y Lindskog, 1992; Harling, 1993; Merchenthaler y cols, 1993). En todas las especies se conservan intactos los 15 aminoácidos del extremo N-terminal, lo que sugiere que la actividad biológica reside en esta región, que podría ser importante para la interacción con el receptor; mientras la variabilidad de la región C-terminal parece ser responsable de una actividad específica de especie.

En los peces, Yanahihara y colaboradores (1993), recientemente, han aislado galanina del hipotálamo de un túnido y han secuenciado parcialmente dicho péptido, poniendo de manifiesto nuevamente la gran similitud en el fragmento N-terminal (1-15), con diferencias únicamente en los aminoácidos de las posiciones 6 y 15. El extremo C-terminal que presenta mayor variabilidad como ocurría en otros vertebrados, ha sido secuenciado únicamente hasta el aminoácido 25, desconociéndose por el momento los aminoácidos finales.

2.4.2 DISTRIBUCIÓN.

La distribución de cuerpos celulares y fibras inmunorreactivas a galanina (Gal-ir) en el SNC se ha descrito en numerosas especies de mamíferos y en otros grupos de vertebrados, principalmente en anfibios y peces (véase rev. Michener y cols, 1990; Olivereau y Olivereau, 1991a; Merchenthaler y cols, 1993). Recientemente, también se ha estudiado la distribución de galanina en el encéfalo de aves (Józsa y Mess, 1993), siendo similar, en general, a la de las restantes clases de vertebrados estudiadas. Se ha descrito material Gal-ir a lo largo de todas las regiones del encéfalo, existiendo una población de neuronas ricas en galanina en el hipotálamo, concretamente en los núcleos preóptico, arcuado y paraventricular; y una densa red de fibras originadas en estos núcleos que alcanzan la eminencia media y la hipófisis posterior. También existe gran inmunoreactividad a galanina en la protuberancia, bulbo raquídeo y médula espinal.

Recientemente, se han realizado numerosos estudios en los peces (Cornbrooks y Parsons, 1991; Holmqvist y Ekström, 1991; Olivereau y Olivereau, 1991a; Vallarino y cols, 1991; Yamamoto y cols, 1992; Cuadrado y cols, 1993; Magliulo-Cepriano y cols, 1993), que ponen de manifiesto también una distribución heterogénea de la galanina en el SNC. La principal localización de Gal-ir se encuentra en la región hipotálamo-hipófisis, con una densa red de fibras en la parte caudal de la eminencia media y una importante población de células que contienen galanina en el núcleo preóptico periventricular, núcleo preóptico y núcleo *tuberis lateralis*, áreas homólogas a los núcleos supraóptico, paraventricular y arcuado de los mamíferos. Sin embargo, en contraste a la situación de los mamíferos, no existe gal-ir en el *locus coeruleus* noradrenérgico y núcleo del rafe serotoninérgico, ni en otras áreas homólogas al tálamo, núcleo septal medial del telencéfalo y núcleo interpeduncular del mesencéfalo de los mamíferos (Merchenthaler y cols, 1993).

A nivel periférico, se ha encontrado material Gal-ir en fibras nerviosas en diferentes regiones del tracto respiratorio, gastrointestinal (véase rev. Vrontakis y cols, 1991; Harling, 1993) y urogenital (Papka y cols, 1991). También se ha demostrado su existencia en el páncreas endocrino y exocrino (Lindskog y cols, 1991; Ahrén y Lindskog, 1992) y en las glándulas adrenales (Zentel y cols, 1990). En los peces, aparece Gal-ir a lo largo del tracto gastrointestinal (Karila, 1993; Kiliaan y cols, 1993).

2.4.3 RECEPTORES Y MECANISMOS DE ACCIÓN.

Todos los receptores de galanina estudiados son receptores de membrana plasmática acoplados a una proteína G, que inicia la cascada de repuestas celulares a través de la inhibición de adenilato ciclasa, activación de canales de potasio sensibles a ATP, o inhibición de la corriente de calcio (Bartfai y cols, 1992; Chen y cols, 1992 y 1993a; Hulting y cols, 1993). Se han identificado cinco subtipos de proteínas G (G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_o y G_{o1}) como candidatas al acoplamiento con el receptor para galanina (Cormont y cols, 1991). La unión de galanina o análogos de ésta al receptor es específica, saturable y de alta afinidad, con una K_D en el rango nanomolar (Chen y cols, 1993a).

Utilizando métodos autorradiográficos ha sido posible demostrar la presencia de sitios de unión para galanina en el SNC y periferia de mamíferos, los cuales se correlacionan bien con la **distribución** de la inmunorreactividad a galanina, apoyando la idea de que la galanina está involucrada en una gran variedad de funciones biológicas (véase rev. Bartfai y cols, 1992; Merchenthaler y cols, 1993). Se han descrito receptores de galanina tanto pre- como post-sinápticos (Merchenthaler y cols, 1993). Una distribución similar de los sitios de unión en ratas y primates sugiere que la distribución de los receptores de galanina es altamente conservada entre diferentes especies (Merchenthaler y cols, 1993). Estudios similares en teleósteos, concretamente en la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Moons y cols, 1991), demuestran la presencia de sitios de unión en el encéfalo e hipófisis, coincidiendo con la distribución descrita para material Gal-ir en dichas zonas. La densidad más alta de receptores dentro del encéfalo se ha encontrado en el hipotálamo posterior. En cuanto a la hipófisis, a pesar de existir fibras Gal-ir en estrecha asociación con células de ACTH, prolactina, GH (hormona de crecimiento), TSH (tirotropina) y GtH (hormona gonadotrópica), sólo se detectaron receptores en la población de células de prolactina.

Respecto a la degradación de la galanina, se ha demostrado que, entre otros mecanismos posibles, existen enzimas encargadas de terminar con la acción de dicho péptido y concretamente se ha sugerido en ratas que una de ellas es una endopeptidasa (Land y cols, 1991). Además, se ha descrito que la galanina liberada endógenamente en el hipotálamo tiene una vida media de 100 minutos en la rata (Land y cols, 1991), mientras que en el plasma es de 4,6 minutos en el cerdo, lo que indica que la galanina es inestable en la sangre (Harling y Holst, 1992). No obstante, aún considerando estas diferentes tasas de degradación de la galanina según los tejidos, cabe pensar también que, puesto que la estructura molecular de la galanina en dichas especies no es idéntica, el tiempo diferente de vida media del péptido podría reflejar una distinta tasa de eliminación en las dos especies.

2.4.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA. REGULACIÓN DE LA INGESTA.

La demostración, como hemos visto en los apartados anteriores, de material Gal-ir en el sistema hipotálamo-hipófisis de varios vertebrados, sugiere que este péptido puede ejercer un papel neuroendocrino en el control de la función de la hipófisis anterior (Moons y cols, 1991), por ejemplo estimulando la liberación de GH y prolactina (Merchenthaler y cols, 1993). Además de estas acciones neuroendocrinas, se han descrito otras muchas actividades biológicas para la galanina, principalmente en mamíferos (véase rev. Bartfai y cols, 1992; Merchenthaler y cols, 1993), por ejemplo en el páncreas inhibe la liberación de insulina inducida por glucosa y la liberación de somatostatina; regula funciones gastrointestinales; y en el SNC inhibe la liberación de acetilcolina en el hipocampo, la descarga de neuronas noradrenérgicas en el *locus coeruleus*, y estimula el comportamiento alimentario, que estudiaremos con más detalle a continuación.

a) Efectos agudos de la galanina en la ingesta.

Kyrkouli y colaboradores (1986) demostraron por primera vez que la galanina estimulaba la alimentación cuando se inyectaba directamente en el NPV de ratas saciadas. Este efecto estimulador del comportamiento alimentario es dependiente de la dosis, y es específico, tanto desde el punto de vista anatómico, ya que ni las inyecciones en otras áreas del encéfalo ni la administración periférica de ese péptido fueron eficaces para incrementar la ingesta, como comportamental, puesto que no era acompañado por modificaciones en otras conductas (Kyrkouli y cols, 1986 y 1990a; Corwin y cols, 1993). Posteriormente, se ha demostrado que la administración ICV de galanina, así como las inyecciones en los núcleos

lateral y ventromedial del hipotálamo también estimulan el apetito, involucrando a dichos núcleos en la regulación central de la ingesta por galanina (Schick y cols, 1993). Estos autores encontraron también que la estimulación del apetito ocurría tanto en ratas privadas de alimento como con libre acceso a éste, actuando la galanina, por tanto, mediante la activación del comportamiento alimentario y no por supresión de señales de saciedad.

La galanina es capaz de controlar específicamente la ingesta de determinados nutrientes (Leibowitz, 1992). Se ha demostrado, así, que aunque la galanina afecta de manera similar a la cantidad total de ingesta durante la fase oscura en ratas, sin embargo, al principio de ésta el péptido incrementa tanto la ingesta de carbohidratos como de grasas y al final de dicha fase oscura sólo incrementa la ingesta de grasas, que parece ser el efecto primordial de la galanina (Tempel y Leibowitz, 1990a).

b) Alteraciones de los efectos de la galanina en la ingesta.

El efecto descrito de inhibición de la liberación de corticosterona después de administrar galanina en el NPV (Tempel y Leibowitz, 1990b) parece no mediar la acción estimuladora del apetito por dicho péptido, ya que ni la adrenalectomía, ni la sustitución con corticosterona ni el uso de antagonistas de receptores esteroides en el NPV modifican la estimulación de la ingesta inducida por galanina (Tempel y Leibowitz, 1993). Por tanto, la galanina parece funcionar independientemente de la corticosterona circulante y sus receptores.

Estudios que relacionan estructura-actividad (véase apartado 2.4.1.) han puesto de manifiesto que la actividad biológica de la galanina (1-29) reside en la porción N-terminal del péptido. En base a esta actividad N-terminal, se han desarrollado recientemente potentes antagonistas del receptor de galanina, que son péptidos quiméricos con el fragmento 1-13 de la galanina como el extremo N-terminal y otra secuencia peptídica como extremo C-terminal. Algunos de estos antagonistas, reconocidos por bloquear efectos mediados por la galanina en el páncreas y en el encéfalo, también bloquean el incremento de la ingesta inducido por galanina, a dosis equimolares a las de galanina (Leibowitz y Kim, 1992; Corwin y cols, 1993; Crawley y cols, 1993).

Un estudio reciente ha demostrado el efecto del tratamiento crónico con galanina en ratas, indicando que la administración ICV de este péptido dos veces al día durante una semana, o tres inyecciones diarias durante 6 días, no produce un incremento en la ingesta total diaria ni modificaciones del peso corporal al final del tratamiento (Smith y cols, 1994).

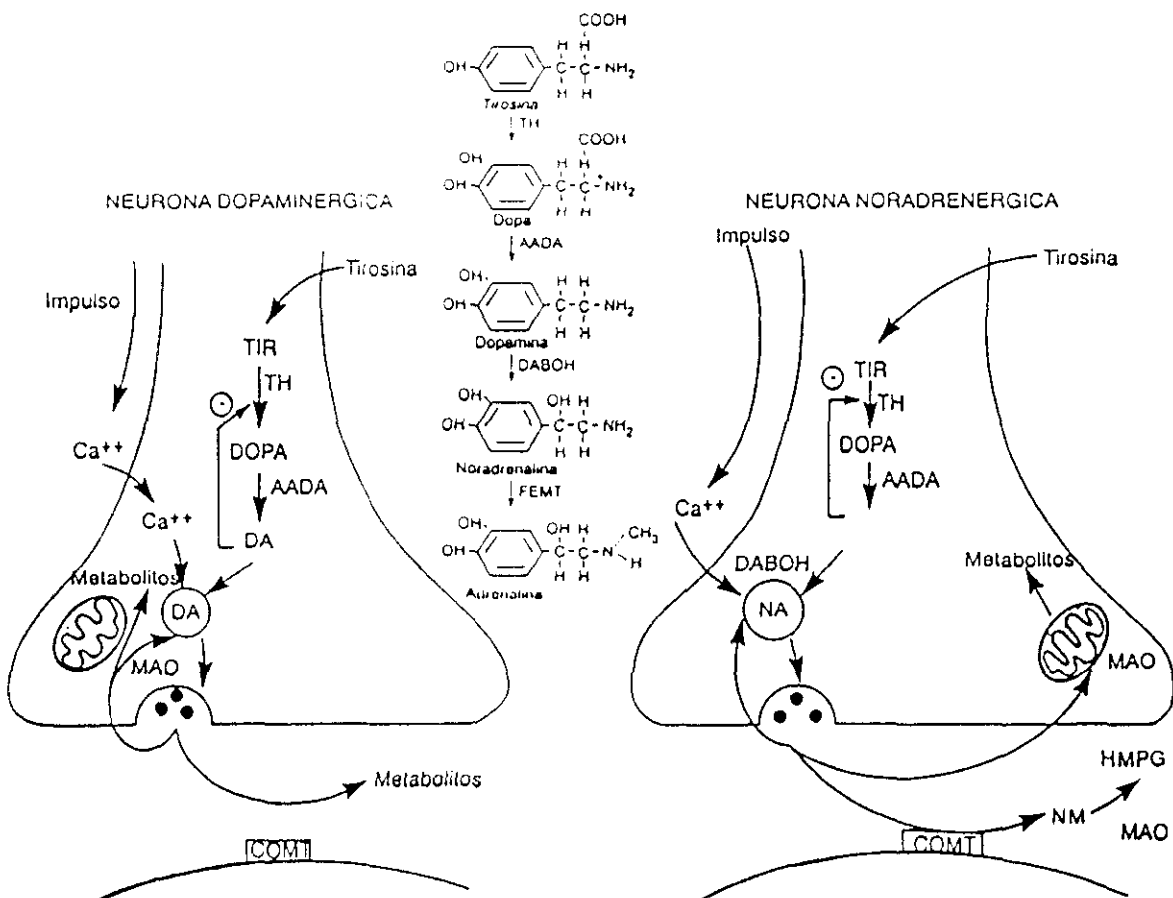
2.5. Interacciones neuropéptidos-catecolaminas encefálicas.

2.5.1 CATECOLAMINAS ENCEFÁLICAS.

Los neurotransmisores catecolaminérgicos incluyen la dopamina (DA), noradrenalina (NA) y adrenalina (A), cuyo metabolismo parece ser cualitativamente idéntico en todos los vertebrados estudiados, incluyendo los peces (véase rev. Winberg y Nilsson, 1993).

a) Síntesis.

En la ruta biosintética de las catecolaminas (Ilustr. 2) intervienen cuatro enzimas: tirosina hidroxilasa (TH), L-aminoácido-aromático descarboxilasa (AADA), dopamina- β -hidroxilasa (DABOH) y feniletanolamina-*N*-metiltransferasa (PNMT).



Ilustr. 2. Esquema de la síntesis y degradación de catecolaminas (tomado de Alonso-Solís, 1992). AADA, aminoácido aromático descarboxilasa; COMT, catecol-*O*-metiltransferasa; DA, dopamina; DABOH, dopamina- β -hidroxilasa; HMPG, 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol; MAO, monoamino oxidasa; NA, noradrenalina; NM, normetanefrina; TH, tirosina hidroxilasa; TIR, tirosina.

Las catecolaminas son compuestos derivados del aminoácido tirosina, que es captado de la circulación, y cuya hidroxilación da lugar al L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Esta reacción es catalizada por la TH, enzima soluble que se encuentra en el citosol de todas las células sintetizadoras de catecolaminas, y constituye el paso limitante de dicha síntesis, ya que la TH está sometida a un control por producto final (L-DOPA, DA).

A continuación la L-DOPA es descarboxilada para formar DA, conversión catalizada por la AADA. En las neuronas noradrenérgicas, las vesículas que contienen DA presentan también la enzima DA β OH que permite la síntesis de NA a partir de DA. Por último, en las células que contienen A, la NA es metilada por la enzima PNMT dando lugar a la A.

b) Degradación.

Las catecolaminas, como el resto de los neurotransmisores en general, son concentradas y almacenadas en vesículas que liberan su contenido cuando se despolariza la membrana presináptica. Una vez liberadas al espacio sináptico, la acción de las catecolaminas es finalizada mediante degradación enzimática en el mismo, recaptura por las propias neuronas sintetizadoras o posiblemente por las células gliales y degradación intraneuronal. Tras la recaptura, las catecolaminas (Ilustr. 2) sufren una desaminación oxidativa por la enzima monoamino oxidasa (MAO), dando los correspondientes aldehídos. Dicha enzima, de localización fundamentalmente intraneuronal, se encuentra situada en la membrana externa de la mitocondria. Los aldehídos formados pueden convertirse en el correspondiente ácido o alcohol de cada amina, por una reacción catalizada por una aldehído deshidrogenasa o una aldehído reductasa, respectivamente.

Alternativamente, las catecolaminas pueden ser inactivadas por metilación del grupo hidroxilo, una reacción que es catalizada por la catecol-*O*-metiltransferasa (COMT), enzima soluble que actúa sobre las catecolaminas extraneuronales.

El principal metabolito de la NA es el 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol (HMPG), mientras que parecen existir diferencias específicas de especie en cuanto al catabolismo de la DA en los peces, variando el principal producto de degradación de la DA que puede ser el ácido homovanílico, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) o la 3-metoxitiramina (véase rev. Winberg y Nilsson, 1993). Concretamente, se ha demostrado en varias especies de teleósteos (Saligaut y cols, 1992; Hernández y cols, 1994), incluyendo *C. auratus* (Sloley y cols, 1992) que el DOPAC es el metabolito predominante.

c) Distribución.

Las células catecolaminérgicas son, en general, abundantes en el tronco cerebral, encontrándose un número significativo de ellas también en el hipotálamo, región que, además, está altamente inervada por axones catecolaminérgicos (véase rev. Parent, 1983; Winberg y Nilsson, 1993). En el encéfalo de teleósteos la A, al igual que en otros vertebrados, se encuentra a concentraciones muy bajas y no tiene una función conocida (Nilsson, 1989; Winberg y Nilsson, 1993).

d) Receptores.

Se han descrito cuatro subtipos de receptores adrenérgicos en los mamíferos: α_1 , α_2 , β_1 y β_2 , y al menos tres subtipos de receptores dopaminérgicos: D_1 , D_2 y D_3 . Además de su localización postsináptica, algunos subtipos funcionan también como autorreceptores presinápticos en el control de la liberación del neurotransmisor. Los receptores β tienen una fuerte preferencia por la A en los mamíferos (Lefkowitz y Caron, 1987) mientras que la NA se une principalmente a los receptores α (Norris, 1985; Hoebel y Hernández, 1993).

Se conoce muy poco acerca de los subtipos de receptores catecolaminérgicos en el SNC de los teleósteos, habiéndose descrito funciones reguladas por receptores α -adrenérgicos, α_1 - "like" (Chang y cols, 1991) y dopaminérgicos, D_2 - "like" (Chang y cols, 1984; Sloley y cols, 1991), no existiendo datos respecto a los receptores β (véase rev. Winberg y Nilsson, 1993).

2.5.2 CRF-CATECOLAMINAS.

Diferentes estudios han permitido llegar a la conclusión de que la indolamina serotonina, estimulando la liberación de CRF, inhibe la ingesta y, la noradrenalina estimula la alimentación por inhibir la liberación de una sustancia inhibidora, el CRF, dentro del NPV (véase rev. Morley y cols, 1985; Morley, 1987).

Por otro lado, aunque no existe mucha información al respecto, ciertos estudios en mamíferos han demostrado que el CRF afecta profundamente al contenido de determinadas monoaminas en el SNC. Concretamente la administración ICV de CRF incrementa la relación DOPAC/DA en la corteza frontal, núcleo *accumbens*, estriado, hipocampo y amígdala, y la relación HMPG/NA en la corteza frontal e hipocampo (véase rev. Morley, 1987; Dunn y Berridge, 1990). En algunos casos el CRF parece provocar cambios paralelos en los niveles de neurotransmisores y la ingesta (Morley, 1987), aunque se requieren más estudios que

establezcan un mecanismo de control del apetito por CRF asociado a monoaminas en el SNC.

2.5.3 β -ENDORFINA-CATECOLAMINAS.

El efecto agudo de la β -endorfina como estimulador de la ingesta ha sido bloqueado por un antagonista α -adrenérgico en la rata (Leibowitz y Hor, 1982). No obstante, no está claro si es la noradrenalina quien controla los efectos de los opioides o viceversa, ya que la naloxona revierte la estimulación de la alimentación inducida por noradrenalina en el NPV (véase rev. Levine y cols, 1985). Sin embargo, se ha descrito que dichos efectos de los opioides y la noradrenalina estimulando la ingesta cuando se inyectan en el NPV son independientes en la rata (McLean y Hoebel, 1982).

También se ha sugerido una interacción de la β -endorfina y el sistema dopaminérgico, ya que dicho péptido incrementa simultáneamente la ingesta y el metabolismo de la dopamina (aumenta la proporción DOPAC/DA) en la rata (Orosco y cols, 1989).

2.5.4 GALANINA-CATECOLAMINAS.

La estimulación de la ingesta por galanina depende parcialmente de la activación de receptores adrenérgicos (véase rev. Morley, 1987; Morley y Silver, 1991; Bray, 1992), ya que mediante el uso de drogas que bloquean los receptores α_2 -adrenérgicos, las cuales antagonizan los efectos de la noradrenalina en la ingesta (véase rev. Wellman y cols, 1993), se bloqueaban o atenuaban los efectos estimuladores del apetito, concretamente la ingesta de carbohidratos, inducidos por la galanina (Kyrkouli y cols, 1990b). Este hecho es apoyado por la correlación positiva observada entre los niveles de noradrenalina y la magnitud de la respuesta alimentaria en ratas tras administrar galanina (Kyrkouli y cols, 1992). No obstante, la galanina produce principalmente un incremento de la ingesta de grasas (Leibowitz, 1992), sugiriendo que esta respuesta parece ser independiente de la liberación de noradrenalina (Tempel y Leibowitz, 1990a).

3. INTERACCIÓN ACTIVIDAD TIROIDEA-ALIMENTACIÓN.

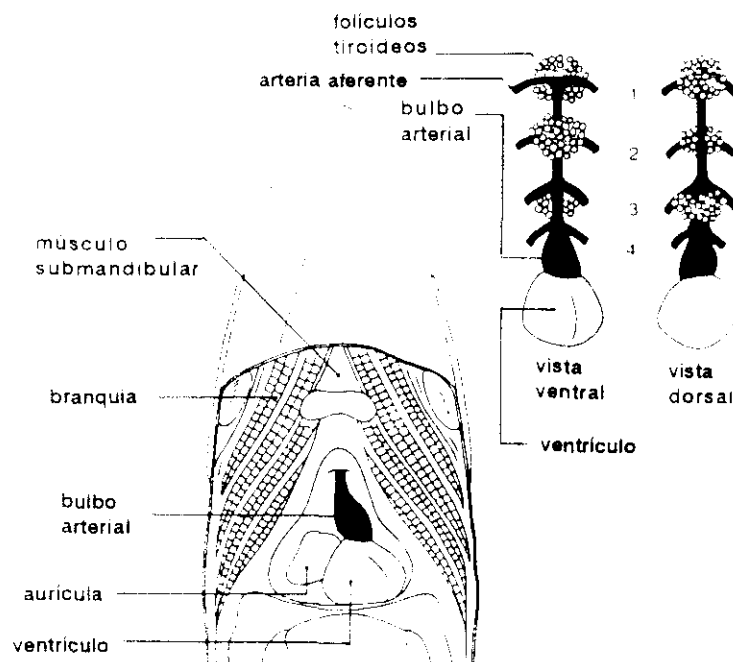
3.1. Introducción.

En todos los vertebrados estudiados, la glándula tiroidea a través de sus productos hormonales, la tiroxina (T_4) y la triyodotironina (T_3), desempeña un papel crucial en

numerosos procesos fisiológicos. Concretamente, en los peces se ha demostrado que las hormonas tiroideas (HT) están implicadas en el crecimiento, desarrollo, reproducción, migración, osmorregulación, consumo de oxígeno y metabolismo (véase rev. Dickhoff y Darling, 1983; Norris, 1985; Eales, 1990).

3.1.1 ANATOMÍA DEL TIROIDES EN LOS PECES.

La glándula tiroidea de los peces elasmobranquios es un cuerpo compacto impar, situado en la bifurcación de la aorta ventral en dos arterias branquiales. En los teleósteos no hay una glándula como tal, y los folículos tiroideos (unidad funcional básica de la glándula tiroidea) se encuentran dispersos a través de la región faríngea, a lo largo de la aorta ventral y agrupados en las salidas de los arcos aórticos, principalmente entre el segundo y cuarto arco aórtico (Paniagua y Nistal, 1983; Norris, 1985) (Ilustr. 3).



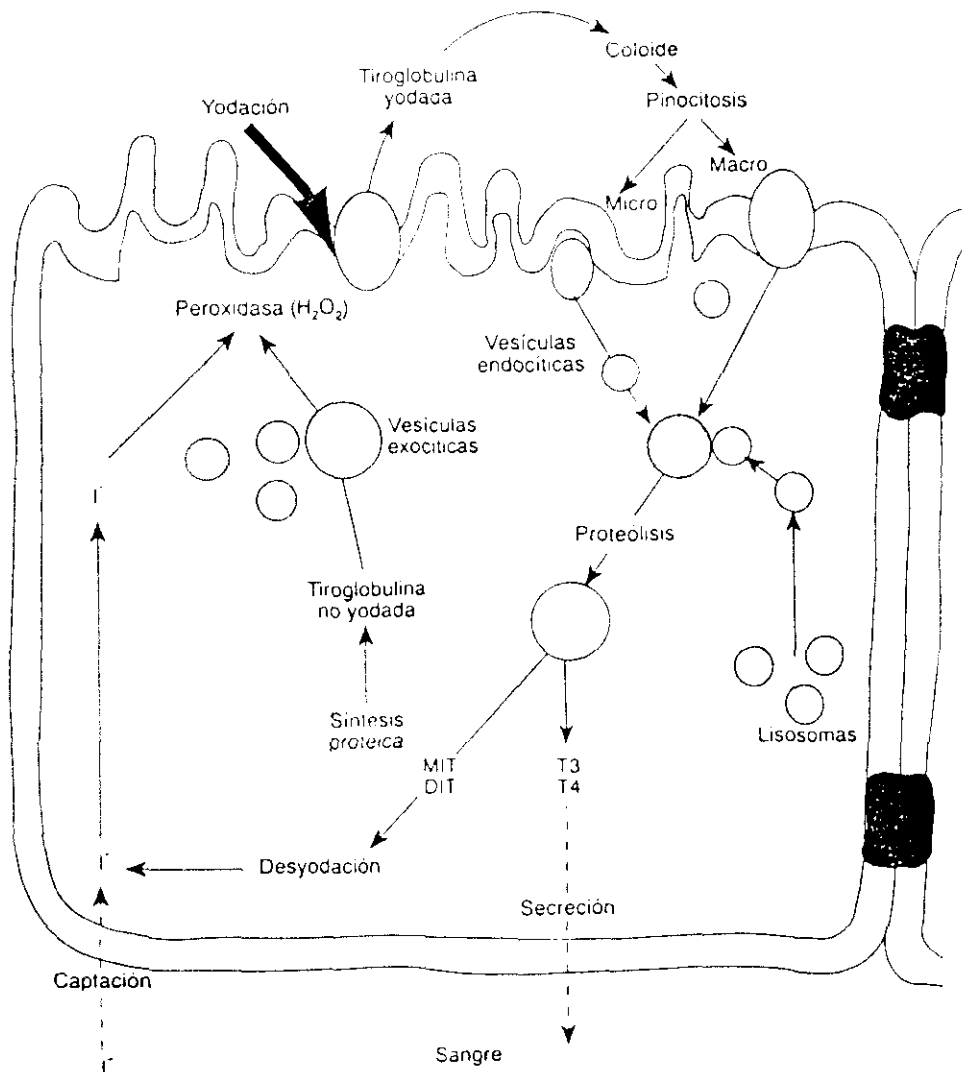
Ilustr. 3. Vista ventral de un plano horizontal a nivel de las branquias y el corazón en *Oncorhynchus masou masou* y detalle de los folículos tiroideos agrupados en la superficie dorsal y ventral de la aorta en los puntos de salida de los arcos aórticos (tomado de Suzuki, 1992).

Puesto que no existe un tejido conectivo que mantenga unidos los folículos en una o más glándulas, dichos folículos se pueden encontrar a veces fuera de la región faríngea, por ejemplo embebidos en la cabeza del riñón y ocasionalmente en otras localizaciones tales como el ovario, recibiendo el nombre de tiroides heterotrópico (Norris, 1985).

El "tiroides" en los peces consta, como en el resto de los vertebrados, de numerosos folículos, de forma normalmente ovoide o esférica, que están constituidos por un epitelio monoestratificado, limitando una cavidad interna en la que se acumula un fluido viscoso que recibe el nombre de coloide. Cada folículo está cubierto de un fino tejido laxo y rodeado de una red de capilares sanguíneos (Suzuki, 1992).

3.1.2 HORMONAS TIROIDEAS.

La **síntesis** de hormonas tiroideas (Ilustr. 4) tiene lugar en las células foliculares y se puede dividir en varias etapas:



Ilustr. 4. Esquema del proceso de síntesis, liberación y secreción de las hormonas tiroideas (tomado de Escobar *et al.*, 1992).

- captación de yoduro (I^-) del torrente sanguíneo y oxidación de éste a yodo activo (I_2).
- síntesis y transporte de la glucoproteína tiroglobulina (Tg) al lumen folicular.
- yodación de los residuos tirosilo en la Tg, de manera que la unión de un I_2 a la tirosina en posición 3 en el anillo fenólico da lugar a la 3-monoyodotirosina o MIT, y si un segundo yodo activo se une en posición 5 en el mismo residuo tirosilo, resulta la conversión de MIT a 3,5-diyodotirosina o DIT.
- acoplamiento de las yodotirosinas, bien de dos DIT para formar T_4 (3,3',5,5'-tetrayodotironina), principal producto hormonal del tiroides, o de una MIT y una DIT para dar origen a la T_3 (3,3',5-triyodotironina) y a la T_3 reversa (3,3',5'-triyodotironina, rT_3), cuantitativamente menos importante. También se forma una cantidad mínima de T_2 (3,3'-diyodotironina) (Visser, 1988).
- captación del coloide por las células foliculares.
- procesamiento e hidrólisis de la Tg, liberando las HT.
- secreción de las HT al torrente circulatorio.

Está aceptado que la actividad de las HT está determinada predominantemente por la concentración intracelular de T_3 libre en los tejidos. De este modo, la disponibilidad de T_3 depende de varios factores: la secreción tiroidea de T_3 y T_4 , la conversión extratiroidea de T_4 a T_3 , la degradación metabólica de T_3 y el intercambio de T_4 y T_3 entre el plasma y los tejidos.

En los peces se ha demostrado que, al igual que ocurre en los mamíferos, una proporción muy pequeña de T_4 y T_3 circulan libres en el plasma, mientras que el resto se une a proteínas transportadoras, teniendo lugar así el **transporte de yodotirosinas** a los tejidos. Además, parece que la T_3 se une con más fuerza que la T_4 a estas proteínas (Eales, 1985; Eales y Shostak, 1985a). Recientemente, se ha demostrado que las principales proteínas transportadoras de HT en el plasma de la trucha son las lipoproteínas, fundamentalmente las de alta densidad, siendo su unión independiente del estado nutricional, mientras que la unión a lipoproteínas de muy baja densidad es dependiente de su concentración y, por tanto, del estado nutricional (Babin, 1992).

El **metabolismo** de las HT comprende cuatro tipos de reacciones: desyodación, que es la ruta más importante, no sólo cuantitativamente sino también por ser capaz tanto de

activar como de desactivar la hormona; conjugación del grupo hidroxilo fenólico; desaminación oxidativa de la cadena lateral de alanina; y degradación por ruptura del enlace éter (Visser, 1988).

Tanto en homeotermos como en poiquilotermos, la mayor parte de T_3 y rT_3 circulantes proceden de la conversión periférica de T_4 (Norris, 1985; Eales, 1990). Concretamente, en anguilas y salmónidos, más del 65 % de la T_4 circulante puede ser convertida en T_3 (De Luze y Leloup, 1984; Eales, 1985) y, al menos en las condiciones fisiológicas estudiadas hasta el momento, parece ser que la ruta principal de **desyodación** de T_4 ocurre a nivel del anillo externo (5'-desyodación, 5'D), principalmente en el hígado, para dar lugar a la formación de T_3 , ya que no se detectan ni rT_3 ni T_2 (Eales y cols, 1983; Shields y Eales, 1986; Sweeting y Eales, 1992a, b y c). No obstante, estudios recientes han descrito la presencia tanto de una actividad 5'D como 5D (5-desyodación del anillo interno) en los teleósteos (Byamungu y cols, 1992; Morin y cols, 1993; Kühn y cols, 1993; Yamada y cols, 1993).

Los múltiples efectos biológicos de las HT resultan de la unión con **receptores nucleares**, lo que provoca un aumento en la transcripción, formación de nuevos ARNm y síntesis de proteínas específicas que son finalmente las responsables de la expresión de la acción de las HT a nivel celular (Oppenheimer y cols, 1987). Se han caracterizado parcialmente lugares de unión de T_3 de alta afinidad (K_D 10^{-10} M) y baja capacidad (≤ 1.000 sitios/célula), características típicas de los receptores hormonales, en el núcleo de células hepáticas y de otros tejidos de peces (ciclóstomos: Lintlop y Youson, 1983; teleósteos salmónidos: Darling y cols, 1982; Bres y Eales, 1988). Estos sitios de unión nucleares presentan un tamaño molecular, una k_D y una especificidad análoga a los receptores intranucleares de otros vertebrados, lo que indica su conservación en la evolución (Eales, 1990).

3.1.3 REGULACIÓN DEL EJE TIROIDEO EN LOS PECES.

La organización del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides en los poiquilotermos es semejante a la establecida en homeotermos (Eales, 1990). El tiroides secreta primordialmente T_4 en respuesta a la hormona estimuladora del tiroides (TSH), cuya liberación hipofisaria es regulada por hormonas hipotalámicas, incluyendo la hormona liberadora de tirotrópina (TRH).

Existe una gran controversia sobre si la **TRH** tiene una función similar en los peces (véase rev. Peter y Fryer, 1983). Aunque se ha localizado inmunohistoquímicamente en el encéfalo de un salmónido, y su distribución apoya un papel como hormona liberadora hipotalámica (Matz y Takahasi, 1994), y se ha demostrado que la TRH incrementa los niveles de T_4 en salmónidos (Eales y Himick, 1988), existen otros estudios que ponen de manifiesto que la TRH *in vitro* es incapaz de inducir una liberación de T_4 en *Eptatrecus* (Dickhoff y cols, 1978).

En teleósteos se ha demostrado que la **TSH** estimula la secreción aguda de T_4 (Leatherland, 1982; Eales, 1985; Grau y cols, 1986; Byamungu y cols, 1990; Banerjee y cols, 1994), pero no se ha podido confirmar una secreción tiroidea de T_3 (Kühn, 1990). También ha sido descrito en la carpa que la actividad TSH incrementa los niveles plasmáticos de T_4 , sin afectar a los de T_3 (Kühn y cols, 1986).

En cuanto a una posible regulación negativa central, en los peces teleósteos parece que la TSH está fundamentalmente bajo un control hipotalámico inhibitor (véase rev. Peter y Fryer, 1983; Leatherland, 1988). También se ha demostrado la existencia de una **retroalimentación negativa** de las HT controlando la secreción de la TSH a través de una acción directa sobre la hipófisis en teleósteos (Bres y Eales, 1990), pudiendo producirse también a nivel hipotalámico (véase rev. Leatherland, 1987 y 1988).

Otras hormonas, como la prolactina, GH, hormonas gonadotrópicas, ACTH, corticosteroides, esteroides gonadales y catecolaminas, han sido también implicadas en la regulación de la secreción de TSH, describiéndose diversos efectos sobre la actividad tiroidea en los teleósteos (véase rev. Ng y cols, 1982; Leatherland, 1988; Kühn, 1990)

En relación con la **regulación periférica** del eje tiroideo en los peces, cada vez hay más evidencias que apuntan hacia la participación de hormonas hipofisarias en el control de la monodesyodación periférica de T_4 a T_3 (Kühn y cols, 1993). En este sentido, se ha observado un efecto estimulador de la GH (De Luze y Leloup, 1984; De Luze y cols, 1989; Yamada y cols, 1993), la prolactina (De Luze y Leloup, 1984; De Luze y cols, 1989), el cortisol y la testosterona (Vijayan y cols, 1988) sobre la 5'D hepática.

Por último, la función tiroidea está también regulada en los peces por **factores ambientales**, tales como el fotoperíodo, la temperatura y la alimentación (véase rev. Brown, 1988; Grau, 1988; Spieler, 1992).

3.2. Interacciones de la actividad tiroidea con la alimentación.

Estudios realizados en mamíferos, aves y peces indican que la función tiroidea es modificada por el estado nutricional. Así, alteraciones en la cantidad o el patrón de la ingesta afectan a la actividad tiroidea a distintos niveles, desde la liberación de TSH hasta las acciones de las HT a nivel celular (véase rev. Eales, 1988; Danforth y Burger, 1989). Cambios agudos y crónicos de la ingestión de nutrientes provocan fundamentalmente cambios tiroideos a dos niveles: 1) regulación de la secreción de T_4 a través del control del eje hipotálamo-hipofisario, y 2) conversión periférica de T_4 a T_3 e interacción con sus receptores nucleares (Eales, 1988).

Una de las aproximaciones experimentales más comunes para abordar este tema es la utilización de animales en ayuno, comparando su estado tiroideo con el de animales alimentados controles. Una información adicional es la obtenida con la realimentación de animales en ayuno, observando la respuesta aguda a la comida o a nutrientes concretos suministrados. Otros estudios han utilizado raciones diarias de alimento que varían en tamaño y/o calidad, evaluándose los cambios en la función tiroidea.

Los efectos producidos por el ayuno (desde días hasta varias semanas) en la actividad tiroidea han sido estudiados principalmente en salmónidos. Se ha descrito, así, que el ayuno provoca un descenso en los niveles plasmáticos de HT y en su aclaramiento (Higgs y Eales, 1977; Milne y cols, 1979; Flood y Eales, 1983), en la respuesta tiroidea a la TSH (Leatherland, 1982), en la desyodación de T_4 a T_3 (Flood y Eales, 1983; Shields y Eales, 1986; Sweeting y Eales, 1992d), y en la densidad de receptores de T_3 en núcleos de células hepáticas (Van Der Kraak y Eales, 1980). Por tanto, el ayuno puede producir un hipotiroidismo periférico al disminuir la secreción de T_4 , la producción periférica de T_3 y el número de sitios de unión nucleares hepáticos de T_3 .

Las alteraciones ocasionadas en la actividad tiroidea como consecuencia del ayuno son revertidas por la realimentación a las pocas horas, observándose un incremento en los niveles plasmáticos de HT y en la desyodación de T_4 a T_3 (Higgs y Eales, 1977; Flood y Eales, 1983; Himick y Eales, 1990).

Cuando los peces son alimentados con diferentes raciones de alimento, se observa una correlación entre los niveles plasmáticos de T_3 y la cantidad de alimento, con pocos cambios en la T_4 (Eales y Shostak, 1985b).

Ciertos estudios realizados en teleósteos ponen de manifiesto la existencia de ciclos diarios en los niveles plasmáticos de HT (Eales y cols, 1981; Spieler y Noeske, 1984; Cook y Eales, 1987). La manipulación del patrón de alimentación (por ejemplo la hora a la que los peces recibían el alimento) y de las condiciones fotoperiódicas han demostrado la importancia de la alimentación en dichos ciclos diarios, particularmente en el ciclo de T_4 .

Mientras que el ayuno anula las fluctuaciones diarias de los niveles plasmáticos de HT (Eales y cols, 1981), la alimentación incrementa la T_4 plasmática a corto plazo en la trucha (*Salmo gairdneri*) (Cook y Eales, 1987). Concretamente en este último estudio, los autores describen dos máximos en los niveles plasmáticos de T_4 , uno seguido a la presentación del alimento y el otro tras el inicio del fotociclo, siendo las fluctuaciones de T_3 plasmática menos pronunciadas. Por tanto, las fluctuaciones diarias de los niveles plasmáticos de T_4 parecen estar determinadas por el aporte inmediato de alimento, bien de manera directa, o indirecta a través de la interacción con las condiciones fotoperiódicas, siendo estimulada la secreción tiroidea de T_4 por la alimentación. Los niveles circulantes de T_3 , sin embargo, se ven menos afectados por la disponibilidad inmediata de nutrientes, y probablemente su respuesta a la alimentación sea originada por alteraciones en la conversión extratiroidea de T_4 a T_3 (Cook y Eales, 1987; Eales, 1988).

Estudios realizados en este sentido en la carpa dorada (*C. auratus*), indican que las fluctuaciones diarias en los niveles plasmáticos de T_4 parecen responder al fotoperíodo y ser relativamente insensibles a los cambios en el horario de la alimentación (Spieler y Noeske, 1984).

II. OBJETIVOS

El conocimiento actual sobre los distintos aspectos relacionados con la regulación de la alimentación por neuropéptidos está restringido fundamentalmente a los mamíferos, siendo estos aspectos mucho menos conocidos en el resto de vertebrados y especialmente escasos en los poiquiloterms. Teniendo en cuenta la importancia cada vez más relevante que está tomando el sistema peptidérgico en la regulación de la alimentación de forma general en todos los vertebrados, nos planteamos ampliar estos estudios a los peces, grupo de vertebrados en el que en el momento de empezar esta Tesis Doctoral no existía ningún dato al respecto. Por tanto, el objetivo general de la presente Memoria ha sido estudiar la regulación de la actividad alimentaria por neuropéptidos en peces ciprínidos, determinando las posibles interacciones con el eje tiroideo y el sistema catecolaminérgico hipotalámico.

Las especies elegidas para este estudio fueron *Carassius auratus* (carpa dorada) y *Tinca tinca* (tenca). Las carpas doradas tienen la ventaja de una fácil disponibilidad, así como una adaptación rápida a las condiciones de laboratorio. Por otro lado, el interés de las tencas radica, en que dentro de la familia de los ciprínidos, constituyen una especie de cultivo muy apreciada en acuicultura y de la que hay un gran desconocimiento de su conducta alimentaria. No obstante, las tencas son una especie muy estresable y su aclimatación y mantenimiento en el laboratorio resulta complejo, dificultando el desarrollo de experimentación.

Estudios preliminares realizados por nuestro grupo establecían por primera vez el papel del neuropéptido CRF en la alimentación en poiquiloterms, concretamente en larvas de anuros. Este primer indicio, unido a que el CRF es uno de los péptidos reguladores de la alimentación más ampliamente estudiado en los mamíferos, y a su importancia como posible mediador de las respuestas al estrés en todos los grupos de vertebrados a lo largo de la escala evolutiva, nos llevó a elegir dicho neuropéptido como representante de los péptidos inhibidores. En cuanto a los péptidos estimuladores involucrados en la regulación de la ingesta escogimos la β -endorfina y la galanina. La β -endorfina pertenece a la familia de péptidos opioides, formando parte del sistema opioide endógeno descrito para la mayoría de vertebrados e invertebrados estudiados, sugiriéndose una función importante en todos estos grupos por sí misma y por sus posibles interacciones con el CRF. El interés de la galanina reside en que es un péptido aislado más recientemente y constituye el primero de una nueva

familia de neuropéptidos, incluida dentro de los pocos péptidos descritos que activan la ingesta.

En primer lugar era necesaria la puesta a punto de técnicas instrumentales imprescindibles para el desarrollo de los objetivos. Inicialmente, había que desarrollar sistemas de inyecciones intraperitoneales e intracerebroventriculares adecuados y precisos para los peces. Asimismo, validamos los radioinmunoensayos de hormonas tiroideas y cortisol, así como la cuantificación de catecolaminas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con el objeto de determinar si dichos ensayos eran adecuados para la estimación de dichas hormonas y catecolaminas en muestras procedentes de *Carassius auratus* y *Tinca tinca*.

Debido a la escasez de trabajos concernientes a la especie *Tinca tinca*, y dada su difícil adaptación a las condiciones del laboratorio, como ya hemos comentado, el primer paso fue determinar inicialmente las condiciones óptimas de mantenimiento en nuestro laboratorio, caracterizando su patrón de alimentación en dichas condiciones. Estos estudios preliminares nos permitirían profundizar en otros aspectos sobre la regulación de la alimentación en esta especie.

Con el fin de determinar el posible efecto del CRF, la β -endorfina y la galanina en la ingestión de alimento en *C. auratus*, así como la dosis óptima de estos péptidos, realizamos las curvas dosis- y tiempo-respuesta. Además, para confirmar la especificidad de dichos efectos producidos por los neuropéptidos en cuestión, nos planteamos el estudio de un posible bloqueo por antagonistas específicos para cada uno de los neuropéptidos utilizados, CRF, β -endorfina y galanina.

En numerosas especies de vertebrados se ha descrito que la actividad tiroidea está fuertemente influenciada por el estado nutricional del animal en función de la cantidad y calidad del alimento. Puesto que los neuropéptidos provocan modificaciones en el grado de alimentación, nuestro objetivo es averiguar si estas modificaciones determinan también cambios en la actividad tiroidea.

Actualmente está bien establecida la relación entre los sistemas peptidérgico y monoaminérgico encefálicos en la regulación de diversas funciones, incluyendo la regulación de la alimentación. Partiendo de la información bibliográfica existente sobre los estudios realizados a este respecto en mamíferos, nuestro último objetivo ha sido iniciar el estudio del posible papel desempeñado por las interacciones entre las catecolaminas y los neuropéptidos elegidos en esta Tesis Doctoral en la regulación del comportamiento alimentario en *C. auratus*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES.

1.1. Productos.

a) Reactivos.

- Acetato sódico (6268, Merck)
- Acetil Coenzima A (101.893, Boehringer Mannheim)
- Ácido acético glacial (63, Merck)
- Ácido cítrico (Ac 725, Scharlau)
- Ácido clorhídrico (317, Merck)
- Ácido ortofosfórico (573, Merck)
- Ácido perclórico (518, Merck)
- Ácido pícrico (251049, Panreac)
- Ácido sulfúrico (131058, Panreac)
- Ácido tricloroacético (TCA) (252373, Panreac)
- Adrenalina (E-4250, Sigma)
- Agua bidestilada (Laboratorios Navarro, S.A. y Panreac)
- Agua grado HPLC (Ag 001, Scharlau)
- Albúmina de huevo (613, Doesder)
- Albúmina sérica bovina (A-7030, Sigma)
- Albúmina sérica bovina al 22%, pH 7,2 (40038, Ortho)
- Azul de metileno (251170, Panreac)
- Bicarbonato sódico (141638, Panreac)
- Bisulfito sódico (S-9000, Sigma)
- Carbógeno (SEO)
- Carbonato sódico (6392, Merck)
- CO₂ (Carburos metálicos)
- Cloroformo (2445, Merck)
- Cloruro cálcico (2083, Merck)
- Cloruro potásico (P-4504, Sigma)
- Cloruro sódico (141659, Panreac)
- Cortisol (H-4126, Sigma)
- DePex (18243, Serva)

- DHBA (3,4-dihidroxibenzilamina) (D-7012, Sigma)
- 2,5-Difeniloxazol (PPO) (D-5879, Sigma)
- Dimetil-POPOP (D-5879, Sigma)
- DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacético) (D-9128, Sigma)
- Dopamina (H-8502, Sigma)
- Dowex AG 1x2 (140-1251, BioRad)
- EDTA (Ac 965, Scharlau)
- EGTA (E-4378, Sigma)
- Eosina amarillenta (251299, Panreac)
- Etanol (983, Merck)
- Éter dietílico (141313, Panreac)
- Fenol (131322, Panreac)
- Formaldehído (071510, Probus)
- Fosfato dipotásico (141512, Panreac)
- Fosfato disódico (6580, Merck, y So 336, Scharlau)
- Fosfato monopotásico (141509, Panreac)
- Fosfato monosódico (6346, Merck)
- Glicerina (142329, Panreac)
- Glucógeno bovino (G-0885, Sigma)
- Helio (Carburos metálicos)
- Hematoxilina (251344, Panreac)
- Heparina al 5% (Leo)
- Hidróxido potásico (141515, Panreac)
- Hidróxido sódico (6498, Merck)
- HMPG (4-hidroxi-3-metoxifenil glicol) (H1377, Sigma)
- Metanol (6009, Merck)
- Metanol grado HPLC (Me 306, Scharlau)
- Metimazol (M-8506, Sigma)
- Noradrenalina (A-7257, Sigma)
- Octanosulfonato sódico (O-8380, Sigma)
- Parafina (251799, Panreac)
- Polietilenglicol 6000 (807491, Merck)
- Pronasa E (P-6911, Sigma)

- Reactivo de Folin-Ciocalteu (251567, Panreac)
- Sulfato cúprico (52367, Probus)
- Tartrato sódico-potásico (8087, Merck)
- Timerosal (T-5125, Sigma)
- Tolueno (8317, Merck)
- Tiroxina (T-2376, Sigma)
- Tris (T-1503, Sigma)
- Tris-ClH (T-3253, Sigma)
- Tritón X-100 (37238, Serva)
- Triyodotironina (T-2877, Sigma)
- Xileno (141769, Panreac)

b) Neuropéptidos.

- CRF (ovino: C-0922, C-2152, C-3167; Sigma)
- β -Endorfina (humana, E-6261, Sigma)
- Galanina (porcina, G-5773, Sigma)

c) Fármacos.

- BNTX (7-Benzilidenenaltrexona) (B-139, RBI)
- *Nor*-Binaltofimina (B-109, RBI)
- Clonidina (C-7897, Sigma)
- α -Helical CRF_[9-41] (C-0907, Sigma)
- DAGO ([D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-encefalina) (E-7384, Sigma)
- DPEN ([D-Pen²,pen⁵]-encefalina) (E-2260, Sigma)
- Fenilefrina (P-6126, Sigma)
- β -Funaltrexamina (O-003, RBI)
- Galantida (G-1278, Sigma)
- Metirapona (M-1259, Sigma)
- Naloxona (N-7758, Sigma)
- Naloxonazina (153613, ICN)
- Naltriben (N-156, RBI)
- Prazosín (P-7791, Sigma)
- Quinpirol (Q-102, RBI)

- R-SCH 23390 (D-054, RBI)
- R-SKF 38393 (S-101, RBI)
- Sulpirida (S-7771, Sigma)
- Tricain metanosulfonato (MS-222) (A-5040, Sigma)
- U-50488 (U-102, RBI)
- Yohimbina (Y-3125, Sigma)

d) Kits comerciales.

- Chromatest glucosa (Knickerbocker)
- Active Cortisol DSL 2000 (Diagnostic Systems Laboratories Inc.): Cortisol estándar, [¹²⁵I]Cortisol- PEG, anticuerpo anticortisol.

e) Sueros y anticuerpos.

- Anticuerpo antitiroxina (cedido por la Dra. M.J. Obregón)
- Anticuerpo antitriyodotironina (cedido por la Dra. M.J. Obregón)
- Suero de ternera

f) Radionucleidos.

- 1-[¹⁴C] Acetil-Coenzima A (act. esp. 60mCi/mmol) (Amersham)
- [¹²⁵I]Tiroxina (cedido por la Dra. G. Morreale)
- [¹³¹I]Tiroxina (cedido por la Dra. G. Morreale)
- [¹²⁵I]Triyodotironina (cedido por la Dra. G. Morreale)

1.2. Instrumental.

- Agitador multitubos (Corning, modelo 4010)
- Aguja 0,5 mm (Luer) y 0,3 mm (Microlance)
- Balanzas de precisión (Sartorius y Sauter 404)
- Baño de órganos termostatzado (Unitronic, modelo 320 OR)
- Bomba isocrática (Waters modelo 590, Millipore)
- Cámara fotográfica (Nikon)
- Campana extractora
- Cánulas (Venocath 18)
- Células de acondicionamiento (5021, ESA) y analítica (5011, ESA)

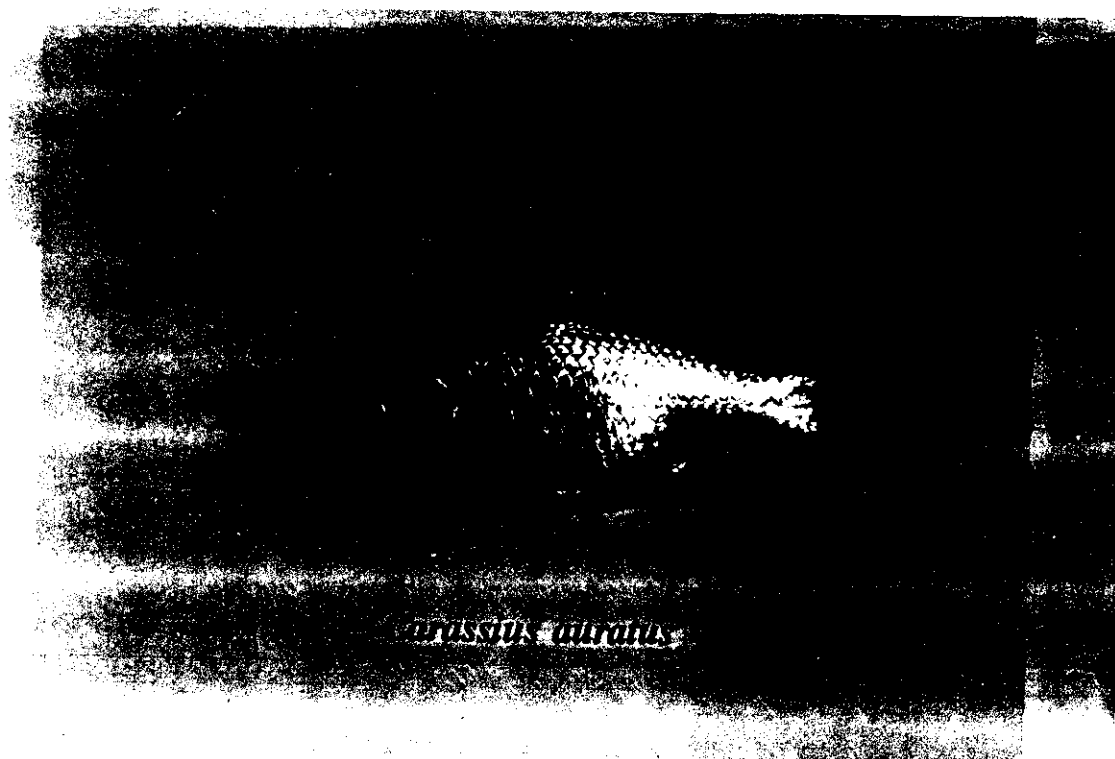
- Centrífuga refrigerada (Sigma, modelo 3K-2)
- Colorímetro (Atom, modelo Data-test atom 366)
- Columna Tracer (Spherisorb ODS2 5 μm , 12,5 x 0,46 cm; Tecknokroma)
- Congelador a -25°C (Liebherr) y -80°C (Forma Scientific 823)
- Contador β (Beckman, modelo LS 3801)
- Contador γ (LKB, modelo 1275 minigamma)
- Detector electroquímico (Coulchem II, ESA)
- Espectrofotómetro (Spectronic 1201, Milton Roy)
- Estufa de histología
- Evaporador-concentrador (Howe, modelo Giro vap)
- Filtros Millex-HV13 (SJSV-013, Millipore)
- Filtros Sartolon (25006, Sartorius)
- Homogeneizadores (Pobel)
- Integrador (Waters 746, Millipore)
- Inyector (Rheodyne 7125)
- Jeringuillas plástico 1 y 2 ml (ICO)
- Lupa binocular (Zeiss y Meiji EMZ-TR)
- Material de disección
- Microcentrífuga (Heraeus, modelo Biofuge 13)
- Microjeringas cristal 5, 25, 50 μl (Hamilton)
- Microscopio (Nikon y Oxford Trade)
- Microtomo (Reitcher 32617)
- Papel de cromatografía (Whatman 3MM)
- pHmetro (Crison, modelo D-501)
- Pipetas automáticas (Gilson y Kartell)
- Sonicador (Sonics and Materials Inc., modelo Vibra Cell)
- Tubos capilares 70 mm (GRI-CEL)

1.3. Material biológico: obtención y mantenimiento.

Los animales utilizados en la realización del trabajo experimental pertenecían a dos especies de teleósteos, *Tinca tinca* (tenca) y *Carassius auratus* (carpa o pez dorado) (Ilustr. 5). Ambas especies de teleósteos pertenecen al Orden Cipriniformes, Familia Ciprinidae y a las Subfamilias Leuciscinae y Ciprininae, respectivamente.



Tinca tinca



Ilustr. 5. Especies de peces teleósteos utilizadas en la presente Memoria.

Todos los individuos de *T. tinca* procedían del Centro Nacional de Cíprinicultura "Vegas del Guadiana" (Badajoz), y fueron amablemente donados por el Director de dicho centro, J. Pérez Regadera. Los ejemplares de *C. auratus* fueron suministrados por Eurozoo (Madrid). Una vez en el laboratorio, los animales se mantuvieron en acuarios de 50 y 100 l, provistos de sistemas de aireación y filtración continua de agua. La filtración se llevó a cabo con carbón activo (Filtros Eheim 9111), y los filtros se limpiaban una vez a la semana. Los peces recibían iluminación natural y el agua se mantenía a una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$.

La alimentación se realizó a base de pienso granulado para peces de estanque (Sera Biogran). La comida (1% del peso corporal) se administraba una vez al día por la mañana entre las 10:00 y las 11:00 horas.

Los animales se aclimataron a estas condiciones generales de laboratorio durante dos semanas como mínimo antes de ser utilizados en experimentos concretos. En algunos diseños experimentales se modificaron estas condiciones, que se especificarán en cada caso concreto.

2. MÉTODOS.

2.1. Técnicas de microinyección.

a) Solución salina de teleósteos.

- NaCl 0,6 g/100 ml
- NaHCO₃ 15,8 mg/100 ml

Después de la disolución completa de los componentes en agua destilada, se ajusta el pH a 7,2 con HCl 1 N. Conservación a 4°C.

b) Procedimiento general de las inyecciones.

Antes de ser sometidos a cualquiera de las técnicas de inyección (intracerebroventricular o intraperitoneal), los animales fueron anestesiados con MS-222 (dilución 1/10.000) disuelto en agua desclorada en la que se sumergía al animal durante 2-5 minutos. Este tipo de anestésico es muy utilizado en peces y anfibios debido a la facilidad de administración, a que el grado de anestesia es fácilmente regulable y a la rápida recuperación (1-3 minutos). Los animales se consideraban anestesiados cuando había pérdida de equilibrio, detenían su actividad natatoria y los movimientos operculares y bucales de respiración se hacían más lentos de lo habitual.

Los peces anestesiados se colocaban en un molde de parafina adaptado a la forma y tamaño del animal para facilitar su manipulación, evitando su desplazamiento. No se inyectaban más de 18 animales al día (durante 30 min. como máximo) para eliminar posibles desfases de tiempo significativos entre los animales inyectados.

c) **Inyecciones intracerebroventriculares (ICV).**

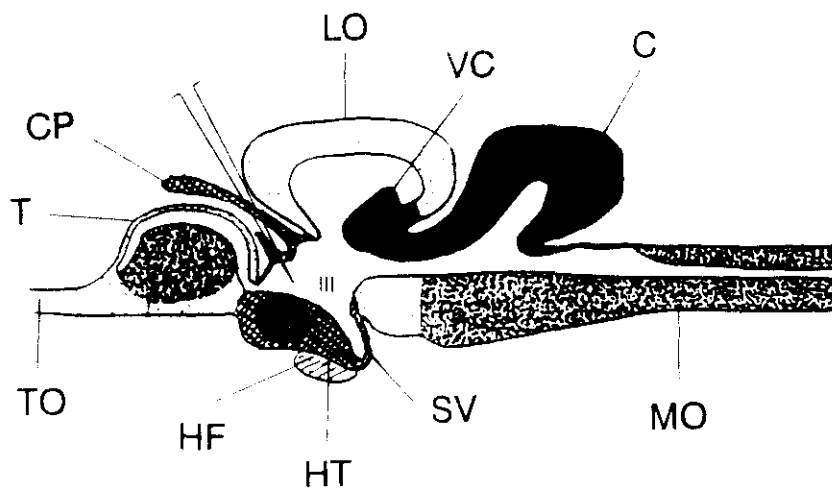
Las inyecciones se llevaron a cabo utilizando una microjeringa Hamilton de 5 μl a la que se le adaptaba, a través de una cánula de 0,5 mm de diámetro interno (Venocath 18), una aguja de 0,5 mm (Luer) ó de 0,3 mm (Microlance). El sistema se cebaba con agua destilada para evitar la contaminación de la microjeringa con la sustancia a inyectar y tras la formación de una pequeña burbuja de aire en la cánula (0,5 μl que equivalían a 2 mm), ésta se cargaba con el péptido, fármaco o solución salina, según se tratara de individuos experimentales o controles. El volumen inyectado fue 1 μl en todos los casos. La burbuja de aire evita la mezcla entre la solución a inyectar y el resto de líquido (agua) que ceba el sistema, y además la observación de su desplazamiento permite confirmar el volumen de solución inyectado. (Ilustr. 6a).

Utilizamos la técnica de inyección ICV descrita por Kavaliers (1989), con alguna modificación puesta a punto en nuestro laboratorio. Las inyecciones se realizaron a través de la cubierta ósea del encéfalo, introduciendo la aguja a través de la línea de inserción central que forman los huesos parietales y frontales (Ilustr. 6b). Esta zona es fácilmente reconocible con la ayuda de una lupa binocular y constituye un punto de menor resistencia que el resto de las estructuras óseas que cubren el encéfalo, pudiendo acceder fácilmente al sistema ventricular a la altura del diencéfalo (III ventrículo). La inclinación y profundidad de la aguja para que ésta alcance el sistema ventricular se determinaron previamente superponiendo la aguja en cortes sagitales de encéfalo a microscopía óptica, y realizando una marca en la aguja que indicaba la longitud de la misma que debía ser introducida. De este modo, en el pez anestesiado y situado en el molde de parafina en posición dorsal, se introducía la aguja en la cabeza del animal a una profundidad de 2-3 mm según el tamaño del pez y con una inclinación de unos 70° hacia la región posterior (Ilustr. 7).

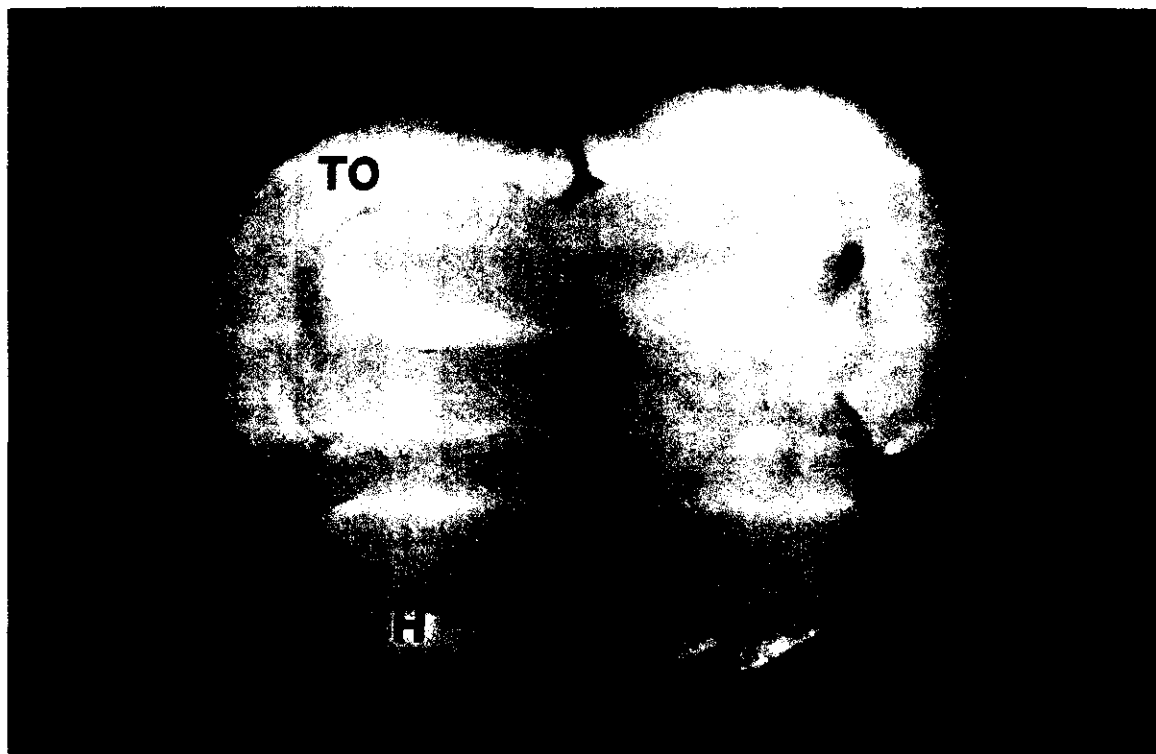
El correcto emplazamiento de las inyecciones ICV fue establecido en experimentos preliminares mediante la inyección de un colorante vital (azul de metileno). Los animales se inyectaron ICV con 1 μl de azul de metileno, extrayéndose posteriormente el encéfalo y congelando el mismo en hielo seco para poder obtener cortes transversales finos (1 mm).



Ilustr. 6. a) Sistema de inyección ICV compuesto por lupa binocular, pie y microjeringa-cánula-aguja. b) Vista dorsal de la cabeza de *C. auratus*. P, huesos parietales; F, huesos frontales; ↑, indica el punto en el que se inyecta.



Ilustr. 7. Esquema de un corte longitudinal del encéfalo de un teleosteo (modificado de Healey, 1957) mostrando la trayectoria seguida por la aguja en las inyecciones intracerebro-ventriculares. C, cerebelo; CP, complejo pineal; HF, hipofisis; HT, hipotálamo; LO, lóbulo óptico; MO, médula oblonga; SV, saco vascular; T, telencefalo; TO, tracto olfatorio; VL, válvula cerebelar.



Ilustr. 8. Corte transversal del encéfalo de *C. auratus* a nivel del diencéfalo. Se puede observar la presencia del azul de metileno en el III ventrículo (\uparrow). H, hipotálamo; TO, techo óptico.

La observación de los cortes a la lupa binocular permite determinar el grado de penetración del azul de metileno en el sistema ventricular a la altura del III ventrículo (Ilustr. 8). En el 85% de los casos ($n=18$) las inyecciones se realizaron correctamente, observando la presencia del colorante única y exclusivamente en el III ventrículo .

- Neuropéptidos y fármacos: preparación.

- Los péptidos CRF, Galanina (Gal) y β -Endorfina (β -E) se disuelven en agua bidestilada, obteniendo soluciones concentradas (2 y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) que posteriormente eran liofilizadas en alícuotas de 10 y 20 μl , y conservadas a -25°C hasta el momento de su utilización. Durante los experimentos se dilufan diariamente alícuotas en solución salina hasta obtener las concentraciones deseadas:

CRF: 0,1; 0,33; 1; 2 y 3,33 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ de solución salina.

Gal: 0,1; 1 y 3,3 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ de solución salina.

β -E: 0,001; 0,1 y 1 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ de solución salina.

- Los antagonistas de los anteriores péptidos, α -Helical CRF_[9-41], galantida y naloxona, se prepararon diariamente a las siguientes concentraciones:

α -Helical CRF_[9-41]: 10 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ de solución salina con NaOH 1 N (2%).

Galantida: 5 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ solución salina.

Naloxona: 10 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ solución salina.

- Los fármacos utilizados para el estudio de los RECEPTORES CATECOLAMINÉRGICOS fueron elegidos en base a su especificidad para los distintos receptores de catecolaminas, utilizándose a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Los fármacos se disolvían directamente en solución salina, excepto en el caso de ambos agonistas dopaminérgicos y el antagonista D₂-dopaminérgico en que fue necesario su disolución en ácido acético glacial (5%). Todas las soluciones se preparaban el mismo día del experimento.

<u>RECEPTOR</u>		<u>AGONISTA</u>	<u>ANTAGONISTA</u>
Adrenérgico	α_1	Fenilefrina	Prazosín
	α_2	Clonidina	Yohimbina
Dopaminérgico	D ₁	SKF 38393	SCH 23390
	D ₂	Quinpirol	Sulpirida

- Para el estudio de los RECEPTORES OPIOIDÉRGICOS, las soluciones de inyección se obtenían diariamente a partir de una solución concentrada de cada uno de los fármacos hasta conseguir la concentración final deseada ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para los agonistas; $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para los antagonistas). Los fármacos se disolvían directamente en solución salina y en algunos casos (antagonistas δ_1 , δ_2 , μ y μ_1) fue necesario disolverlos en metanol (10%).

<u>RECEPTOR OPIOIDÉRGICO</u>	<u>AGONISTA</u>	<u>ANTAGONISTA</u>
δ	DPEN	
δ_1		BNTX
δ_2		Naltriben
κ	U-50488	<i>nor</i> -BNI
μ	DAMGO	β -FNA
μ_1		Naloxonazina

d) Inyecciones intraperitoneales (IP).

Las inyecciones IP se realizaron con jeringuillas de plástico de 1 ml y aguja de 0,5 mm. El animal anestesiado se situaba en el molde de parafina en posición ventral. La aguja se introducía a la altura de la línea media ventral inmediatamente posterior a las aletas pélvicas, con una profundidad aproximada de 5 mm. El volumen de inyección se corregía en función del peso corporal del animal, inyectándose $100 \mu\text{l}$ solución salina/g de peso corporal.

- Neuropéptidos y fármacos: preparación.

- Los péptidos CRF, Gal y β -E se prepararon como en el apartado anterior (inyección ICV) a una concentración de $1 \mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$ solución salina.

- La metirapona (inhibidor de la síntesis de corticosteroides que actúa sobre la 11 β -hidroxilasa inhibiendo el paso de 11-deoxicortisol a cortisol) se disuelve en solución salina inmediatamente antes de su administración ($0,6 \text{ mg}/0,1 \text{ ml}$ solución salina).

- El cortisol se preparó inmediatamente antes de la inyección a una concentración de $0,1 \text{ mg}/0,1 \text{ ml}$ solución salina. Fue necesario disolverlo inicialmente en un 5% de etanol,

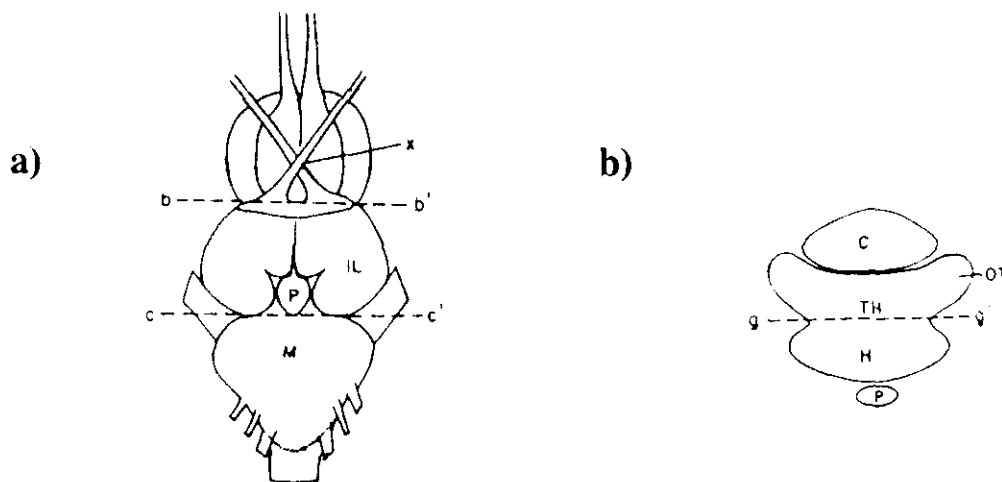
inyectando una cantidad igual (solución salina con 5% de etanol) a los individuos del grupo control.

2.2. Obtención de muestras.

Los animales se sacrificaron por decapitación inmediatamente por detrás del opérculo.

a) Hipotálamo.

Una vez decapitado el animal, se procede inmediatamente a la extracción del hipotálamo. Para ello se separa la mandíbula inferior de la mandíbula superior y cráneo. Con la ayuda de una lupa binocular se retira la capa de músculo y cartílago hasta acceder ventralmente al encéfalo. Rápidamente se disecciona y extrae el hipotálamo considerando como límite anterior el quiasma óptico y como límite posterior el comienzo de la médula oblonga (Ilustr. 9). El tejido se congela inmediatamente con nieve carbónica (hielo seco) en tubos eppendorf de polipropileno de 1,5 ml y se conserva a -25°C ó -80°C hasta el posterior análisis de catecolaminas.



Ilustr. 9. Esquema del encéfalo de un teleosteo (tomado de Senthilkumaran, 1993) mostrando los planos de corte (bb' y cc', planos de corte transversales; gg', plano horizontal a través del surco lateral que separa el hipotálamo del tálamo dorsal) para separar el hipotálamo (a, vista ventral; b, corte transversal a nivel de la hipófisis). C, cerebelo; H, hipotálamo; IL, lóbulo inferior; M, médula oblonga; OT, techo óptico; P, hipófisis; TH, tálamo; X, quiasma óptico.

b) Mandíbula inferior.

Para la valoración de hormonas tiroideas en el tiroides se utilizó la mandíbula inferior, ya que en los peces los folículos tiroideos se encuentran dispersos por la región faríngea a lo largo de la aorta ventral y los arcos aórticos (Norris, 1985). La mandíbula inferior se separó seccionando por detrás del opérculo y delante del corazón, a continuación se cortan y eliminan ligeramente los bordes laterales cartilagosos de la mandíbula. La mandíbula así seccionada, incluyendo el tejido tiroideo, se congela con hielo seco y se mantiene a -25°C hasta el momento de la valoración hormonal. En algunos casos los tejidos se procesaron para la observación de folículos tiroideos al microscopio óptico (Ilustr. 10).

c) Plasma.

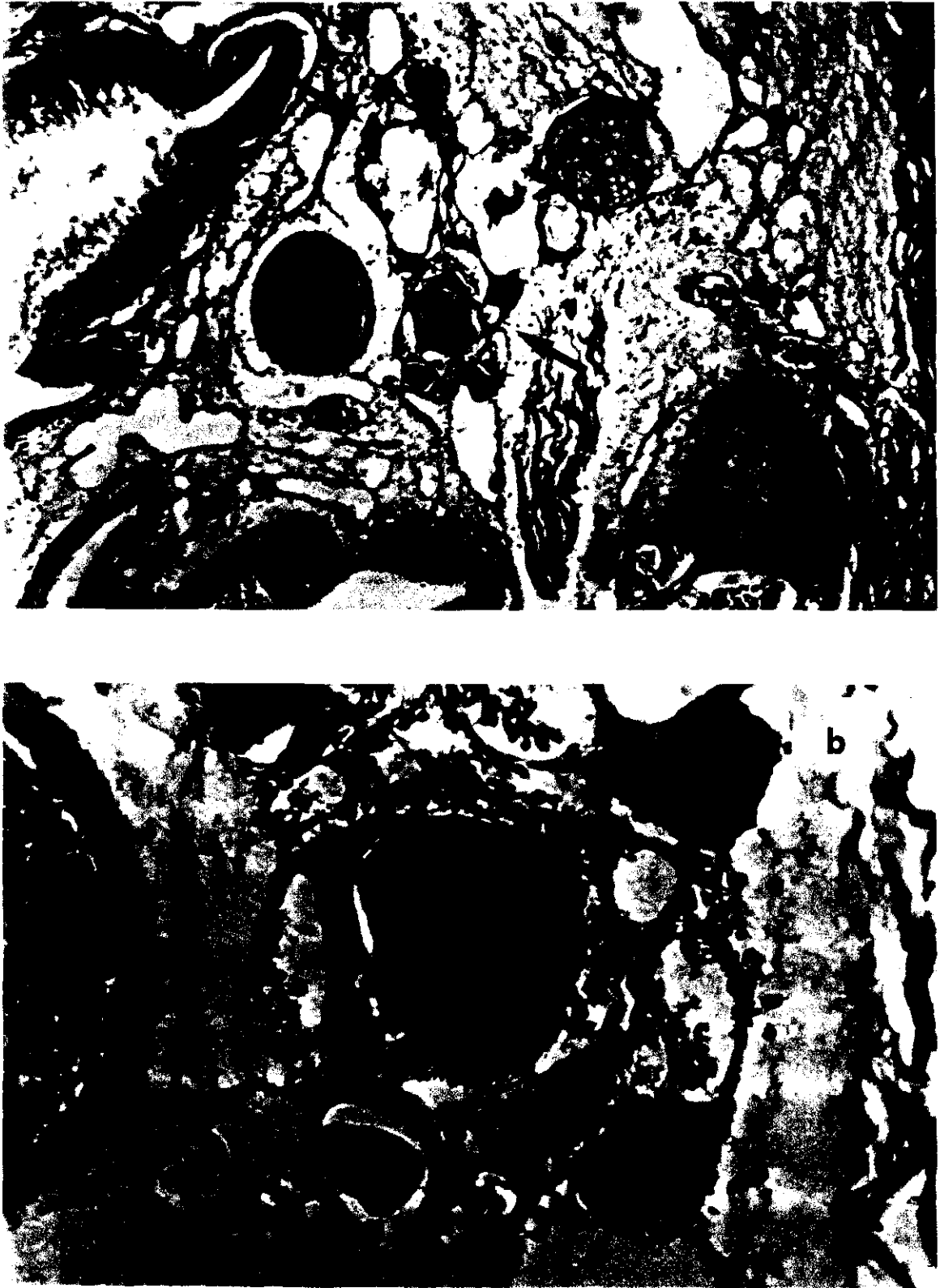
La sangre se obtenía por decapitación de los animales, se recogía con la ayuda de capilares heparinizados en tubos eppendorfs también previamente heparinizados y enfriados a 4°C (baño de hielo). Se centrifuga a 3.000 rpm (1.300 g) durante 10 minutos (4°C). Se recogía el sobrenadante con pipetas automáticas y las muestras de plasma así obtenidas se mantuvieron congeladas a -25°C hasta la realización de los ensayos analíticos.

d) Hígado.

Tras la extracción de sangre, se extirpó el hígado y se determinó su peso húmedo con el objeto de calcular posteriormente el índice hepatosomático (peso del hígado/100 g de peso corporal). El tejido se congeló con hielo seco y se conservó a -25°C hasta el momento en que se realizó la valoración de glucógeno.

e) Copas ópticas.

Una vez decapitado el animal, se procedió a la extracción del globo ocular, a continuación con unas tijeras de iridectomía y con ayuda de una lupa binocular se retiró la cornea y el iris cortando el globo ocular a nivel de la *ora serrata*. Seguidamente se extrajo el cristalino y el humor vítreo. Todo el proceso de extracción se realizó con el ojo inmerso en tampón fosfato salino pH 7,2 (fosfato sódico 0,1 M, NaCl 0,14 M, EGTA 10 mM). La retina se sumerge en $300\ \mu\text{l}$ del tampón de homogeneización del ensayo (ver apartado 2.4.5.a), congelándose inmediatamente sobre hielo seco. Las muestras se mantuvieron a -25°C hasta el momento de la determinación de la actividad serotonina N-acetiltransferasa (NAT).



Ilustr. 10. a) Corte transversal de la mandíbula inferior de *C. auratus* mostrando el aspecto general de la localización de los folículos tiroideos (↑) alrededor de la aorta (x 25). b) Vista detallada de algunos folículos tiroideos mostrando el coloide (★) (x 100).

2.3. Técnicas histológicas.

a) Fijación e inclusión.

La fijación del tejido (la mandíbula inferior o el encéfalo) se realizó en solución de Bouin (solución saturada de ác. pícrico 375 ml, formaldehído 100 ml y ác. acético 25 ml) durante 24 horas. A continuación y siguiendo la técnica habitual, se pasó por la serie ascendente de alcoholes (etanol 70°, 90°, 96°, 100°, 2 baños de 15 min cada uno, y tolueno, 4 min), realizándose la inclusión en parafina (punto de fusión 58-60°C) durante un mínimo de 4 horas en dos baños consecutivos.

b) Cortes y tinción.

Se realizaron cortes seriados sagitales y transversales de 7 y 10 μm de espesor que fueron montados secuencialmente en portas previamente tratados con albúmina-glicerina (1:1, p/v) y se secaron en una estufa a 35°C durante al menos 24 horas. Tras el desparafinado en xileno (3 baños de 15 min cada uno), los cortes se pasaron por la serie descendente de alcoholes (1 baño de 5 min en cada alcohol y en agua), tiñéndose a continuación con hematoxilina de Erlich (15 min) y eosina (2 min). Por último, los cortes se deshidrataron y se montaron con DePex.

2.4. Técnicas analíticas.

2.4.1 VALORACIÓN DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO.

Los peces eran alimentados como ya se mencionó anteriormente con pienso granulado, que era previamente troceado para obtener gránulos de un tamaño adecuado en función del grado de apertura bucal del animal y facilitar la captura del alimento. El hecho de que este tipo de alimento en forma de gránulos flote en el agua facilita su recolección y le hace idóneo para evaluar el grado de ingestión de alimento (ingesta).

La composición química del alimento es:

· Proteína cruda	29,8 %
· Grasa cruda	2,8 %
· Fibra cruda	2,0 %
· Ceniza	9,8 %
· Extractos sin nitrógeno	55,6 %
· Humedad	8,2 %

La ingesta se calculaba según la siguiente fórmula:

$$I = P_i - (P_f \times F)$$

I = ingesta

P_i = peso seco inicial de la comida. Corresponde al peso de la comida menos el 8,2 % de agua.

P_f = peso seco final de la comida remanente transcurrido el período de ingestión (2, 4, 6 u 8 horas). Los gránulos de comida restantes se recogían con una red fina, se colocaban en cestillos de papel de aluminio previamente pesados, y se llevaban a peso seco en una estufa a 40°C (4-5 h).

F = factor de corrección. A pesar de la capacidad de flotación de los gránulos de alimento, durante el tiempo de ingestión, se produce una cierta disolución del mismo en el agua, que es corregida mediante un factor, F, que calculamos de la siguiente manera:

- Añadir en 10 acuarios individuales una cantidad prepesada de comida (P_i) variable entre 0,2 y 1 g.

- Recoger la comida tras 2, 4, 6 y 8 horas.

- Deshidratación y posteriormente pesada (P_f).

- $F = P_i / P_f$,

· $F(2 \text{ h}) = 1,086 \pm 0,0062$ (n = 10)

· $F(4 \text{ h}) = 1,120 \pm 0,0186$ (n = 10)

· $F(6 \text{ h}) = 1,176 \pm 0,0036$ (n = 10)

· $F(8 \text{ h}) = 1,348 \pm 0,0120$ (n = 10)

F, representa, por tanto, la reducción de peso de la comida, por el efecto de disolución, tras permanecer en el agua un determinado número de horas.

2.4.2 VALORACIÓN DE GLUCOSA PLASMÁTICA.

Los niveles de glucosa en plasma se determinaron mediante una técnica enzimático-colorimétrica por el método de la glucosa oxidasa (GOD), utilizando un kit comercial suministrado por los laboratorios Knickerbocker (Cromatest Glucosa) y cuyo fundamento teórico es el siguiente: la GOD cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona, en presencia de peroxidasa (POD). La quinona roja formada es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra ensayada.

a) Reactivos.

- Mezcla enzimática:

· Tampón fosfato, pH 7,5	50	mmol
· Ampirona	0,4	mmol
· GOD	3.000	U
· POD	500	U

Disolver el contenido de un vial en 250 ml de H₂O.

- Fenol: disolver un vial (2,5 mmol) en 250 ml de H₂O.
- Reactivo de trabajo: mezclar volúmenes iguales de mezcla enzimática y de fenol.
- Patrón glucosa-urea: contiene 100 mg glucosa-50mg urea/100 ml.

b) Procedimiento.

- Añadir 2,5 ml del reactivo de trabajo a 20 μ l de muestra.
- Agitar e incubar durante 10 min a 37°C.
- Lectura de la absorbancia a 505 nm.
- Patrón combinado de glucosa-urea en el intervalo 25-500 mg/100 ml.
- Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado y los datos se expresaron en mg/ml.

2.4.3 VALORACIÓN DE GLUCÓGENO HEPÁTICO.**a) Reactivos.**

- KOH (30%): 30 g en 100 ml de H₂O.
- TCA (20%): 20 g en 100 ml de H₂O.
- Solución de fenol: 80 g de fenol en 20 g de H₂O.

b) Procedimiento.

- **Extracción.** (Cifonelli y cols, 1956; Montgomery, 1957).
 - Añadir 1 ml de KOH a 20-40 mg de hígado.
 - Llevar a ebullición durante 40 minutos.
 - Neutralización con 0,3 ml de ác. acético.
 - Añadir 2,6 ml de etanol al 96%.
 - Calentar suavemente hasta provocar la precipitación.
 - Centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos.

- Decantar y lavar el precipitado con 4 ml de etanol absoluto.
 - Repetir la serie de centrifugación-decantación-lavado con 4 ml de éter.
 - Centrifugación (3000 rpm, 15 min) y decantar el sobrenadante.
 - Disolución del precipitado una vez seco en una gota de KOH.
 - Añadir 0,75 ml de H₂O y agitar hasta la completa disolución.
 - Añadir 0,25 ml de TCA y mantener toda la noche en frío (4°C).
 - Centrifugación a 5000 rpm durante 15 min.
 - Añadir 2 ml de H₂O a 0,5 ml del sobrenadante (solución problema).
- **Determinación espectrofotométrica.** (Dubois y cols, 1956).
- Añadir 950 μ l de H₂O a 50 μ l de solución problema.
 - Añadir 25 μ l de solución de fenol y 2,5 ml de H₂SO₄ concentrado.
 - Una vez frío incubar 15 min a 25°C.
 - Lectura de la absorbancia a 487 nm.
 - Patrón glucógeno hepático bovino en el intervalo 2,5-100 μ g.
 - Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado y los datos se expresaron en μ g glucógeno/mg de tejido y μ g glucógeno/ μ g proteínas.

2.4.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

Se utilizó el método descrito por Lowry y cols (1951).

a) Reactivos.

- Tartrato Na-K (2%): 2 g en 100 ml de H₂O.
- CuSO₄ (1%): 1 g en 100 ml de H₂O.
- Solución B: NaOH (1 g) + Na₂CO₃ (5 g) en 250 ml de H₂O.
- Solución C: 1 ml CuSO₄ (1%) + 1 ml Tartrato (2%) en 100 ml de solución B.

b) Procesado de las muestras.

- **Mandíbula inferior:**
 - Homogeneizar en metanol (12 ml/g tejido).
 - Llevar 50 μ l del homogeneizado a 1,5 ml de H₂O (solución problema).
- **Hígado:**
 - Sonicar 10 mg de tejido en 1 ml de H₂O.

- Llevar 50 μ l del homogeneizado a 0,5 ml de H₂O (solución problema).
- **Copa óptica:**
 - Sonicar la retina en 300 μ l de tampón de homogeneización (ver apartado 2.4.5.a).
 - Llevar 20 μ l del homogeneizado a 0,5 ml de H₂O (solución problema).

c) Procedimiento.

- Añadir 2,5 ml de la solución C a 0,5 ml de solución problema.
- Agitar e incubar 15 minutos a 30°C.
- Añadir 0,25 ml de reactivo Folin:H₂O (1:1).
- Agitar e incubar 30 minutos a 30°C.
- Lectura de la absorbancia a 505 nm.
- Patrón de seroalbúmina bovina (BSA) en el intervalo 5-400 μ g.

2.4.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEROTONINA N-ACETILTRANSFERASA (NAT).

a) Principio del ensayo.

La actividad NAT fue valorada en la retina mediante una técnica radioenzimática desarrollada en nuestro laboratorio (Alonso-Gómez y cols, 1992) a partir del método original de Parfitt y cols (1975).

La NAT cataliza la acetilación de la serotonina para formar N-acetilserotonina utilizando acetil-coenzima A (AcCoA) como donador del acetilo. Partiendo de una mezcla de sustratos en la que uno de ellos está marcado radiactivamente, tras la catálisis la cantidad de radiactividad incorporada en el producto será directamente proporcional a la actividad de la enzima (NAT) responsable de la misma.

b) Reactivos.

- Tampón fosfato potásico 250 mM pH 6,5:
 - KH₂PO₄ 27,14 g/l
 - K₂HPO₄ 8,725 g/l
- EGTA 20 mM: 0,152 g de EGTA en 20 ml tampón fosfato 250 mM.
- Solución de Bray:

- Tolueno 667 ml
- Tritón X-100 333 ml
- PPO 10 g
- Dimetil POPOP 250 mg

- Solución de AcCoA 10,5 mM en tampón fosfato 250 M: se mantiene congelada a -25°C y es estable al menos durante 6 meses.

- Solución de [¹⁴C]AcCoA 328 M: se consigue por dilución del compuesto marcado en tampón fosfato 0,25 mM (1 μCi/60 μl). Alícuotas de 100 μl se conservaban a -25°C.

- Solución de trabajo: solución anterior (2.000 cpm/μl) con triptamina 100 mM.

c) **Procedimiento.**

- El tejido ocular se sonica en 300 μl de tampón fosfato con EGTA 20 mM (3 veces durante 5 segundos, al 70% de la potencia de salida a 25 W).

- Añadir a 100 μl del homogeneizado, 80 μl de AcCoA (125 μM) y 20 μl de solución de trabajo (40.000 cpm/tubo).

- Incluir 2 tubos blancos, sustituyendo la muestra por 100 μl de tampón de homogeneización.

- Incubación a 25°C durante 20 minutos.

- Parar la reacción con 1 ml de cloroformo frío, y agitar durante 1 min.

- Eliminar por aspiración el sobrenadante.

- Añadir 200 μl de tampón fosfato y agitar durante 1 minuto.

- Centrifugar a 6000 g durante 1 min y aspirar el sobrenadante (lavar 2 veces).

- Recoger 0,5 ml de la fase de cloroformo en un vial y evaporación a temperatura ambiente.

- Reconstitución del residuo seco en 100 μl de etanol.

- Añadir 2 ml de solución de Bray y contaje de la radiactividad.

- Los resultados se expresaron en nmoles de producto formado por hora de incubación y por ojo, y como nmol/h/mg proteínas.

Las determinaciones de actividad NAT expuestas en esta Memoria han sido realizadas por el Dr. A.L. Alonso-Gómez.

2.4.6 CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS POR RADIOINMUNOENSAYO (RIA).

a) Principio del ensayo.

El radioinmunoensayo se basa en la reacción de inhibición competitiva que se establece entre un antígeno sin marcar u hormona fría (hormona presente en la muestra) y una cantidad constante de ese mismo antígeno marcado radiactivamente, en la unión a un anticuerpo específico. La incubación de una mezcla de los antígenos frío y marcado en presencia del anticuerpo específico permite que se establezca un equilibrio químico entre las formas unidas y libre del antígeno. La afinidad de ambos antígenos por el anticuerpo, que se añade en una cantidad constante, es la misma por lo que la cantidad de antígeno marcado que se pueda ligar al anticuerpo dependerá de la hormona fría presente en la muestra. Por tanto, una vez alcanzado el equilibrio tras la incubación, existe una relación entre la concentración de antígeno frío y la proporción del marcador desplazada del complejo antígeno-anticuerpo. Esta característica permite estimar concentraciones desconocidas de una hormona presente en la muestra comparando la cantidad del marcador unido al anticuerpo con una curva estándar realizada con concentraciones conocidas de hormona.

Para poder llevar a cabo una cuantificación correcta, es necesario poder separar de forma fiable las fracciones libre y unida del marcador, lo que se consigue precipitando los complejos antígeno-anticuerpo. Dicha precipitación se suele realizar con un segundo anticuerpo contra las inmunoglobulinas de la especie animal productora del primer anticuerpo. La radiactividad se mide en el precipitado (fracción unida). Este método se utiliza generalmente cuando el marcador emite radiación γ (^{125}I , ^{131}I).

b) Cálculo de los resultados.

Para la realización del RIA, además de la curva estándar, deben incluirse los siguientes tubos controles:

- Cuentas totales (T): Contienen únicamente la cantidad total de marcador añadido a todos los tubos.
- Unión máxima (B_0): Dichos tubos no tienen hormona fría, y representan la unión máxima del marcador al anticuerpo (el volumen de la muestra se sustituye por un volumen equivalente de tampón del RIA, o del estándar cero en el caso de los RIAs comerciales, para mantener constante el volumen final de reacción).

- Unión inespecífica (NSB): En este tubo no existe anticuerpo y define la unión no específica del marcador al tubo de ensayo (el volumen del anticuerpo se sustituye por un volumen equivalente de tampón del RIA, o del estándar cero).

A partir de estos tubos y de los obtenidos de la curva estándar se realizan los siguientes cálculos:

- Capacidad de unión (%) = $(Bo-NSB)/T \times 100$
- Unión inespecífica (%) = $NSB/T \times 100$
- Unión para estándares y muestras (Y):

$$Y (\%): = [muestra(cpm) - NSB] / [Bo(cpm) - NSB] \times 100$$

La representación gráfica de la curva estándar fue Y frente a $\log[H]$ (lineal-logarítmica). La curva resultante tiene un perfil sigmoideo, en el que se aprecia con claridad el intervalo de la curva con mayor precisión, que corresponde al tramo de mayor pendiente.

El cálculo de las concentraciones de las muestras se realizó por un método de interpolación utilizando segmentos de curvas de 3º grado. Estos segmentos son unidos para obtener una curva continua con un mínimo de oscilaciones, para conseguirlo el proceso es repetido varias veces por cálculo iterativo asistido por ordenador.

Los resultados se expresaron en pg ó ng/ml para el plasma, y en pg ó ng/mg proteínas para el tejido tiroideo (no existiendo diferencias si se expresan como contenido de HT por mandíbula).

c) Criterios de validez del RIA. (Midgley y cols, 1969).

Los criterios de validez que debe cumplir un RIA son los siguientes:

- **Especificidad.** Es la capacidad del anticuerpo de discernir selectivamente entre varios compuestos químicamente relacionados con la hormona a valorar, y que pueden existir en las muestras biológicas. Se calcula como los coeficientes de reacción cruzada, que representan la relación en tanto por ciento entre las concentraciones de hormona y el compuesto similar necesarios para obtener un desplazamiento del 50% de una cantidad conocida de marcador.
- **Paralelismo.** Entre la curva estándar y una serie de diluciones de una muestra. Este método de validación es utilizado como un índice de la similitud de la inmunorreactividad entre el compuesto estándar y el valorado en la muestra. La existencia de paralelismo indica

que el factor de dilución utilizado no afecta a la estimación de la concentración final de hormona.

- **Recuperación.** Se define como la diferencia en tanto por ciento entre el valor estimado mediante RIA y la cantidad real de hormona añadida. En el caso de realizarse utilizando varias concentraciones de hormona, debe establecerse una correlación lineal entre la cantidad real y la estimada.

- **Sensibilidad.** Se define como la menor concentración de hormona que puede ser discriminada de la unión máxima (B_0) con una $p < 0,05$. La sensibilidad se calcula como el punto que dista del B_0 en 2 veces su desviación estándar.

- **Precisión y reproducibilidad.** Se mide por medio de los coeficientes de variación (desviación típica/media %) intra- e interensayo, determinados a varias concentraciones de la curva estándar. Dichos coeficientes muestran la reproducibilidad del método bajo las condiciones del ensayo utilizadas y deben ser siempre inferiores a la variabilidad encontrada en las muestras biológicas.

2.4.6.1. Cuantificación de hormonas tiroideas.

Los trazadores internos utilizados en el proceso de extracción y los utilizados como antígenos en los RIAs fueron cedidos amablemente por la Dra. G. Morreale de Escobar (Unidad de Endocrinología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC y Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid) y fueron sintetizados en su laboratorio por el método de la cloramina T a partir de yodotironinas de un grado menor de yodación (3,5- T_2), consiguiéndose una actividad específica (3.000 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) superior a la de los productos comerciales disponibles, lo que resulta esencial para conseguir la alta sensibilidad de los RIAs necesaria para la valoración de HT en muestras de teleósteos.

En las muestras de plasma, y con el objeto de concentrar las HT, previamente a la realización de los RIAs se llevó a cabo un proceso de extracción. En el caso del tiroides el proceso seguido fue diferente (véase apartado 2.4.6.1.b).

a) Extracción de hormonas tiroideas del plasma.

- Tampones de extracción.

Los tampones se obtienen a partir de dos soluciones (A y B) preparadas en agua bidestilada:

- Solución A: Ácido acético glacial 11,5 ml/l
- Solución B: Acetato sódico anhidro 16,4 g/l

	<u>A</u>	<u>B</u>	
- Tampón acetato pH 7:	1,25 ml	1 l	
- Tampón acetato pH 4:	1 l	180 ml	
- Tampón acetato pH 3:	1 l	10 ml	

Los pH se ajustan con NaOH o ácido acético según el caso.

- Procedimiento.

- Añadir cloroformo-metanol (2:1, v/v) a las muestras, de manera que el volumen final del extracto fuera unas 20 veces el volumen de plasma utilizado (Folch y cols, 1957; Gordon y cols, 1982).

- Añadir como trazadores internos, aproximadamente 1000-2000 cpm de $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ y $[^{131}\text{I}]\text{T}_4$ de alta actividad específica y conteniendo menos de 1-2 pg de T_3 o T_4 , en 100 μl de metanol, con el objeto de calcular la recuperación individual de las yodotironinas para cada muestra.

- Centrifugar 15 min a 2.000 rpm (800 g).

- Añadir al sobrenadante Cl_2Ca 0,05% (p/v) en una cantidad de acuerdo con la siguiente relación: $1/4 (V_f - Ax_B) - Ax_B$, donde V_f representa el volumen final del extracto, A es un coeficiente que refleja el porcentaje de agua del tejido (1 para el plasma) y B el volumen de muestra. Con este paso conseguimos extraer las yodotironinas en una fase acuosa (Gordon y cols, 1982).

- Separación durante toda la noche en frío (4°C).

- Extraer nuevamente con una mezcla de cloroformo-metanol- Cl_2Ca en la proporción 3:49:48 (v/v/v).

- Concentración y purificación de las yodotironinas pasando el extracto acuoso a través de columnas que contenían 1 ml de resina de intercambio aniónico Dowex AG 1x2 (Mallof y cols, 1982; Morreale de Escobar y cols, 1985).

Las columnas fueron confeccionadas utilizando jeringas de polipropileno de 2 ml sin el émbolo, colocando a la entrada del cono un círculo de papel de cromatografía Whatmann (3MM). Previamente a su utilización el Dowex era tratado durante al menos 12 horas con ácido acético al 70%, procediéndose posteriormente a su lavado con agua destilada. Finalmente, se ajustaban las columnas a pH 7 mediante lavados con tampón acetato pH 7.

- Una vez pasada la muestra por las columnas, se procedía al lavado de las mismas en el siguiente orden:

- 2 ml de tampón acetato pH 7
- 2 ml de etanol
- 2 ml de tampón acetato pH 7
- 2 ml de tampón acetato pH 4
- 2 ml de tampón acetato pH 3
- 2 ml de ácido acético al 1%
- 2 ml de ácido acético al 35%

- Eluir las yodotironinas que quedan retenidas en la columnas en 5 fracciones, de 0,5 ml cada una, con ácido acético al 70%.

- Medir la radiactividad (^{125}I y ^{131}I) de las fracciones en un contador γ y unir las 2-3 fracciones que contenían la mayor parte de los trazadores internos.

- Evaporar a sequedad (50°C, 5-6 h) en un rotavapor en condiciones de vacío.

- Reconstitución de los precipitados en 300 μl de tampón A del RIA y conservación a -25°C hasta el momento de la valoración de las HT.

El contaje de las fracciones con los trazadores debe hacerse con exactitud, ya que dicho contaje se emplea para calcular la recuperación individual de cada hormona, corrigiendo las concentraciones obtenidas en los RIAs en función de dicho valor. Para realizar los citados cálculos de recuperación se introducían en cada ensayo 8 tubos estándares de contaje, 4 contenían la cantidad total de trazador añadida a las muestras ($[^{125}\text{I}]\text{T}_3 + [^{131}\text{I}]\text{T}_4$) y 4 únicamente con $[^{131}\text{I}]\text{T}_4$ para calcular la interferencia del ^{131}I en el canal de contaje del ^{125}I . También se incluían 2 blancos que seguían el mismo proceso que las muestras. Los porcentajes de recuperación normalmente fueron del orden de un 60-85% para T_3 y 50-70% para T_4 . La $[^{131}\text{I}]\text{T}_4$ se utilizó durante un período no superior a un mes a partir de la fecha de marcaje con el fin de evitar la adición de T_4 a las muestras ya que la vida media de este isótopo es más corta que la del ^{125}I (1 mes frente a 4 meses). La pureza radioquímica de los trazadores internos fue del 99% conservándose un alto grado de estabilidad en etanol (50%), lo cual fue comprobado, por la Dra Morreale de Escobar, por cromatografía en capa fina inmediatamente antes de su uso (Morreale de Escobar y cols, 1985).

b) Procesado de la mandíbula inferior conteniendo el tejido tiroideo.**- Reactivos.**

- Tampón Tris-ClH, 0,2 M, pH 8,6:

- Tris-ClH 8,84 g/l
- Tris 17,44 g/l
- Metimazol 2,85 g/l

Conservación a 4°C. Duración máxima 20 días.

- Pronasa E al 0,58% (p/v), con una actividad de 4,6 U/mg, en tampón Tris-ClH.

Preparación en el momento del ensayo.

- Procedimiento.

- Se homogeneiza la muestra en metanol (12 ml/g tejido) utilizando homogeneizadores tipo Potter-Elvehjem (teflón-vidrio) acoplados a un rotor automático (2.900 rpm).

- Se retira una alícuota del homogeneizado (30 μ l) para la valoración de proteínas.

- Centrifugar durante 15 min a 4.000 rpm (2.150 g) y 4°C.

- Recuperar y evaporar el sobrenadante. Reconstituir la muestra en 500 μ l de tampón A del RIA y conservar a -25°C. Las HT así extraídas representan el contenido libre de T₃ y T₄ en el tiroides (Morreale de Escobar y cols, 1988).

- Secado del precipitado al aire.

- Digestión proteolítica con Pronasa E 0,58% (500 μ l) durante 12 horas a 37°C, para romper los enlaces covalentes que mantienen unidas las HT a la Tg (Rolland y cols, 1970).

- Añadir 3 ml de metanol frío para parar la reacción.

- Centrifugación (15 min, 4.000 rpm, 4°C).

- Recuperar el sobrenadante. Evaporar y reconstituir en 1 ml de tampón A del RIA, conservar a -25°C. Esta fracción representa los residuos intratiroideos de yodotironinas incorporadas en la Tg (Morreale de Escobar y cols, 1988) y lo designaremos como el contenido tiroideo de HT unidas.

c) Tampones de los RIAs.

- **Tampón A:** Tampón fosfato 0,04 M, pH 8, BSA 0,2%.

- PO₄H₂Na.H₂O 0,2940 g/l
- PO₄HNa₂.2H₂O 6,7520 g/l
- Mertiolato 0,2429 g/l

- BSA 22% 10 ml/l
- **Tampón B:** Tampón fosfato 0,04 M, pH 8 (tampón A sin BSA).
- **Tampón C:** Tampón fosfato 0,04 M, pH 8, BSA 0,05% (tampón A con 2,5 ml/l de BSA).
- **Tampón D:** Tampón fosfato 0,04 M, pH 8, BSA 0,05% con cisteína (tampón C + 100 mg cisteína/l).

El pH se ajustó con NaOH o ácido ortofosfórico según el caso.

d) Procedimiento del RIA de triyodotironina.

- Curva estándar.

- Se pesan 5 mg de T_3 y se disuelven en 250 ml de NaOH 0,05 N. La concentración de esta solución madre será de 20 $\mu\text{g/ml}$. Se puede conservar hasta 2 meses a 4°C.

- Dilución en tampón A de la solución madre, para conseguir una solución patrón a una concentración de 5 ng/ml. Se conserva como máximo 2 semanas a 4°C.

- A partir de la solución patrón, y en el momento del ensayo, se hacen diluciones sucesivas con tampón A hasta conseguir las siguientes cantidades de T_3 en un volumen final de 10 μl : 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 y 50 pg de T_3 .

- Anticuerpos.

Tanto el anticuerpo anti- T_3 como el anticuerpo anti- T_4 fueron cedidos amablemente por la Dra M.J. Obregón (Unidad de Endocrinología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC y Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid). La especificidad del anticuerpo anti- T_3 ha sido previamente caracterizada (Ruiz de Oña y cols, 1991) obteniéndose las siguientes reacciones cruzadas:

<u>Compuesto</u>	<u>Reacción cruzada %</u>
T_3	100,0
T_4	1,1
3',3- T_2	0,9
3,5- T_2	0,7
Tetrac	0,5
r T_3	0,0016

En el caso del anticuerpo anti-T₃ se hizo una dilución 1:500 que se dividió en alícuotas para 100 y 200 tubos de RIA que se mantenían congeladas a -25°C. A partir de la dilución 1:500 se hacía una dilución 1:150 con tampón A, en el momento de realizar el RIA.

Como reactivo precipitante se utilizó una mezcla de polietilenglicol (PEG) al 30% (p/v) preparado en tampón B y suero de ternera diluido con tampón B (1:6,66).

- Protocolo.

- Pipetear 10 µl de cada uno de los puntos de la curva estándar y 10 ó 60 µl de muestra (las diluciones finales para la determinación de las fracciones libre (F) y unida (B) de T₃ tiroidea fueron 1:25 y 1:5.000, respectivamente).

- Igualar el volumen final en todos los tubos con tampón A hasta 60 µl.

- Añadir 50 µl de anticuerpo anti-T₃ diluido.

- Añadir 100 µl de [¹²⁵I]T₃ (6.000-7.000 cpm/tubo) preparada en tampón A.

- Agitar e incubar durante 12 horas a temperatura ambiente y oscuridad.

- La precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó añadiendo 1,5 ml del reactivo precipitante (se mantiene en agitación magnética constante) cuya composición es: 1 ml de PEG 30% y 0,5 ml de suero de ternera diluido.

- Agitación durante 20 s.

- Centrifugación durante 40 min a 4.000 rpm (2.000 g) y 14°C.

- Aspiración del sobrenadante con bomba de vacío.

- Contaje de radiactividad en el precipitado (contador γ). Eficacia del canal de ¹²⁵I 70%.

e) Procedimiento del RIA de tiroxina.

- Curva estándar.

- Se pesan 5 mg de T₄ y se disuelven en 100 ml de NaOH 0,05 N. La concentración de esta solución madre será de 50 µg/ml. Se puede conservar hasta 2 meses a 4°C.

- Dilución en tampón C de la solución madre, para conseguir una solución con una concentración de 64 ng/ml. Se conserva como máximo 2 semanas a 4°C.

- Dilución 1:10 de la solución anterior en tampón C en el momento del ensayo (concentración de la solución patrón: 6,4 ng/ml).

- A partir de la solución patrón, y en el momento del ensayo, se hacen diluciones sucesivas con tampón F hasta conseguir las siguientes cantidades de T_4 en un volumen final de 50 μl : 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160 y 320 μg de T_4 .

- Anticuerpos.

La especificidad del anticuerpo anti- T_4 ha sido previamente caracterizada (Ruiz de Oña y cols, 1991) obteniéndose las siguientes reacciones cruzadas:

<u>Compuesto</u>	<u>Reacción cruzada %</u>
T_4	100,0
Tetrac	4,0
r T_3	1,7
T_3	1,2
Triac	0,3
3',3- T_2	< 0,005
3,5- T_2	< 0,005

En el caso del anticuerpo anti- T_4 se hizo una dilución 1:50 que se dividió en alícuotas para 100 ó 200 tubos de RIA y se congelaron a -25°C . A partir de la dilución anterior se hacía una dilución 1:600, con tampón C, en el momento de realizar el RIA.

Como reactivo precipitante se utilizó la misma mezcla que en el caso del RIA de T_3 .

- Procedimiento.

- Pipetear 50 μl de cada uno de los puntos de la curva estándar y 10 ó 50 μl de muestra (las diluciones finales para la determinación del contenido tiroideo de FT_4 y BT_4 fueron 1:100 y 1:200.000, respectivamente).

- Igualar el V_f en todos los tubos con tampón D hasta un máximo de 50 μl .

- Añadir 100 μl de anticuerpo anti- T_4 diluido.

- Añadir 100 μl de [^{125}I] T_4 (6.000 cpm/tubo) preparada en tampón C.

- Agitar e incubar durante 12 horas a temperatura ambiente y oscuridad.

- La precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó añadiendo 1,5 ml del reactivo precipitante (ver RIA T_3).

- Agitar durante 20 s y centrifugar durante 40 min a 4.000 rpm (2.000 g) y 14°C .

- Aspiración del sobrenadante con bomba de vacío.
- Contaje de radiactividad en el precipitado.

2.4.6.2. RIA de cortisol.

Para la valoración de cortisol en muestras de plasma se utilizó un kit comercial suministrado por Mallinckrodt con algunas modificaciones para muestras de teleósteos, que consistieron fundamentalmente en la reducción a la mitad del volumen de los reactivos del kit utilizados en el ensayo y en la introducción de un estándar inferior a los proporcionados en la curva estándar del kit, y conseguido por dilución con el estándar cero de la misma.

a) Reactivos.

- [¹²⁵I]Cortisol (< 5 μ Ci de actividad específica) en tampón con PEG.
- Cortisol estándar (0, 15, 40, 100, 200, 600 ng/ml).
- Anticuerpo anti-cortisol. Las reacciones cruzadas del anticuerpo son las siguientes:

<u>Compuesto</u>	<u>Reacción cruzada %</u>
Corticosterona	9,30
Cortisol	100,00
Cortisona	2,22
Dehidroepiandrosterona	<0,02
11-Deoxicorticosterona	0,61
11-Deoxicortisol	3,80
Dexametasona	0,38
Epiandrosterona	<0,04
Estradiol	<0,02
Estriol	<0,02
17 α -Hidroxiprogesterona	1,00
Prednisolona	33,33
Prednisona	1,42
Progesterona	<0,12
Testosterona	<0,14

b) Procedimiento del RIA.

- Pipetear 12,5 μ l de cada uno de los puntos de la curva estándar (se prepara también un estándar inferior de 7,5 ng/ml) y de las muestras.
- Añadir 250 μ l de [¹²⁵I]Cortisol-PEG.
- Añadir 250 μ l del anticuerpo anti-cortisol.
- Agitación e incubación durante 45 min a 37°C.
- Centrifugación durante 10 min (3000 rpm, 4°C).
- Decantación rápida del sobrenadante por inversión, escurriendo totalmente el sobrenadante sobre papel de filtro durante 2-3 min.
- Contaje de radiactividad en el precipitado en un contador γ .
- Los resultados se expresaron en ng/ml.

2.4.7 CUANTIFICACIÓN DE CATECOLAMINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).**a) Principios generales del ensayo.**

La técnica de HPLC utilizada para la determinación de aminas biógenas y sus metabolitos consiste en una cromatografía líquido-líquido de fase reversa y par iónico con *detección electroquímica*.

La cromatografía líquido-líquido de fase reversa implica que, tanto la fase estacionaria como la fase móvil, son líquidas. La fase estacionaria, apolar, está constituida por cadenas hidrocarbonadas de distinta longitud, siendo lo más frecuente octilos, octadecilos y fenilos, ligadas químicamente a la superficie de partículas de sílice que actúan como soporte inerte. La composición de la fase móvil, polar, depende del tipo de aminas y metabolitos que se quieran separar. Así, la fase estacionaria presenta afinidad por la zona no polar de las moléculas en solución, mientras que la fase móvil permite que eluyan antes las sustancias polares que las no polares.

La cromatografía de par iónico implica la presencia en la fase móvil de un ión de carga opuesta (contraión) a la de la muestra iónica problema (catecolaminas en nuestro caso, cargadas positivamente a pH 2-8), por lo general de naturaleza orgánica y de elevado peso molecular, por ejemplo el sulfonato sódico de octano. De este modo, se conseguirá formar un par iónico con la muestra problema, cuya carga se neutralizará y por ello podrá solubilizarse en la fase orgánica. Esto evita tener que emplear una columna especial de intercambio iónico, pudiendo utilizar la separación en columnas C₁₈ de uso común. Además

se consigue aumentar el tiempo de retención de las catecolaminas impidiendo que eluyan en el frente de inyección.

En definitiva, las moléculas tenderán a quedar retenidas más o menos en la fase estacionaria o a pasar a la fase móvil, en tanto sea mayor o menor la fuerza competitiva que las una a la fase estacionaria. Así, resultará mayor o menor la retención que sobre ellas ejerce la columna, por lo que cada sustancia saldrá de la columna más o menos tarde, lo que se conoce como su tiempo de retención (t_R) característico.

La detección electroquímica se basa en la capacidad de los solutos para oxidarse (o reducirse) a su paso por un electrodo al que se le aplica un potencial determinado en función de las características del soluto. Las catecolaminas, gracias a sus grupos hidroxilo, pueden ser oxidadas fácilmente mediante la aplicación de un potencial positivo, pasando a derivados ortoquinonas con liberación de 2 electrones y 2 protones. Los electrones son transferidos a un electrodo y la corriente resultante es directamente proporcional al número de moléculas que están siendo oxidadas (o reducidas). Esta corriente una vez amplificada, es enviada a un registrador que proporciona un cromatograma en el cual se cuantifican los solutos según el área bajo cada pico (Krstulovic, 1982).

La detección coulométrica implica el uso de un electrodo poroso de grafito que permite que el 100% de las moléculas sean oxidadas (o reducidas) frente al 5-15 % que se oxida (o reduce) en una detección amperométrica, aumentando considerablemente la sensibilidad. La corriente producida es directamente proporcional a la concentración según la ley de Faraday (ESA, 1992).

b) Validación del método de HPLC.

Los criterios de validez (Marsden y Joseph, 1986; García de Marina y Del Castillo, 1988) que utilizamos son los siguientes:

- **Linealidad.** La linealidad de una curva de calibración es un factor de sumo interés que determina el intervalo en el que la respuesta del detector es lineal. Para ello, se construirán curvas de calibración inyectando estándares a concentraciones conocidas y expresando los resultados como corriente del detector frente a la cantidad de sustancia inyectada.
- **Paralelismo.** Entre la curva de calibración estándar y una serie de diluciones de una muestra. Este método de validación es utilizado como un índice de la similitud entre la catecolamina endógena (valorada en la muestra problema) y la exógena (utilizada como

estándar). La existencia de paralelismo indica que el factor de dilución utilizado no afecta a la estimación de la concentración final de catecolaminas.

- **Límite de detección.** Se define como la menor cantidad de cada compuesto a determinar que produce una señal que puede ser discriminada del ruido de fondo con una $p < 0,05$.

- **Precisión y reproducibilidad.** Se miden por medio de los coeficientes de variación (desviación típica/media %) intra- e interensayo de las diferentes aminas que constituyen la solución estándar. Dichos coeficientes indican la reproducibilidad del método bajo las condiciones del ensayo utilizadas y deben ser siempre inferiores a la variabilidad encontrada en las muestras biológicas.

c) Condiciones cromatográficas.

- **Columna analítica.** Columna de fase reversa de 12,5 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, cuyo empaquetamiento es de tipo C_{18} constituido por partículas de sílice poroso de 5 μm de diámetro a las que se han unido químicamente grupos octadecilsilíceos.

- **Bomba e inyector.** Bomba isocrática acoplada a un inyector con un puerto de inyección de 20 μl . El flujo se mantuvo constante a 1 ml/minuto y la presión fue alrededor de 1000 psi (70 bares).

- **Detector coulométrico (ESA).** Constituido por una célula de acondicionamiento anterior a una célula analítica con dos electrodos (E1 y E2), considerando el E2 como el electrodo de trabajo. Dada la capacidad de oxidación reversible de las catecolaminas, podemos hacer más selectivo el análisis oxidando primero las catecolaminas al aplicar un potencial positivo en el primer electrodo (en la célula de acondicionamiento), y reduciéndolas en el segundo electrodo (E2) donde se detectarán.

Los potenciales de trabajo escogidos fueron los utilizados por Fernández-Ruiz y cols (1991) y Bonnin y cols (1994) con alguna modificación de los potenciales de oxidación en base a los voltamogramas realizados en nuestro laboratorio, pero que en ningún caso afectaban significativamente el porcentaje de respuesta.

<u>SUSTANCIAS A DETECTAR</u>	<u>POTENCIAL (mV)</u>		<u>SENSIBILIDAD (nA)</u>
	<u>Cél. acondic.</u>	<u>Cél analítica</u>	
		E1 E2	
NA, A, DA; DOPAC	+ 300	+ 100 - 250	50
NA, A, DA; HMPG, DOPAC	+ 350	+ 50 - 250	10

- **Registrador.** Representa el perfil cromatográfico de cada catecolamina según su tiempo de elución. La concentración de cada soluto se ha calculado en base al área bajo su pico de elución.

- **Fase móvil.** Utilizamos dos fases móviles distintas, una para medir catecolaminas (NA, A y DA) y/o sus metabolitos respectivos (HMPG y DOPAC) que llamaremos fase móvil A; y otra para medir fundamentalmente DA y DOPAC, que llamaremos fase móvil B (Fernández-Ruiz y cols, 1991; Bonnin A y cols, 1994). En todos los casos se preparan en agua bidestilada grado HPLC, se filtran (a través de filtros de poliamida de 0,45 μm) y se desgasifican con helio.

FASE MÓVIL A

Ácido cítrico 10 mM
Fosfato disódico 5 mM
EDTA 0,05 mM
Sulfonato de octano 0,12 mM
Metanol 3 %
(pH 3, ajustado con fosfórico)

FASE MÓVIL B

Fosfato monosódico 0,15 M
EDTA 0,1 mM
Sulfonato de octano 0,5 mM
Metanol 6 %
(pH 3,8)

d) Preparación de las soluciones estándares.

Las soluciones estándares de catecolaminas se preparan en una solución de ácido perclórico 0,2 N con bisulfito sódico 0,4 mM (antioxidante) y EDTA 0,4 mM.

- Se pesan 5 mg de cada catecolamina, sus metabolitos y del estándar interno (DHBA) disolviéndolas en 10 ml. La concentración de esta solución madre será de 0,5 mg/ml, que se mantendrá a -25 ó -80°C durante dos meses como máximo.

- A partir de la solución madre, por dilución con la solución de perclórico, se prepara la solución de trabajo a una concentración de 500 ng/ml que dura 15 días a 4°C.

- Partiendo de la solución de trabajo, por dilución con solución de perclórico, obteníamos cada dos o tres días una solución estándar de NA, A, DHBA y DA (en algunos casos también de sus metabolitos HMPG y DOPAC) a 25 ng/ml que se inyectaba directamente en el sistema de HPLC (cuando trabajamos a una sensibilidad de 10 nA la concentración final fue de 12,5 ng/ml).

e) Preparación de las muestras.

- Añadir 120 μ l de una solución de ácido perclórico de la misma composición que la utilizada para la preparación de la solución estándar con 25 ng/ml (12,5 ng/ml si la sensibilidad fue de 10 nA) de DHBA, que se utilizará como estándar interno.

- Sonicar en frío (3 pulsos de 5 segundos a una potencia de 70%, 50 W, con descansos de 20 segundos).

- Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto.

- Filtrar el sobrenadante con filtros de difluoruro de polivinilideno de 0,45 μ m.

- Inyectar en el sistema de HPLC.

- Reconstituir el precipitado en 120 μ l de agua.

f) Cálculo de los resultados.

Previamente a la inyección de muestras, se procede a la calibración del sistema (1-2 veces diariamente) inyectando la solución estándar compuesta por concentraciones conocidas de las aminas que van a ser medidas, así como de una amina no fisiológica que se utiliza como patrón interno. Con la calibración se pretende determinar:

- los tiempos de retención para cada amina (t_R).

- las diferencias en la respuesta de cada amina respecto al estándar interno, obteniendo un factor de respuesta (f_R) para poder hacer las correcciones oportunas si se llegan a producir pérdidas de las catecolaminas durante el procesado y almacenado de las muestras.

El cálculo de la concentración de catecolaminas se realizó en relación al área del estándar interno con la siguiente expresión:

$$ng \text{ (amina)/ml} = \frac{\text{área muestra} \times f_R}{\text{área DHBA}} \times \text{concentración DHBA}$$

Los valores así obtenidos corresponden a las soluciones inyectadas en el HPLC, para obtener las concentraciones finales de catecolaminas en los tejidos habrá que tener en cuenta el volumen de sonicación, el peso del tejido y su concentración de proteínas. Finalmente, los datos fueron procesados estadísticamente como pg o ng de catecolaminas por hipotálamo, gramo de tejido y mg de proteínas, no existiendo, en general, diferencias significativas, de manera que a la hora de representar los datos, lo haremos únicamente por hipotálamo.

2.5. Diseños experimentales.

2.5.1 CONDICIONES DE MANTENIMIENTO.

Las condiciones generales de mantenimiento en el laboratorio fueron expuestas en el apartado 1.3.. Brevemente las recordaremos a continuación añadiendo las condiciones específicas utilizadas en cada experimento:

a) Fotoperíodo.

El fotoperíodo fue natural en la mayoría de los diseños experimentales, e indicaremos el mes en que se realizó el estudio. En determinados experimentos, para especificar un fotoperíodo concreto, indicamos en primer lugar la duración de la fase luminosa en horas seguido de la letra L, y a continuación la fase oscura seguida de la letra D, separadas por dos puntos. Ejemplo 12L:12D.

b) Temperatura del agua.

La temperatura del agua se mantuvo a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ con el fin de evitar el efecto depresor de la temperatura baja sobre la actividad alimentaria.

c) Alimentación.

La comida (1% del peso corporal) se administraba diariamente entre las 10:00-11:00 h. Cuando estudiamos la regulación de la ingestión de alimento por neuropéptidos, en función de si éstos eran conocidos como inhibidores o estimuladores del apetito establecimos las siguientes condiciones desde el punto de vista del estado alimentario:

- Los animales que iban a ser tratados con CRF no recibían alimento el día anterior (48 h de ayuno), de modo que en el momento del experimento se puede considerar que los peces se encuentran en un estado que denominaremos "ingesta estimulada por ayuno".
- Cuando los animales eran tratados con β -endorfina o galanina, recibían la ración diaria de alimento 1 h antes de ser inyectados, y por tanto consideramos que los peces están "saciados" en el momento del experimento.

Para realizar los tests de ingesta los peces se distribuían individualmente en cubetas de 5 l (carpas doradas) ó 15 l (tencas) en función del peso de los animales y con el objeto de obtener grupos experimentales homogéneos.

2.5.2 CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN ALIMENTARIO EN *T. tinca*.

Debido a que las tencas son peces muy asustadizos y fácilmente estresables, y dada la ausencia de datos relacionados con esta especie, inicialmente intentamos averiguar las condiciones óptimas de mantenimiento en el laboratorio, el patrón alimentario, así como ciertos parámetros metabólicos y hormonales relacionados con la actividad alimentaria. Se utilizaron individuos adultos de *T. tinca* ($30,7 \pm 8,1$ g de peso corporal) de ambos sexos que fueron aclimatados en el laboratorio durante un mes como mínimo a las condiciones de fotoperíodo 12L:12D (luz de 4:00 a 16:00 h).

Se estudiaron los siguientes aspectos:

2.5.2.1. Determinación del patrón alimentario.

a) Optimización del test de ingesta.

A fin de averiguar el período de máxima ingestión, las tencas ($n=8$) se dividieron en cubetas individuales de 15 l, recibieron la ración diaria de comida y se valoró la ingestión de alimento a las 2, 4, 8 y 12 h.

b) Diferencias día-noche en la actividad alimentaria.

Los animales fueron divididos inicialmente en dos grupos ($n=6$ /grupo): uno de ellos recibía la comida a las 8:00 h y se valoró la ingesta a las 8 h durante la fase luminosa. Para valorar la ingesta durante la fase oscura los animales recibieron la comida a las 16:00 h y se evaluó la ingesta a las 8 h.

c) Efecto del anestésico y/o la inyección ICV sobre la ingestión de alimento.

Se establecieron tres grupos ($n=6$ /grupo): un grupo control (no era sometido a ningún tratamiento), un grupo que era anestesiado con MS-222 (1/10.000), y un último grupo que era anestesiado e inyectado ICV con 1 μ l de solución salina. Los peces de cada grupo se disponían en cubetas individuales y se determinaba la ingesta a las 8 h.

2.5.2.2. Determinación de parámetros metabólicos y hormonales.

a) Correlación con la ingesta a distintos tiempos.

Con el propósito de averiguar si una distinta cantidad de ingesta diaria y el tiempo que transcurre desde la alimentación determinan modificaciones metabólicas y/u hormonales, los animales se repartieron en tres grupos ($n=8-13$ /grupo): un grupo que no recibía comida

el día del sacrificio, se mantenía en "condiciones basales" (CB) y se podía considerar que correspondía a 24 h de ayuno; un grupo que se sacrificaba a las 4 h (4h) de recibir su ración diaria de comida, y un tercer grupo que era sacrificado a las 8 h (8h) de suministrarle la comida. Se recogió la sangre para la determinación de glucosa, y hormonas tiroideas en plasma, y el hígado para cuantificar el glucógeno hepático.

b) Ciclos diarios de actividad NAT, cortisol, glucosa, glucógeno y catecolaminas.

Para este estudio se utilizaron tencas con un peso corporal de $6,2 \pm 1,4$ g, manteniéndose en el laboratorio en condiciones naturales de fotoperíodo (15L:9D, luz de 6:30 a 21:30 h) y temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) en Abril-Mayo. Los acuarios en que se mantenían las tencas habían sido forrados por los laterales con cartulina oscura para evitar el estrés originado por la presencia humana durante las tareas de alimentación y limpieza.

Los puntos seleccionados para la toma de muestras fueron distribuidos cada cuatro horas tanto durante la fase luminosa como durante la fase de oscuridad del fotociclo, comenzando a las 10:00 h. En todos los puntos ($n=9/\text{punto}$) se recogieron muestras de sangre, hipotálamo, hígado y copas ópticas. Posteriormente se cuantificaron la actividad serotonina N-acetiltransferasa (NAT) en la retina neural, el cortisol y la glucosa plasmáticos, el glucógeno hepático y las catecolaminas hipotalámicas. La actividad NAT se evaluó como un parámetro "control" cuya ritmicidad diaria es bien conocida en todos los vertebrados estudiados, siendo el fotoperíodo el factor que determina dicha ritmicidad.

c) Efecto del ayuno.

Una vez probada la existencia de cambios metabólicos y hormonales en función del grado de ingesta, consideramos interesante conocer los cambios que se podían producir tras un período de ayuno que fijamos en 1 semana. Se utilizaron tencas ($n=9-10/\text{grupo}$) en iguales condiciones generales que en el experimento anterior y establecimos los siguientes grupos:

- Grupo control (AL): los animales recibieron alimento (1% peso corporal) diariamente durante 1 semana.
- Grupo ayuno (AY): los animales fueron sometidos a 7 días de ayuno.
- Grupo ayuno + realimentación (AY+R): tras los 7 días de ayuno los animales recibieron alimento (1%) durante dos días para determinar el efecto de la realimentación.

Todos los animales se sacrificaron a las 14:00 h y se recogieron muestras de sangre, hipotálamo, mandíbula inferior e hígado. Posteriormente se cuantificó la glucosa en plasma, hormonas tiroideas en plasma y tejido tiroideo, glucógeno hepático y catecolaminas hipotálamicas.

El comportamiento fácilmente estresable de las tencas, que dificulta enormemente su adaptación a las condiciones de cautividad en el laboratorio, junto al patrón alimentario de esta especie que requiere un tiempo de varias horas desde que se les ofrece el alimento hasta alcanzar la ingesta máxima, nos llevó a utilizar otro modelo animal más adecuado para los análisis de la regulación de la ingestión de alimento por neuropéptidos. El teleósteo elegido fue la carpa dorada (*C. auratus*), en base a la facilidad de obtención y mantenimiento en el laboratorio, así como a su rápida capacidad de adaptación a las condiciones experimentales.

2.5.3 REGULACIÓN DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO POR EL CRF.

2.5.3.1. Optimización del test de ingesta en *Carassius auratus*. Efecto del anestésico y/o la inyección ICV sobre la ingesta..

Antes de iniciar los estudios propiamente relacionados con los efectos del CRF y otros neuropéptidos sobre la ingesta, se llevaron a cabo unos experimentos preliminares, similares a los expuestos para *T. tinca* (ver apartado 2.5.1.1.), con la intención de conocer el intervalo de máxima ingestión y el posible efecto de la anestesia o las inyecciones ICV sobre la ingesta en *C. auratus*.

En primer lugar, carpas doradas de $7,08 \pm 1,15$ g de peso corporal (n=9) se dividieron en cubetas individuales de 5 l, recibieron la ración diaria de alimento y se valoró la ingesta al cabo de 1, 2 y 8 h.

En un segundo experimento los peces se dividieron en tres grupos (n=7/grupo): un grupo control, un grupo anestesiado con MS-222 (1/10.000) y un grupo anestesiado e inyectado ICV con 1 μ l de solución salina. A las 2 h se determinó la ingestión de alimento.

2.5.3.2. Administración de CRF.

a) Administración ICV: curva dosis-respuesta.

Se inyectaron ICV a ejemplares de *C. auratus* ($6,86 \pm 1,17$ g) con 1 μ l de solución salina sola (n=18) o conteniendo CRF a las dosis de 0,1 (n=9); 0,33 (n=9); 1 (n=18); 2

(n=9) y $3,33$ (n=9) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se evaluó la ingesta a las 2 y a las 8 h después del tratamiento. (Octubre).

Posteriormente se probó la dosis de $2 \mu\text{g}$ para averiguar si era eficaz 1 h después del tratamiento. Se utilizaron peces de $4,54 \pm 1,22$ g (n=8/grupo). (Octubre).

b) Administración IP.

Carpas doradas de $7,62 \pm 1,2$ g (n=9/grupo) fueron inyectadas IP con solución salina o CRF ($0,1 \mu\text{g}/\text{g}$ peso corporal), y la ingestión de alimento se valoró a los mismos intervalos de tiempo (0-2, 2-8 y 0-8 h) que en el experimento anterior (ICV). (Noviembre).

2.5.3.3. Interacción CRF-alimentación-hormonas tiroideas.

a) Efecto del CRF sobre la ingesta, glucosa y hormonas tiroideas en *C. auratus* y *T. tinca*.

Para este estudio los peces fueron mantenidos en el laboratorio en Marzo con un fotoperíodo 12L:12D (luz a las 4:00 h). Las **carpas** ($12,29 \pm 2,95$ g) se dividieron en los siguientes grupos (n=8/grupo):

- Grupo control (salino + alimentación): inyectado ICV con $1 \mu\text{l}$ de solución salina.
- Grupo CRF (CRF + alimentación): inyectado ICV con $2 \mu\text{g}$ de CRF.

Una vez inyectados recibieron la ración diaria de comida y a las 2 h se cuantificó la ingesta, sacrificándose los animales 6 h más tarde para la extracción de muestras de sangre y mandíbula inferior. Posteriormente se determinaron la glucosa plasmática y hormonas tiroideas en tejido tiroideo.

En el caso de las **tencas**, 48 individuos se dividieron también en dos grupos, pero debido a su pequeño tamaño (tencas del primer verano de $1,39 \pm 0,48$ g) fue necesario agruparlos de 4 en 4, quedando n=6/grupo.

- Grupo control (salino + alimentación): inyectado ICV con $1 \mu\text{l}$ de solución salina.
- Grupo CRF (CRF + alimentación): inyectado ICV con $1 \mu\text{g}$ de CRF.

A las 8 h se determinó la ingesta y se recogieron las mismas muestras que en el caso de las carpas, cuantificando también la glucosa plasmática y las hormonas tiroideas en tejido tiroideo.

b) Efectos del CRF y la alimentación por separado sobre las hormonas tiroideas y glucosa plasmática en *C. auratus*.

El objetivo de este estudio fue discernir si los efectos del CRF sobre las HT y glucosa encontrados en el experimento anterior eran debidos al propio CRF o secundarios a la reducción de ingesta que provoca el neuropéptido. Utilizamos carpas ($10,38 \pm 2,77$ g) que dividimos en tres grupos ($n=11$ /grupo):

- Grupo control (salino + ayuno): los animales eran inyectados ICV con solución salina ($1 \mu\text{l}$) y no recibieron comida tras las inyecciones.
- Grupo CRF (CRF + ayuno): se administró CRF ICV ($2 \mu\text{g}$), tras lo cual los peces no recibieron comida.
- Grupo alimentado (salino + alimentación): los animales eran inyectados ICV con con solución salina ($1 \mu\text{l}$) tras lo cual recibieron la comida.

A las 8 h se sacrificaron las carpas, recogiendo muestras de sangre donde valorar glucosa y hormonas tiroideas, el hipotálamo para cuantificar su contenido en catecolaminas y la mandíbula inferior con el fin de determinar las HT en tejido tiroideo. (Diciembre).

2.5.3.4. Efecto del ayuno sobre las catecolaminas en hipotálamo.

Una vez probada la existencia de modificaciones de las catecolaminas hipotalámicas por exposición a un corto período de ayuno (2 días), consideramos interesante conocer los cambios que se podían producir tras un período de ayuno más largo que fijamos en una semana. Se utilizaron carpas doradas de $6,55 \pm 1,35$ g ($n=11$ /grupo) en Febrero, y establecimos los siguientes grupos:

- Grupo control (AL): los animales recibieron alimento (1% peso corporal) diariamente durante 1 semana.
- Grupo ayuno (AY): los animales fueron sometidos a 7 días de ayuno.
- Grupo ayuno + realimentación (AY+R): tras los 7 días de ayuno los animales recibieron alimento (1%) un día para determinar el efecto de la realimentación.

Todos los animales se sacrificaron a las 14:00 h y se extrajeron los hipotálamos para posteriormente cuantificar el contenido de catecolaminas hipotalámicas.

2.5.3.5. Efecto del antagonista específico del CRF, α -Helical CRF_[9-41].

A fin de averiguar si el efecto del CRF sobre la ingesta es específico del neuropéptido, administramos el antagonista de forma aislada o en combinación con el CRF.

Utilizamos ejemplares de *C. auratus* ($7,07 \pm 1,66$ g) que dividimos en 4 grupos ($n=9$ /grupo) y recibieron dos inyecciones ICV consecutivas:

	<u>CONTROL</u>	<u>CRF</u>	<u>α-H CRF_[9-41]</u>	<u>CRF + α-H CRF_[9-41]</u>
1ª inyección	s. salina	s. salina	s. salina	α -CRF
2ª inyección	s. salina	CRF	α -CRF	CRF

La ingestión de alimento se determinó a las 2 h una vez finalizadas las inyecciones, y se sacrificaron los animales para obtener muestras de sangre e hipotálamo, cuantificando posteriormente glucosa y cortisol plasmáticos y catecolaminas hipotalámicas. (Marzo).

2.5.3.6. Cortisol como mediador del efecto del CRF sobre la ingesta.

El propósito de este estudio fue averiguar si el aumento en los niveles de cortisol, consecuente al tratamiento con CRF, estaba implicado en la reducción del apetito inducida por dicho neuropéptido. Para probar esta hipótesis planteamos los siguientes experimentos:

a) Inhibición de la síntesis de corticosteroides.

Los animales ($8,79 \pm 1,66$ g), $n=10$ /grupo, eran inyectados IP con solución salina o metirapona, un inhibidor de la síntesis de corticosteroides que actúa sobre la 11 β -hidroxilasa, inhibiendo el paso de 11-deoxicortisol a cortisol. A las 2,5 h los peces fueron inyectados ICV con solución salina o CRF. A las 2 h de esta segunda inyección se valoró la ingesta y se recogió la sangre que se utilizó para determinar los niveles de cortisol plasmáticos. (Enero).

	<u>CONTROL</u>	<u>METIRAPONA</u>	<u>CRF</u>	<u>MET + CRF</u>
1ª inyección IP	s. salina	met	s. salina	met
2ª inyección ICV	s. salina	s. salina	CRF	CRF

b) Correlación entre niveles de cortisol e ingesta.

Debido a que el tratamiento con metirapona no resultó satisfactorio, se realizaron dos experimentos que pudieran indicar, aunque de forma indirecta, si el cortisol estaba implicado en la reducción de la ingesta por el CRF:

- Se inyectaron las carpas ($6,78 \pm 1,18$ g) IP con solución salina o CRF ($n=9$ /grupo) y a las 2h se valoraba la ingesta y se extraían muestras de sangre para evaluar posteriormente

los niveles de cortisol en plasma, y determinar la existencia de una posible correlación entre ambos parámetros (ingesta y cortisol), al igual que sucedía en el tratamiento ICV. (Marzo).

- Carpas de $4,96 \pm 0,47$ g recibieron inyecciones IP de solución salina o cortisol ($n=9/\text{grupo}$), determinando a las 2 h la ingesta y recogiendo muestras de sangre para evaluar el cortisol plasmático. (Septiembre).

2.5.3.7. Control catecolaminérgico del efecto del CRF sobre la ingesta.

Con el propósito de determinar si la regulación que ejerce el CRF sobre la alimentación está mediada por receptores α -adrenérgicos y/o dopaminérgicos se realizaron los siguientes experimentos:

a) Control α -adrenérgico.

Se utilizaron ejemplares de *C. auratus* ($5,43 \pm 1,2$ g) que se dividieron en 8 grupos ($n=9/\text{grupo}$) y que fueron inyectados ICV con agonistas y antagonistas de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 y α_2 con el siguiente esquema:

	<u>CONTROL</u>	<u>AGO α_1</u>	<u>AGO α_2</u>	<u>ANT α_1</u>	<u>ANT α_2</u>	<u>CRF</u>	<u>ANT α_1+CRF</u>	<u>ANT α_2+CRF</u>
1 ^a inyec.	ss	ss	ss	ss	ss	ss	ant α_1	ant α_2
2 ^a inyec.	ss	ago α_1	ago α_2	ant α_1	ant α_2	CRF	CRF	CRF

Los fármacos utilizados fueron: fenilefrina (agonista α_1), prazosín (antagonista α_1), clonidina (agonista α_2) y yohimbina (antagonista α_2).

A las 2 h se valoró la ingesta y se extrajeron los hipotálamos para la cuantificación posterior de catecolaminas. (Octubre).

b) Control dopaminérgico.

Carpas de $5,58 \pm 1,86$ g se dividieron en 8 grupos ($n=9/\text{grupo}$) y se siguió el mismo esquema que en el experimento anterior, valorando la ingesta a las 2 h y las catecolaminas hipotalámicas. (Julio).

	<u>CONTROL</u>	<u>AGO D1</u>	<u>AGO D2</u>	<u>ANT D1</u>	<u>ANT D2</u>	<u>CRF</u>	<u>ANT D1+CRF</u>	<u>ANT D2+CRF</u>
1 ^a inyec.	ss	ss	ss	ss	ss	ss	ant D1	ant D2
2 ^a inyec.	ss	ago D1	ago D2	ant D1	ant D2	CRF	CRF	CRF

Los fármacos utilizados fueron: SKF 38393 (agonista D_1), SCH 23390 (antagonista D_1), quinpirol (agonista D_2) y sulpirida (antagonista D_2).

2.5.4 REGULACIÓN DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO POR β -ENDORFINA.

2.5.4.1. Administración de β -Endorfina.

a) Administración ICV: curva dosis-respuesta.

Se inyectaron ICV ejemplares de *C. auratus* ($6,34 \pm 1,99$ g) con 1 μ l de solución salina sola ($n=18$) o conteniendo β -endorfina a las dosis de 0,001 ($n=9$); 0,1 ($n=9$) y 1 ($n=10$) μ g/ μ l. Se evaluó la ingesta a las 2 y 8 h después de las inyecciones. (Junio).

Posteriormente se probó la dosis de 1 μ g para averiguar si era eficaz 1 h después del tratamiento. Se utilizaron peces de $5,54 \pm 1,33$ g ($n=8$ /grupo). (Marzo).

b) Administración IP.

Carpas doradas de $10,72 \pm 3,79$ g ($n=11$ /grupo) fueron inyectadas IP con solución salina o β -E (0,1 μ g/g peso corporal), y la ingestión de alimento se valoró a los mismos intervalos de tiempo (0-2, 2-8 y 0-8 h) que en el experimento anterior (ICV). (Junio).

2.5.4.2. Efecto de la β -Endorfina sobre la ingesta, glucosa, hormonas tiroideas y catecolaminas hipotalámicas.

Utilizamos animales con un peso corporal de $10,56 \pm 1,09$ g que fueron inyectados ICV con solución salina o β -E (1 μ g), $n=11$ /grupo. Se valoró la ingesta a las 2 h y se obtuvieron muestras de sangre para la determinación de la glucosa en plasma; el hipotálamo se extrajo para cuantificar el contenido de catecolaminas y la mandíbula inferior se conservó con el fin de evaluar las hormonas tiroideas en tejido tiroideo. (Diciembre).

2.5.4.3. Control por los distintos receptores opioidérgicos.

A fin de averiguar a través de que tipo de receptor opioidérgico se mediaba el efecto de la β -E sobre el apetito en *C. auratus* realizamos los siguientes experimentos, utilizando agonistas y antagonistas generales (naloxona) y específicos de cada uno de los subtipos de receptores opioidérgicos

a) Efecto del antagonista general naloxona.

Utilizamos ejemplares de *C. auratus* ($8,62 \pm 1,88$ g) que dividimos en 4 grupos ($n=10$ /grupo). Los animales recibieron dos inyecciones ICV consecutivas según el siguiente esquema, valorándose la ingestión de alimento a las 2 h. (Noviembre).

	<u>CONTROL</u>	<u>β-E</u>	<u>NALOXONA</u>	<u>β-E + NALOXONA</u>
1ª inyección	s. salina	s. salina	s. salina	Naloxona
2ª inyección	s. salina	β -E	Naloxona	β -E

b) Control por receptores δ -opioideérgicos.

Carpas de $4,22 \pm 1,45$ g se dividieron en 7 grupos ($n=6-8$ /grupo). Los peces fueron inyectados ICV dos veces consecutivas según el siguiente esquema, y a las 2 h se determinó la ingestión de alimento. (Junio).

	<u>CONTROL</u>	<u>AGO δ</u>	<u>ANTAGO δ_1</u>	<u>ANTAGO δ_2</u>	<u>β-E</u>	<u>ANT $\delta_1 + \beta$-E</u>	<u>ANT $\delta_2 + \beta$-E</u>
1ª inyec.	ss	ss	ss	ss	ss	ant δ_1	ant δ_2
2ª inyec.	ss	ago δ	ant δ_1	ant δ_2	β -E	β -E	β -E

Los fármacos utilizados fueron: DPEN (agonista δ), BNTX (antagonista δ_1) y naltriben (antagonista δ_2).

c) Control por receptores κ -opioideérgicos.

Carpas de $4,82 \pm 1,63$ g se dividieron en 5 grupos ($n=7-8$ /grupo), y el agonista y el antagonista se administraron ICV de forma aislada o en combinación con la β -E según el siguiente esquema. La ingesta se valoró a las 2 h. (Junio).

	<u>CONTROL</u>	<u>AGO κ</u>	<u>ANTAGO κ</u>	<u>β-E</u>	<u>ANTAGO $\kappa + \beta$-E</u>
1ª inyección	ss	ss	ss	ss	ant κ
2ª inyección	ss	ago κ	ant κ	β -E	β -E

Los fármacos utilizados fueron: U-50488 (agonista κ) y *nor*-BNI (antagonista κ).

d) Control por receptores μ -opioidérgicos.

Carpas de $4,22 \pm 1,39$ g se dividieron en 7 grupos ($n=6/\text{grupo}$). Se cuantificó la ingesta a las 2 h del tratamiento, tras recibir dos inyecciones ICV consecutivas siguiendo el siguiente esquema. (Junio).

	<u>CONTROL</u>	<u>AGO μ</u>	<u>ANTAGO μ</u>	<u>ANTAGO $\mu 1$</u>	<u>β-E</u>	<u>ANT $\mu+\beta$-E</u>	<u>ANT $\mu 1+\beta$-E</u>
1ª inyec.	ss	ss	ss	ss	ss	ant μ	ant $\mu 1$
2ª inyec.	ss	ago μ	ant μ	ant $\mu 1$	β -E	β -E	β -E

Los fármacos utilizados fueron: DAMGO (agonista μ), β -FNA (antagonista μ_1) y naloxonazina (antagonista μ_2).

2.5.5 REGULACIÓN DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO POR GALANINA.**2.5.5.1. Administración de galanina.****a) Administración ICV: curva dosis-respuesta.**

Se inyectaron ICV ejemplares de *C. auratus* ($6,20 \pm 1,74$ g) con 1 μ l de solución salina sola ($n=18$) o conteniendo galanina a las dosis de 0,1 ($n=8$); 1 ($n=10$) y 3,33 ($n=9$) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se valoró la ingesta a las 2 y 8 h después del tratamiento. (Junio).

Posteriormente se probó la dosis de 1 μg para averiguar si era eficaz 1 h después del tratamiento. Se utilizaron peces de $5,13 \pm 1,45$ g ($n=8/\text{grupo}$). (Marzo).

b) Administración IP.

Carpas doradas de $10,77 \pm 3,39$ g ($n=11/\text{grupo}$) fueron inyectadas IP con solución salina o Gal (0,1 $\mu\text{g}/\text{g}$ peso corporal), y la ingestión de alimento se valoró a los mismos intervalos de tiempo (0-2, 2-8 y 0-8 h) que en el experimento anterior (ICV). (Junio).

2.5.5.2. Efecto de la galanina sobre la ingesta, glucosa, hormonas tiroideas y catecolaminas.

Utilizamos animales con un peso corporal de $10,76 \pm 1,21$ g que fueron inyectados ICV con solución salina o Gal (1 μg), $n=11/\text{grupo}$. Se valoró la ingesta a las 2 h y se obtuvieron muestras de sangre, el hipotálamo y la mandíbula inferior, con el fin de evaluar glucosa plasmática, catecolaminas hipotalámicas y hormonas tiroideas en tejido tiroideo, respectivamente. (Diciembre).

2.5.5.3. Efecto del antagonista galantida.

A fin de averiguar si el antagonista revertía los efectos de la Gal sobre el apetito, utilizamos ejemplares de *C. auratus* ($5,35 \pm 0,85$ g) que dividimos en 4 grupos ($n=9$ /grupo). Los animales recibieron dos inyecciones ICV consecutivas siguiendo el esquema que a continuación se presenta. (Junio).

	<u>CONTROL</u>	<u>GAL</u>	<u>GALANTIDA</u>	<u>GAL + GALANTIDA</u>
1ª inyección	s. salina	s. salina	s. salina	galantida
2ª inyección	s. salina	galanina	galantida	galanina

A las 2 h se valoró la ingesta y se extrajeron los hipotálamos para cuantificar su contenido en catecolaminas.

2.5.5.4. Control adrenérgico del efecto de la galanina sobre la ingesta.

Con el propósito de intentar determinar si el efecto que produce la Gal sobre la conducta alimentaria está mediado por receptores α -adrenérgicos utilizamos ejemplares de *C. auratus* ($5,26 \pm 1,45$ g) que se dividieron en 8 grupos ($n=8-9$ /grupo) y que fueron inyectados ICV con agonistas y antagonistas adrenérgicos α_1 y α_2 siguiendo el esquema:

	<u>CONTROL</u>	<u>AGO α_1</u>	<u>AGO α_2</u>	<u>ANT α_1</u>	<u>ANT α_2</u>	<u>GAL</u>	<u>ANT α_1+GAL</u>	<u>ANT α_2+GAL</u>
1ª inyec.	ss	ss	ss	ss	ss	ss	ant α_1	ant α_2
2ª inyec.	ss	ago α_1	ago α_2	ant α_1	ant α_2	Gal	Gal	Gal

Los fármacos utilizados fueron: fenilefrina (agonista α_1), prazosín (antagonista α_1), clonidina (agonista α_2) y yohimbina (antagonista α_2).

A las 2 h se valoró la ingesta y se extrajeron los hipotálamos para cuantificar las catecolaminas. (Diciembre).

2.6. Análisis estadístico de los resultados.

El valor de las variables estudiadas se ha expresado mediante un parámetro de centralización (media aritmética, \bar{x}) y otro de dispersión (error estándar de la media, e.e.m.).

2.6.1 ANÁLISIS DE REGRESIÓN Y CORRELACIÓN.

a) Regresión y correlación lineales.

Con la regresión se intenta analizar la dependencia de una variable y sobre una variable independiente x , que viene dada por la función $y = a + bx$; en cambio con la correlación se trata de determinar si dos variables son independientes o varían conjuntamente, es decir, covarían, sin expresar una como función de la otra.

En la presente Memoria se han utilizado ambos tipos de análisis para determinar la recuperación analítica como criterio de validación de los RIAs de hormonas tiorideas y cortisol para muestras de peces, así como para determinar los intervalos de linealidad como criterio de validación del HPLC.

La linealidad puede ser descrita en términos del cuadrado del coeficiente de correlación (r), que es lo que se conoce como coeficiente de determinación (r^2) (Sokal y Rohlf, 1979). Dicho coeficiente indica la proporción de la variación de una variable determinada por la variación de la otra, y tendrá como mínimo el valor cero si ninguna de las variables puede explicarse mediante la otra variable, y como máximo valdrá 1 cuando la variación de una variable viene totalmente determinada por la variación de la otra.

b) Comparación de la pendiente de dos rectas.

En algunas ocasiones resulta necesario probar si las líneas de regresión obtenidas a partir de 2 conjuntos de datos análogos son iguales, para lo cual se comparan las pendientes de ambas rectas, con el fin de averiguar si ambas proceden de la misma población.

Para llevar a cabo dicho análisis se utiliza un ANOVA en el cual se compara, mediante un estadístico F , el cuadrado medio debido a la diferencia entre las distintas pendientes (variación entre regresiones), con el promedio ponderado de las desviaciones respecto de la regresión (variación dentro de las regresiones). Si dicho estadístico es mayor que el valor crítico $F_{\alpha,1,n-2}$, entonces se concluye que las pendientes son estadísticamente diferentes y que los datos proceden de poblaciones distintas (Sokal y Rohlf, 1979).

Este test estadístico ha sido utilizado en la validación de los RIAs de HT y cortisol (paralelismo entre muestras biológicas y curvas estándares del RIA, previa transformación logística-logarítmica para conseguir la linealización de las curvas), y en la validación de las

técnicas de determinación de catecolaminas por HPLC (paralelismo entre muestras biológicas y curvas estándares de catecolaminas).

2.6.2 TEST *t* DE STUDENT.

En los casos en los que se trataba de analizar si las medias muestrales obtenidas a partir de dos únicos tratamientos experimentales procedían de una misma población, se aplicó un test simple como es el de la *t* de Student.

2.6.3 ANÁLISIS DE LA VARIANZA Y TEST DE DUNCAN DE COMPARACIONES MÚLTIPLES.

Cuando el número de medias muestrales a comparar fue superior a dos, pero el criterio de clasificación de las mismas fue único, es decir, cuando existía un único factor o fuente de variación, se utilizó el ANOVA de una vía y en el caso de que éste fuera significativo, se aplicó a continuación el test de Duncan de comparaciones múltiples para determinar los pares de muestras que presentaban diferencias significativas.

En aquellos casos en que existían dos fuentes de variación de igual rango (factores), se aplicó un ANOVA de doble vía con el fin de averiguar la significación de la influencia de los dos factores principales, así como su posible interacción. Dicha interacción es propia de multitud de procesos biológicos (Sokal y Rohlf, 1979), y en general se puede clasificar en dos clases:

- **Sinergia.** Cuando el efecto observado al actuar dos factores conjuntamente es mucho mayor que la suma de los efectos de cada factor por separado.
- **Interferencia.** Cuando el efecto de los dos factores actuando conjuntamente es mucho menor que la suma del efecto de cada factor por separado.

En variables que presentaban una gran dispersión de su varianza, los valores de las variables se transformaron logarítmicamente, con el fin de conseguir la homogeneidad de las varianzas. Posteriormente se comprobó dicha homocedasticidad mediante el test de Bartlett (Sokal y Rohlf, 1979).

Para los análisis de correlación, de varianza y test de Duncan se utilizó el programa estadístico SPSS/PC+.

2.6.4 GRADOS DE SIGNIFICACIÓN.

Los grados de significación que consideramos en la presente Memoria fueron los siguientes:

N.S.	$p > 0,05$
*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
***	$p < 0,005$

IV. RESULTADOS

1. VALIDACIÓN DE LOS RIAs DE HORMONAS TIROIDEAS Y CORTISOL.

1.1. Hormonas tiroideas.

a) Paralelismo.

Se realizó el paralelismo entre diluciones sucesivas o distintos volúmenes de muestras de plasma y extractos tiroideos con las fracciones libre y unida de *C. auratus* y *T. tinca*, y las correspondientes curvas estándares de T_3 y T_4 . Como se observa en las Figs 1 y 2 hay un marcado paralelismo, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,1$; * $p > 0,05$) entre las pendientes de las rectas obtenidas tras la transformación logit-log de los datos (Tabla I).

Tabla I. Comparación de las pendientes de las rectas de las curvas estándares de T_3 y T_4 , y las HT en plasma, fracción libre y unida en *Carassius auratus* y *Tinca tinca*.

	<u>Curva estándar</u>	<u>Plasma</u>	<u>F. libre</u>	<u>F. unida</u>
T_3	$b=-4,616 \pm 0,262$	$b=-4,601 \pm 0,145$	$b=-6,713 \pm 0,586^*$	$b=-4,838 \pm 0,218$
<i>C. auratus</i>				
T_4	$b=-3,678 \pm 0,266$	$b=-2,934 \pm 0,309$	$b=-2,991 \pm 0,202$	$b=-4,868 \pm 0,662$
T_3	$b=-4,720 \pm 0,118$	$b=-4,067 \pm 0,311$	$b=-4,778 \pm 0,309$	$b=-4,266 \pm 0,329$
<i>T. tinca</i>				
T_4	$b=-3,545 \pm 0,260$	$b=-4,986 \pm 0,544^*$	$b=-3,266 \pm 0,167$	$b=-5,031 \pm 0,455^*$

b) Recuperación analítica.

Se añadieron cantidades conocidas de T_3 y T_4 a distintas muestras (extractos de plasma y extractos tiroideos con la fracción libre y unida) de ambas especies de teleósteos, y la cantidad de hormona encontrada se comparó con la cantidad de hormona esperada. Tanto en el caso de *C. auratus* (3,4 y 5)), como en el de *T. tinca* (6, 7 y 8), se observa que existe una correlación significativa entre la cantidad de hormona tiroidea esperada y la estimada

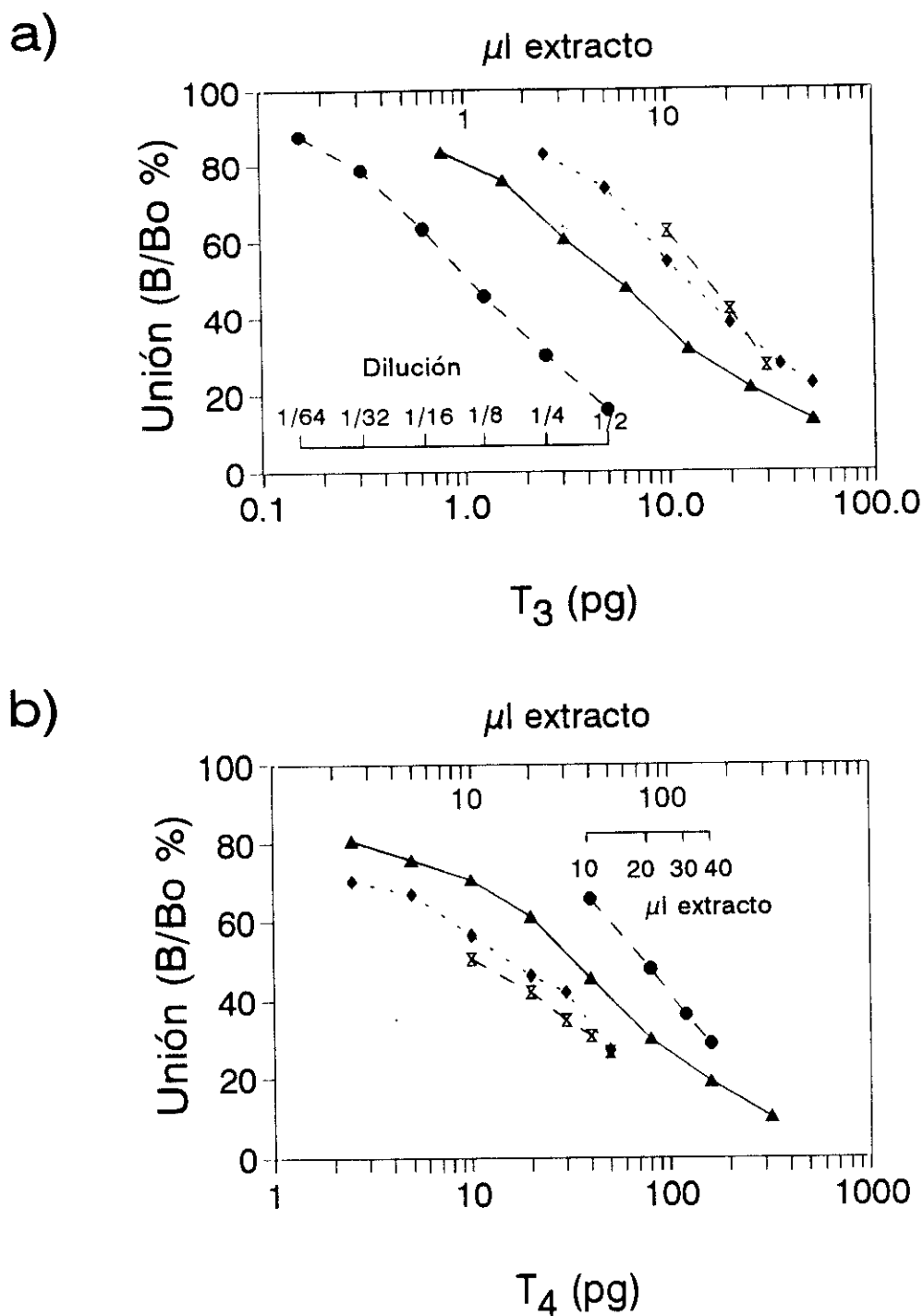
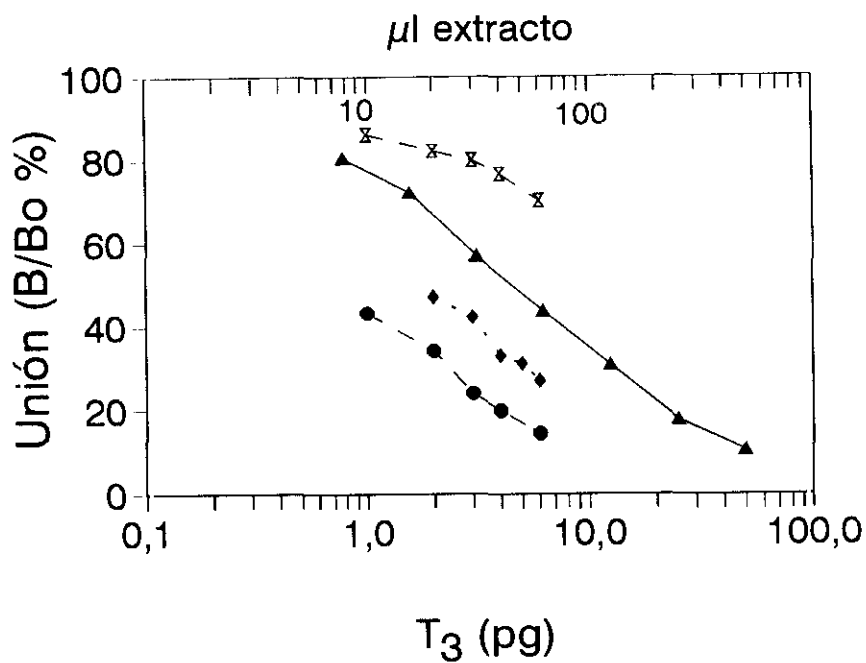
C. auratus

Figura 1. Paralelismo entre las curvas estándares (\blacktriangle — \blacktriangle) de a) T_3 y b) T_4 y diluciones sucesivas o distintos volúmenes de extractos de plasma (\blacklozenge -- \blacklozenge), y extractos tiroideos con las fracciones libre (\bar{X} -- \bar{X}) y unida (\bullet -- \bullet) de *C. auratus*. Los datos se representan como la media de dos determinaciones, e.e.m. < 5% de la \bar{x} .

T. tinca

a)



b)

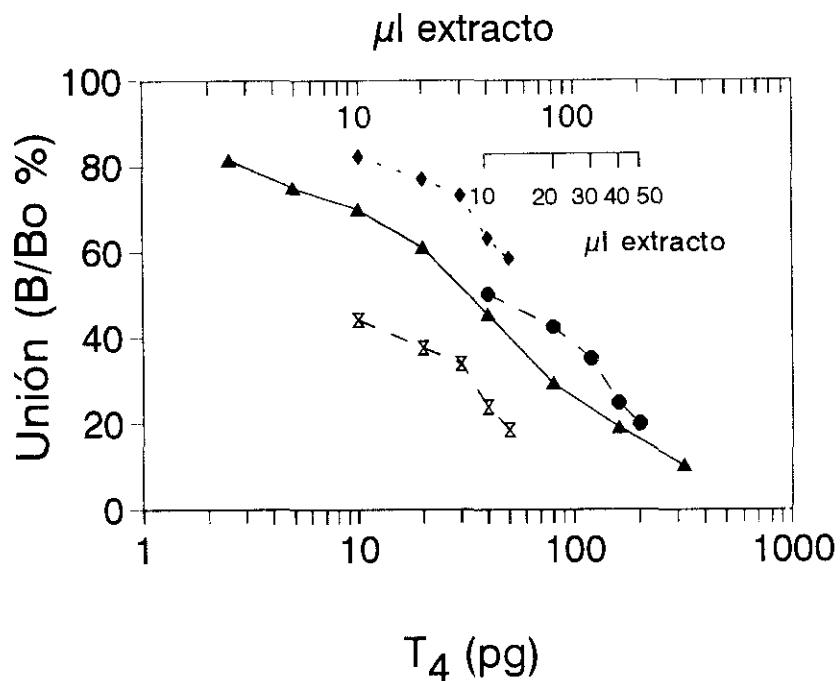
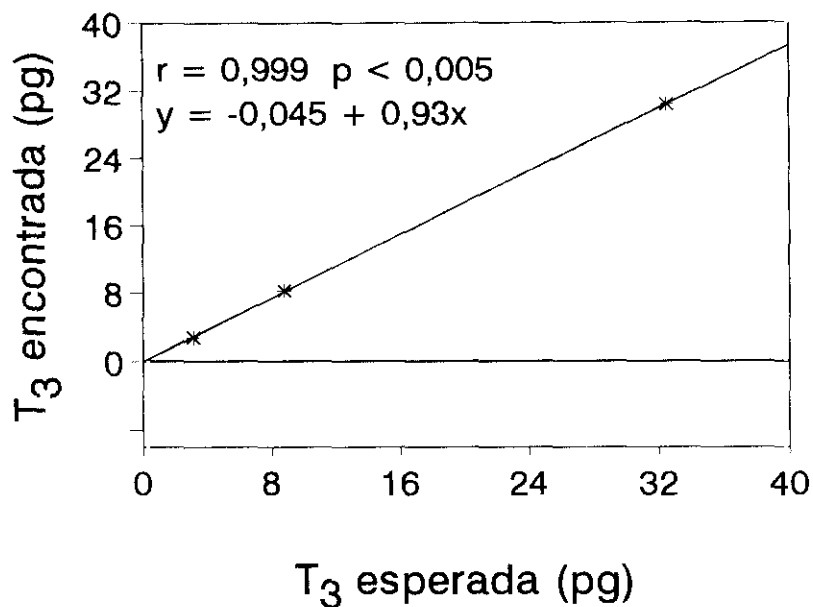


Figura 2. Paralelismo entre las curvas estándares (\blacktriangle — \blacktriangle) de a) T_3 y b) T_4 y diluciones sucesivas o distintos volúmenes extractos de plasma (\blacklozenge — \blacklozenge), y extractos tiroideos con las fracciones libre (\times — \times) y unida (\bullet — \bullet) de *T. tinca*. Los datos se representan como la media de dos determinaciones, e.e.m. < 5% de la \bar{x} .

C. auratus
PLASMA

a)



b)

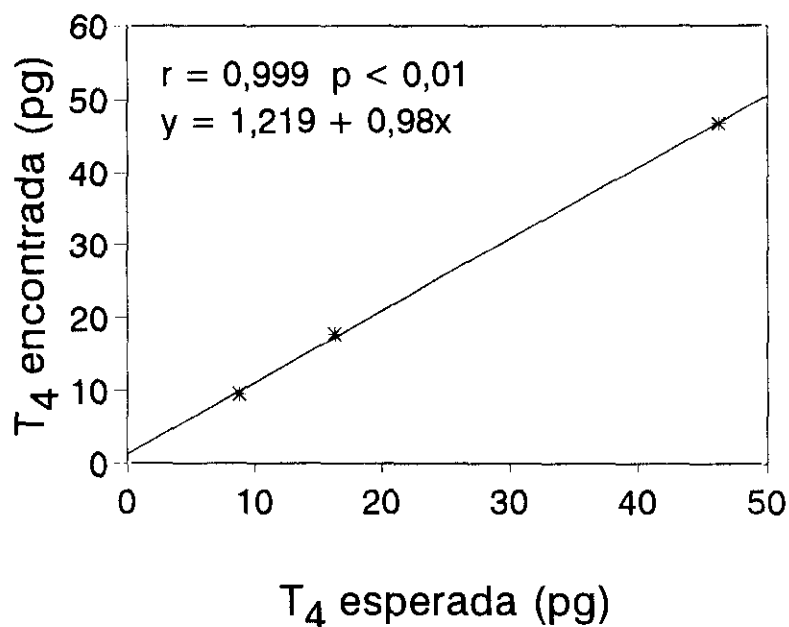
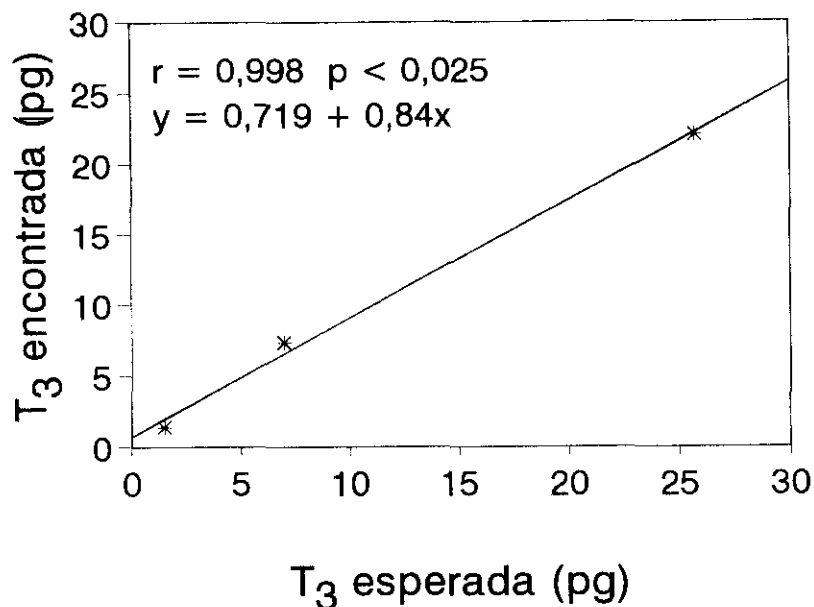


Figura 3. Eficacia analítica de los RIAs de a) T₃ y b) T₄. Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en extractos de plasma de *C. auratus*, a los que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones, e.e.m. < 5% de la \bar{x} .

C. auratus
FRACCION LIBRE

a)



b)

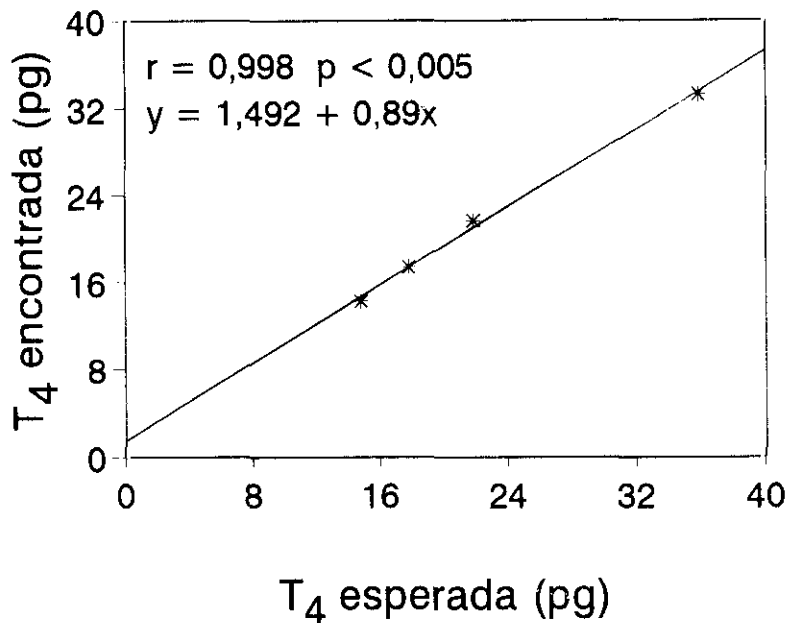
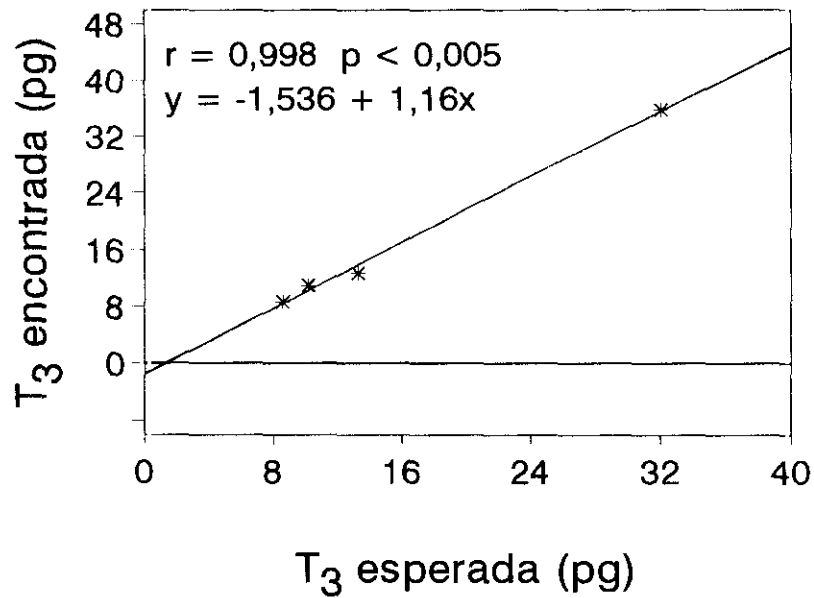


Figura 4. Eficacia analítica de los RIAs de a) T_3 y b) T_4 . Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en extractos tiroideos con fracción libre de *C. auratus*, a los que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones, e.e.m. $< 5\%$ de la \bar{x} .

C. auratus
FRACCION UNIDA

a)



b)

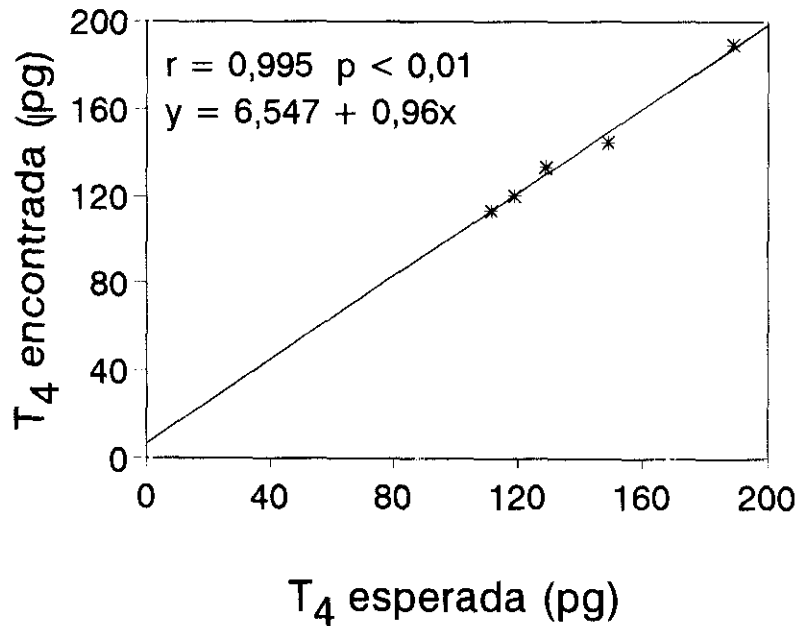
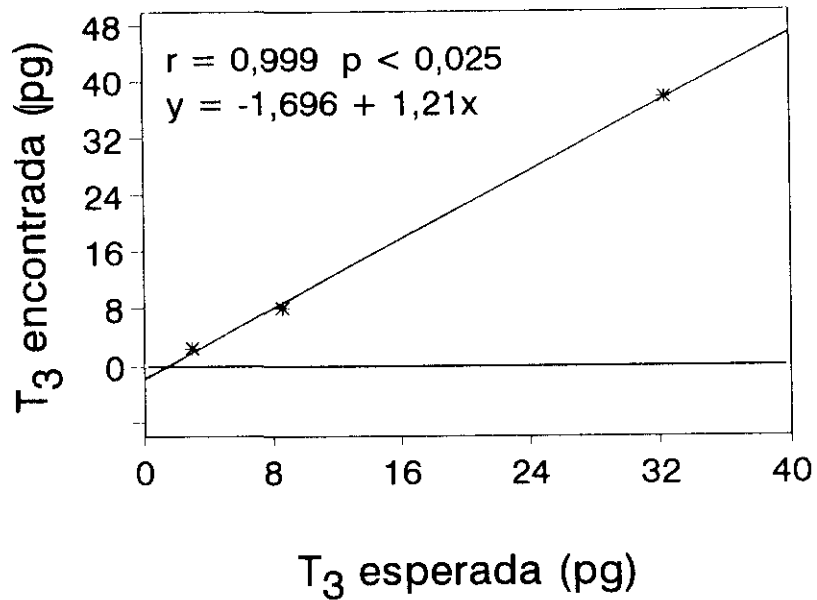


Figura 5. Eficacia analítica de los RIAs de a) T₃ y b) T₄. Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en extractos tiroideos con fracción unida de *C. auratus*, a los que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones, e.e.m. < 5% de la \bar{x} .

T. tinca
PLASMA

a)



b)

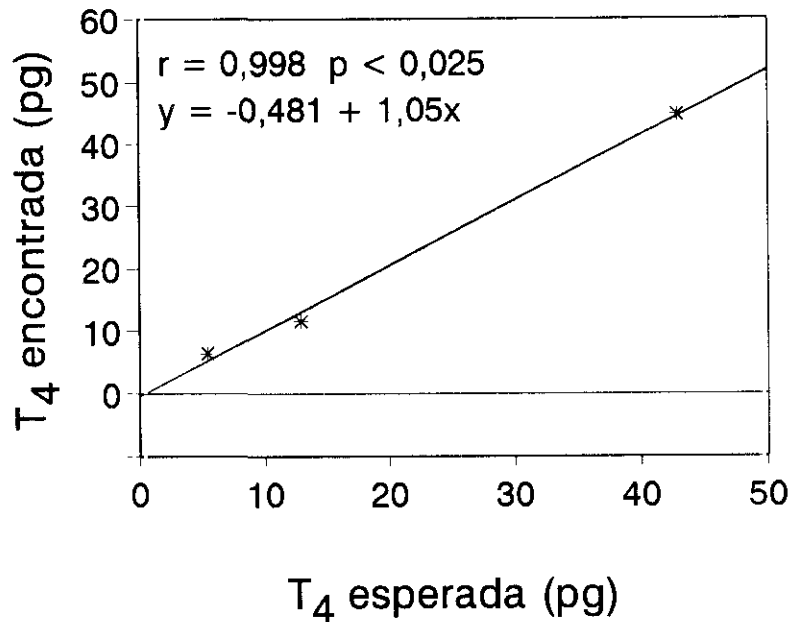
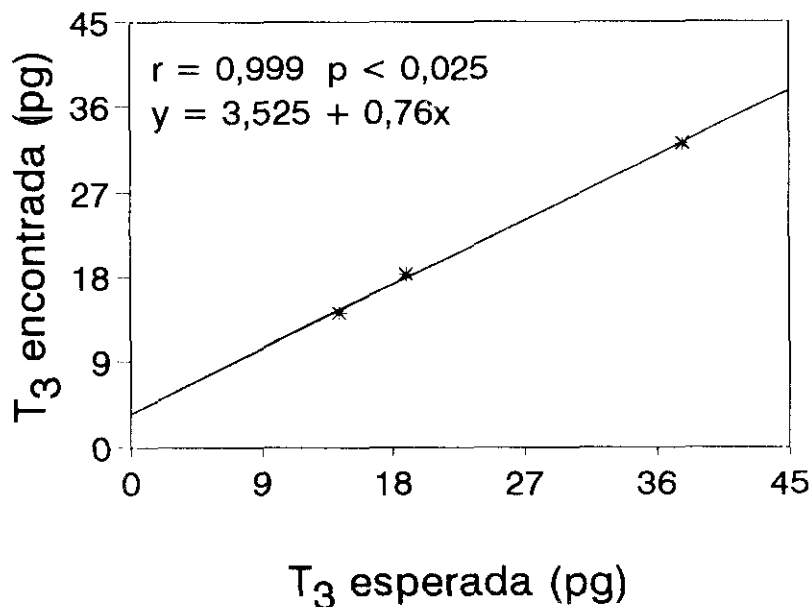


Figura 6. Eficacia analítica de los RIAs de a) T_3 y b) T_4 . Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en extractos de plasma de *T. tinca*, a los que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones, e.e.m. $< 5\%$ de la \bar{x} .

T. tinca
FRACCION LIBRE

a)



b)

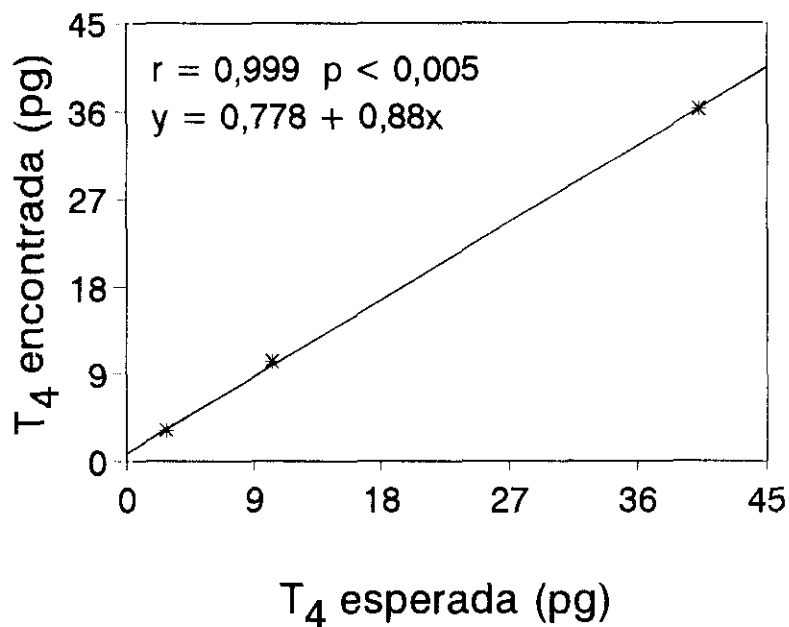
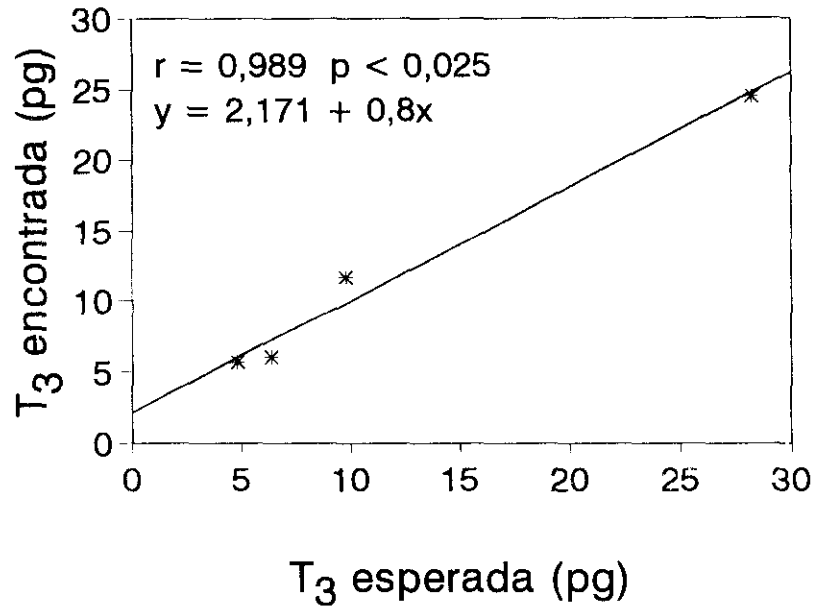


Figura 7. Eficacia analítica de los RIAs de a) T₃ y b) T₄. Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en extractos tiroideos con fracción libre de *T. tinca*, a los que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones, e.e.m. < 5% de la \bar{x} .

T. tinca
FRACCION UNIDA

a)



b)

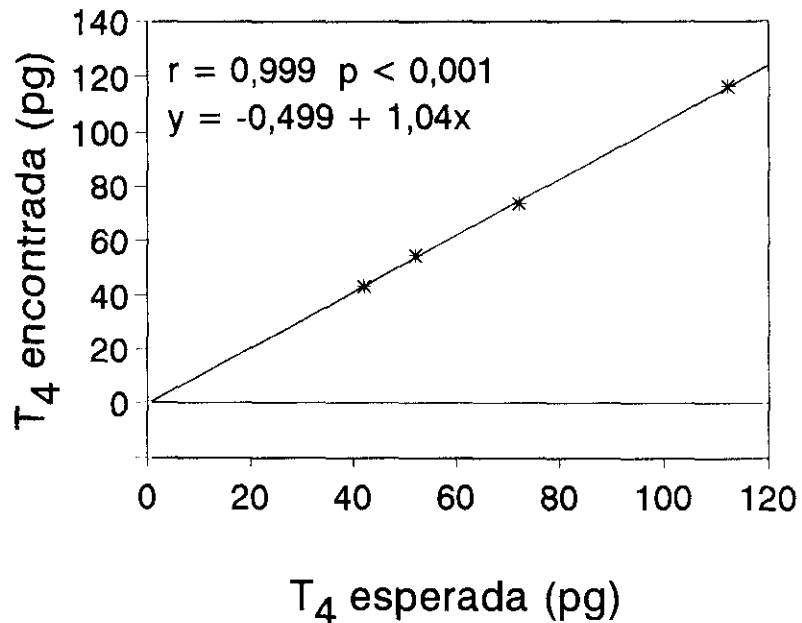


Figura 8. Eficacia analítica de los RIAs de a) T_3 y b) T_4 . Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en extractos tiroideos con fracción unida de *T. tinca*, a los que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones, e.e.m. $< 5\%$ de la \bar{x} .

mediante RIA para ambas especies. Las pendientes de las rectas de regresión son significativamente distintas de 0 y se aproximan a 1 en todos los casos, lo cual indica una relación aproximada de 1 a 1 entre las hormonas esperadas y las estimadas en el ensayo.

Las recuperaciones fueron las siguientes:

	<u>T₃</u>		<u>T₄</u>	
	<u>C. auratus</u>	<u>T. tinca</u>	<u>C. auratus</u>	<u>T. tinca</u>
Plasma	92,01	104,87	106,40	103,90
Fracción libre	94,15	93,06	96,62	99,72
Fracción unida	103,90	105,53	103,23	100,81

c) Sensibilidad.

El límite de detección del RIA fue de 0,74 y 1,2 pg/tubo para la T₃ y la T₄, respectivamente.

d) Precisión y reproducibilidad.

Para el cálculo de la variación intraensayo se utilizaron los coeficientes de variación de la unión específica (%) obtenidos para el Bo y para tres concentraciones distintas de T₃ y T₄ correspondientes al tramo alto, medio y bajo de la curva estándar (estándar 1,56; 6,25 y 25 pg para la T₃ y 10, 40 y 160 pg para la T₄, n=10). Para la variación interensayo se utilizaron también los coeficientes de variación de los mismos puntos estándares procedentes de 10 curvas estándares obtenidas en diferentes días. Los coeficientes de variación CV (%) calculados a partir de la curva estándar se compararon con los CV determinados a partir de muestras cuyo contenido medio de T₃ y T₄ (\bar{x}) pg, n=6-9) fuera similar a las concentraciones estándares seleccionadas (Tabla II).

Se puede observar que el CV incrementa con la concentración de hormona, aunque la desviación típica correspondiente a las distintas concentraciones de T₃ y T₄ se mantiene constante independientemente de la zona de la curva. Esto se debe al perfil sigmoideo de las curvas estándares, de manera que a concentraciones altas de T₃ o T₄ la unión específica es menor, y por lo tanto el CV resultante tiende a aumentar.

Cuando comparamos los CV intra- e interensayo se observa que estos últimos son mayores que los primeros, aproximadamente unas dos veces mayores en la mayoría de los casos. Lógicamente, y como consecuencia de la mayor variabilidad de las muestras biológicas

frente a la variación típica del RIA, los CV correspondientes a las muestras resultaron ser mayores que los obtenidos a partir de la curva estándar. Los RIAs de T_3 y T_4 poseen así, una reproducibilidad aceptable para la determinación de muestras biológicas.

Se puede concluir, por tanto, que los RIAs empleados por nosotros cumplen las condiciones necesarias para ser utilizados en la cuantificación de hormonas tiroideas en plasma y en tejido tiroideo de *C. auratus* y *T. tinca*.

1.2. Cortisol.

a) Paralelismo.

Se realizó el paralelismo entre una curva estándar de cortisol y diluciones sucesivas de muestras de plasma de *C. auratus* y *T. tinca*. En la Fig. 9 podemos observar la existencia de un marcado paralelismo, no encontrándose diferencias significativas entre las pendientes de las rectas obtenidas tras la transformación logit-log de los datos (estándar $b = -5,158 \pm 0,6818$; diluciones de plasma de carpa dorada $b = -4,685 \pm 0,3121$, $p > 0,1$; diluciones de plasma de tenca $b = -3,823 \pm 0,307$, $p > 0,05$).

b) Recuperación analítica.

Se compararon cantidades conocidas de cortisol añadidas a muestras de plasma de ambas especies de teleósteos, con su estimación mediante RIA, valorándose así la recuperación analítica. Como se observa en la Fig. 10, hay una correlación significativa entre la cantidad de cortisol añadida y su estimación mediante RIA para ambas especies (carpa dorada, $r = 0,997$ $p < 0,005$; tenca, $r = 0,998$ $p < 0,025$). La pendiente de las rectas de regresión es 0,86 y 0,77 respectivamente, lo cual indica una relación aproximada de 1 a 1 entre el cortisol añadido y el medido en el ensayo.

La recuperación fue de 98,5 y 95,1 % para *C. auratus* y *T. tinca* respectivamente.

c) Sensibilidad.

El límite de detección del RIA calculado en nuestro laboratorio fue de 3,25 ng/ml.

d) Precisión y reproducibilidad.

Para el cálculo de la variación intraensayo se utilizaron los coeficientes de variación de la unión específica (%) obtenidos para el B_0 y para 4 concentraciones distintas de cortisol correspondientes a los tramos alto, medio y bajo de la curva estándar (20, 40, 100 y 600

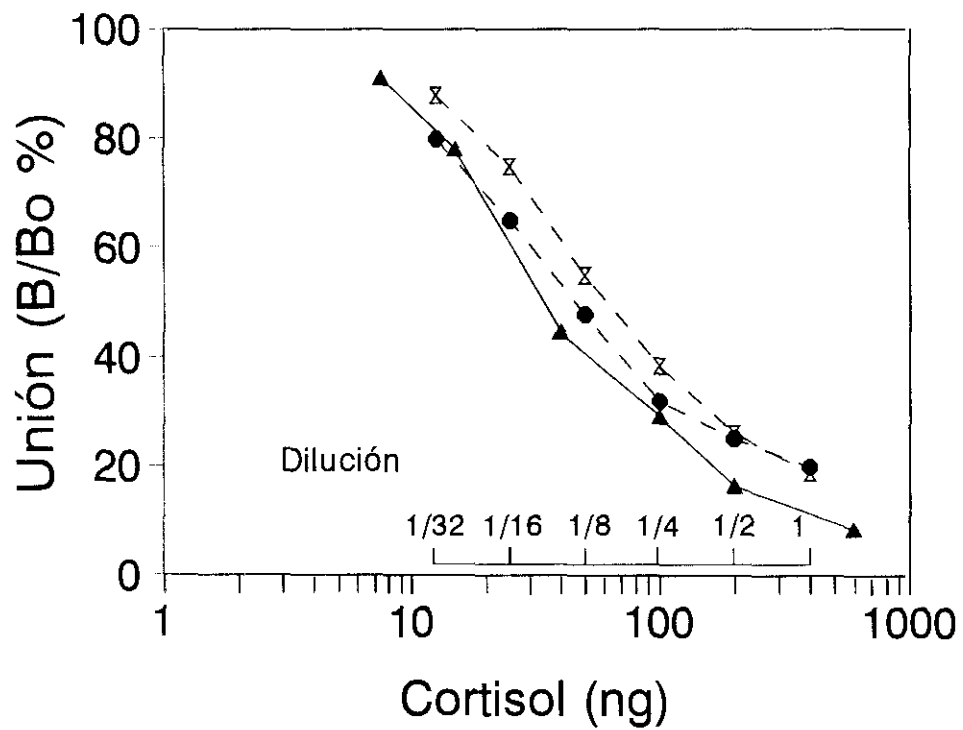


Figura 9. Paralelismo entre la curva estándar de cortisol (▲—▲) y diluciones sucesivas de plasma de *C. auratus* (X--X) y *T. tinca* (●--●). Los datos se representan como la media de dos determinaciones, e.e.m. < 5% de la \bar{x} .

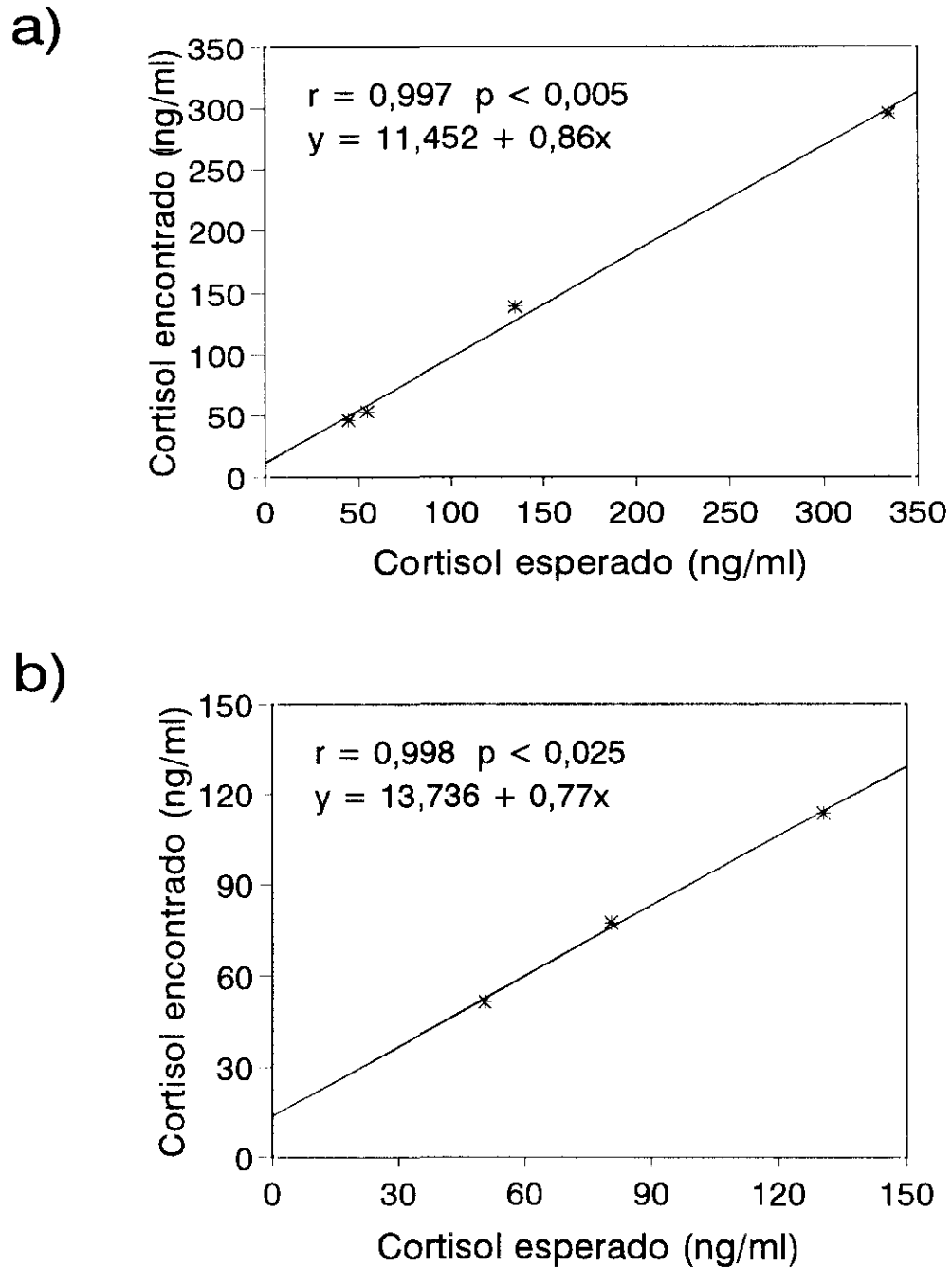


Figura 10. Eficacia analítica del RIA de cortisol. Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en muestras de plasma de a) *C. auratus* y b) *T. tinca*, a las que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones, e.e.m. < 5% de la \bar{x} .

ng/ml, n=10). Para la variación interensayo se utilizaron también los coeficientes de variación de los mismos puntos estándares procedentes de 10 curvas estándares obtenidas en diferentes días.

Los coeficientes de variación CV (%) calculados a partir de la curva estándar se compararon con los CV determinados a partir de muestras cuyo contenido medio de cortisol (\bar{x}) ng/ml, n=9) fuera similar a las concentraciones estándares seleccionadas.

Tabla III. Comparación de los CV intra- e interensayo del RIA de cortisol calculados a partir de la curva estándar y a partir de muestras de plasma de *C. auratus* y *T. tinca*.

CV (%)	Curva estándar		<i>C. auratus</i>		<i>T. tinca</i>	
	INTRA-	INTER-	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}
Bo 0 ng/ml	2,9	5,6	--		--	
20 ng/ml	3,5	7,3	4,9	[29,4]	3,9	[10,3]
40 ng/ml	4,2	7,6	4,4	[47,5]	--	
100 ng/ml	4,5	8,6	5,0	[113,2]	6,4	[83,3]
600 ng/ml	10,2	23,0	--		--	

Se puede observar que el CV incrementa con la concentración de cortisol, aunque la desviación típica correspondiente a las distintas concentraciones de cortisol se mantiene constante independientemente de la zona de la curva. Como sucedía con las HT, debido al perfil sigmoideo de la curva estándar, a concentraciones altas de cortisol la unión específica es menor, y por lo tanto el CV resultante tiende a aumentar.

Cuando comparamos los CV intra- e interensayo se observa que estos últimos suelen ser aproximadamente el doble que los primeros.

Como consecuencia de la mayor variabilidad de las muestras biológicas frente a la variación típica del RIA, los CV correspondientes a las muestras resultaron ser mayores que los obtenidos a partir de la curva estándar. El RIA de cortisol posee, así, una reproducibilidad aceptable para la determinación de muestras biológicas.

Por tanto, concluimos que el RIA directo empleado por nosotros cumple las condiciones necesarias para ser utilizado en la cuantificación de cortisol plasmático de *C. auratus* y *T. tinca*.

2. VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE CATECOLAMINAS POR HPLC.

En la determinación de catecolaminas en esta Memoria hemos utilizado tres condiciones cromatográficas distintas, que las denominaremos como ensayo A (valoración de NA, A y DA a una sensibilidad de 50 nA; Figs 11 y 12), ensayo B (valoración de NA, A, DOPAC y DA a 50 nA; Fig. 13) y ensayo C (valoración de NA, HMPG, A, DOPAC y DA a 10 nA; Fig 14). A continuación pasamos a exponer los datos de los criterios de validez de cada ensayo.

a) Linealidad.

Cantidades conocidas de catecolaminas fueron correlacionadas linealmente (ver r^2) con la respuesta del detector, que viene dada como corriente en nA o como % de respuesta, obtenida tras la inyección de estas soluciones estándares de concentración conocida en el sistema de HPLC. Establecimos por tanto los intervalos de concentración para cada amina en los que la respuesta del detector es lineal (Tabla IV). La determinación de catecolaminas en nuestras muestras biológicas se encontró siempre dentro de estos intervalos de linealidad.

b) Paralelismo.

Se analizó el paralelismo entre la curva de calibración de cada amina y diluciones sucesivas de las aminas endógenas presentes en muestras de hipotálamo de *C. auratus*. Como se observa en las Figs 15 y 16 (ensayo A); 17 y 18 (ensayo B) y 19, 20 y 21 (ensayo C) hay un marcado paralelismo, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,1$ en todos los casos excepto $p > 0,05$ en la A y DA en el ensayo B) entre las pendientes de las rectas (Tabla V).

c) Límite de detección.

Los límites de detección para la solución estándar a 50 nA de sensibilidad fueron: 0,3 ng/ml (NA); 0,5 ng/ml (A y DOPAC) y 0,8 ng/ml (DA). A una sensibilidad de 10 nA fueron: 0,08 ng/ml (NA y HMPG); 0,1 ng/ml (A y DOPAC) y 0,2 ng/ml (DA).

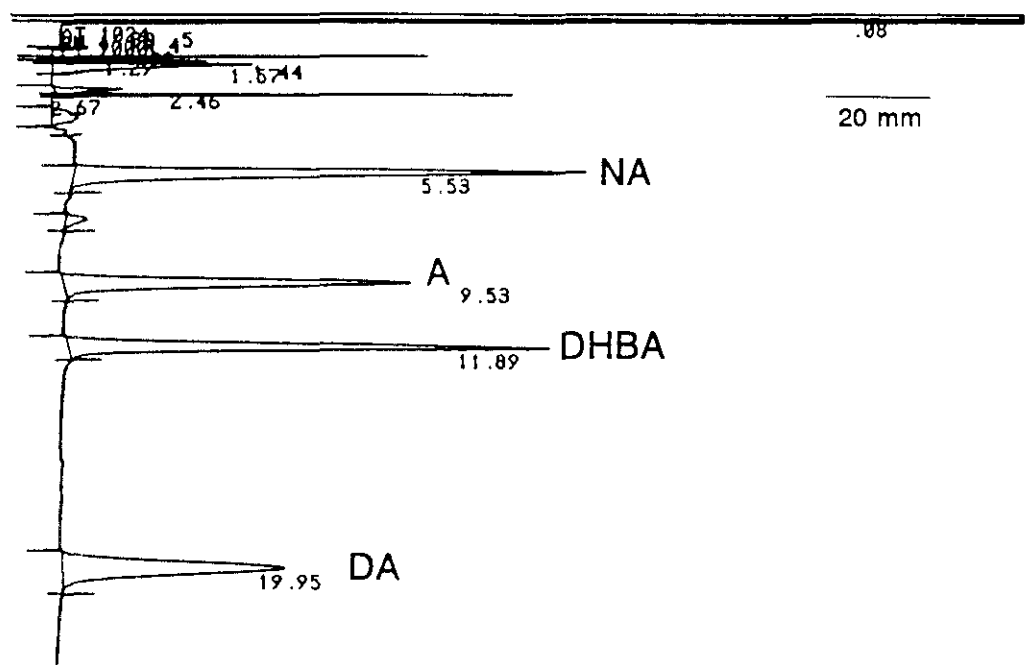


Figura 11. Cromatograma de la solución estándar conteniendo NA, A, DHBA y DA a 25 ng/ml (ensayo A, valoración de catecolaminas a 50 nA).

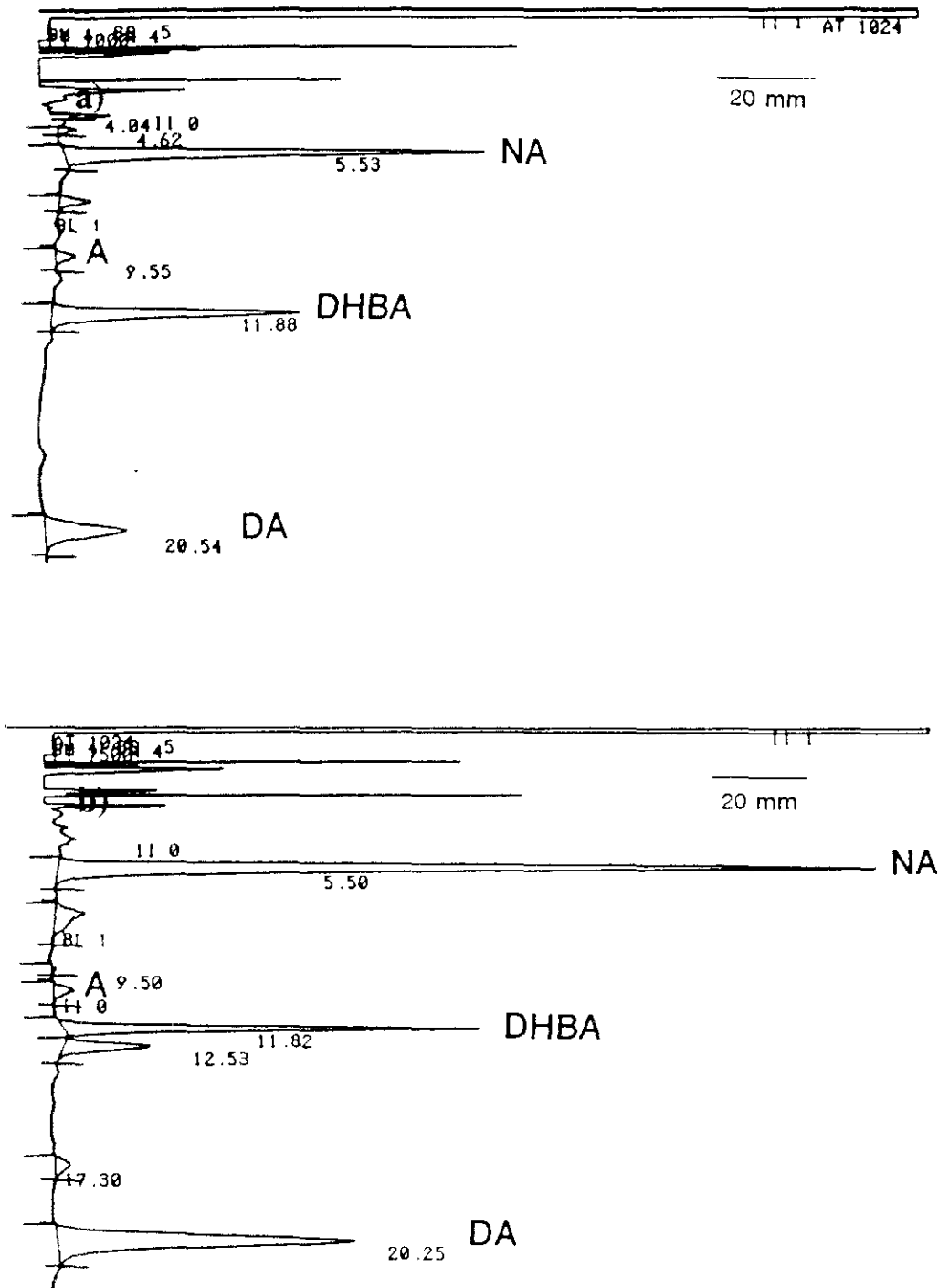


Figura 12. Separación cromatográfica de catecolaminas (NA, A, DA) en hipotálamo de a) *C. auratus* y b) *T. tinca*, utilizando DHBA (25ng/ml) como estándar interno (ensayo A).

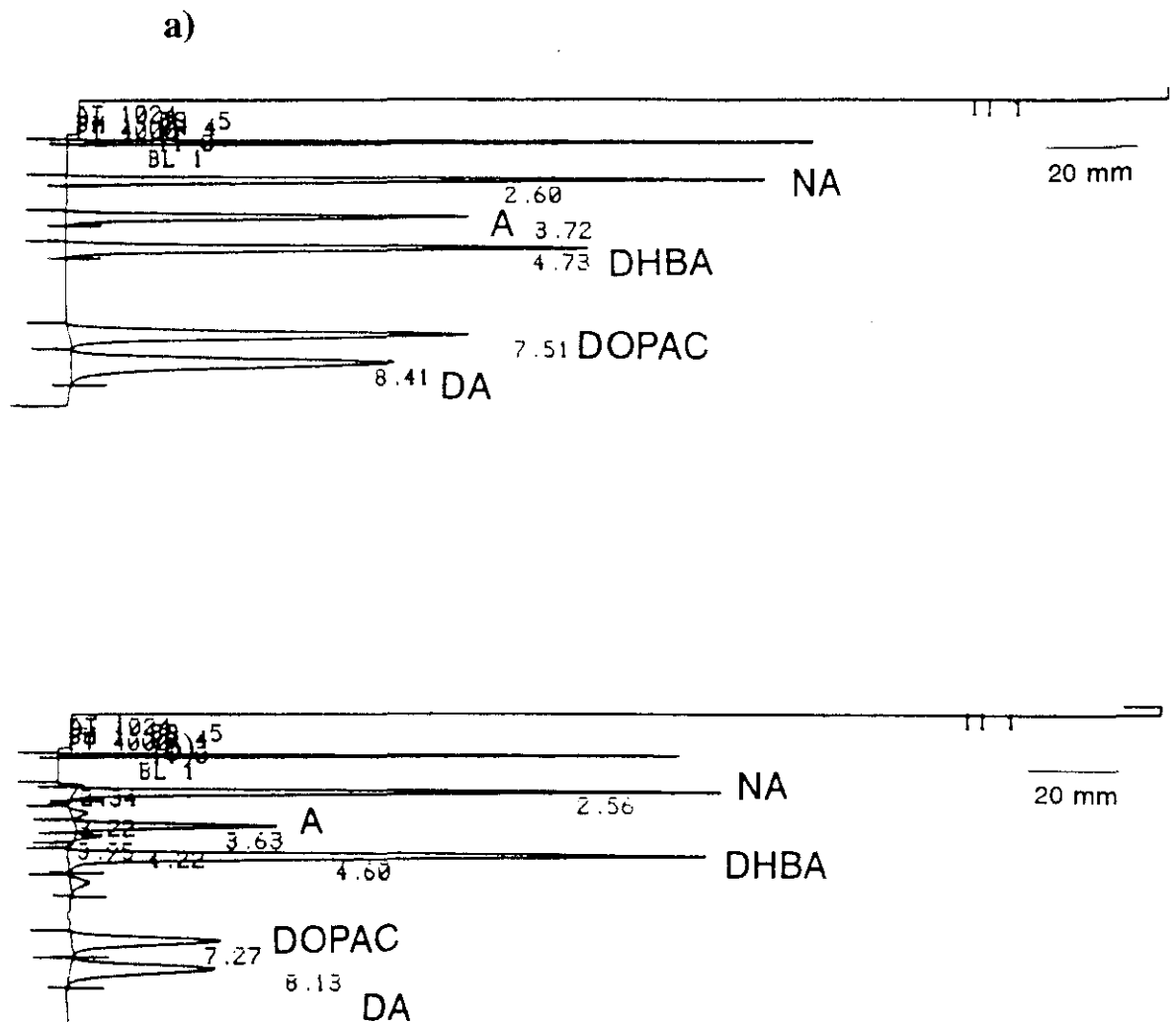


Figura 13. a) Cromatograma de la solución estándar conteniendo NA, A, DHBA, DOPAC y DA a 25 ng/ml (ensayo B, valoración de catecolaminas y metabolitos a 50 na). b) Separación cromatográfica de catecolaminas (NA, A y DA) y el metabolito DOPAC en hipotálamo de *C. auratus*, utilizando DHBA (25 ng/ml) como estándar interno).

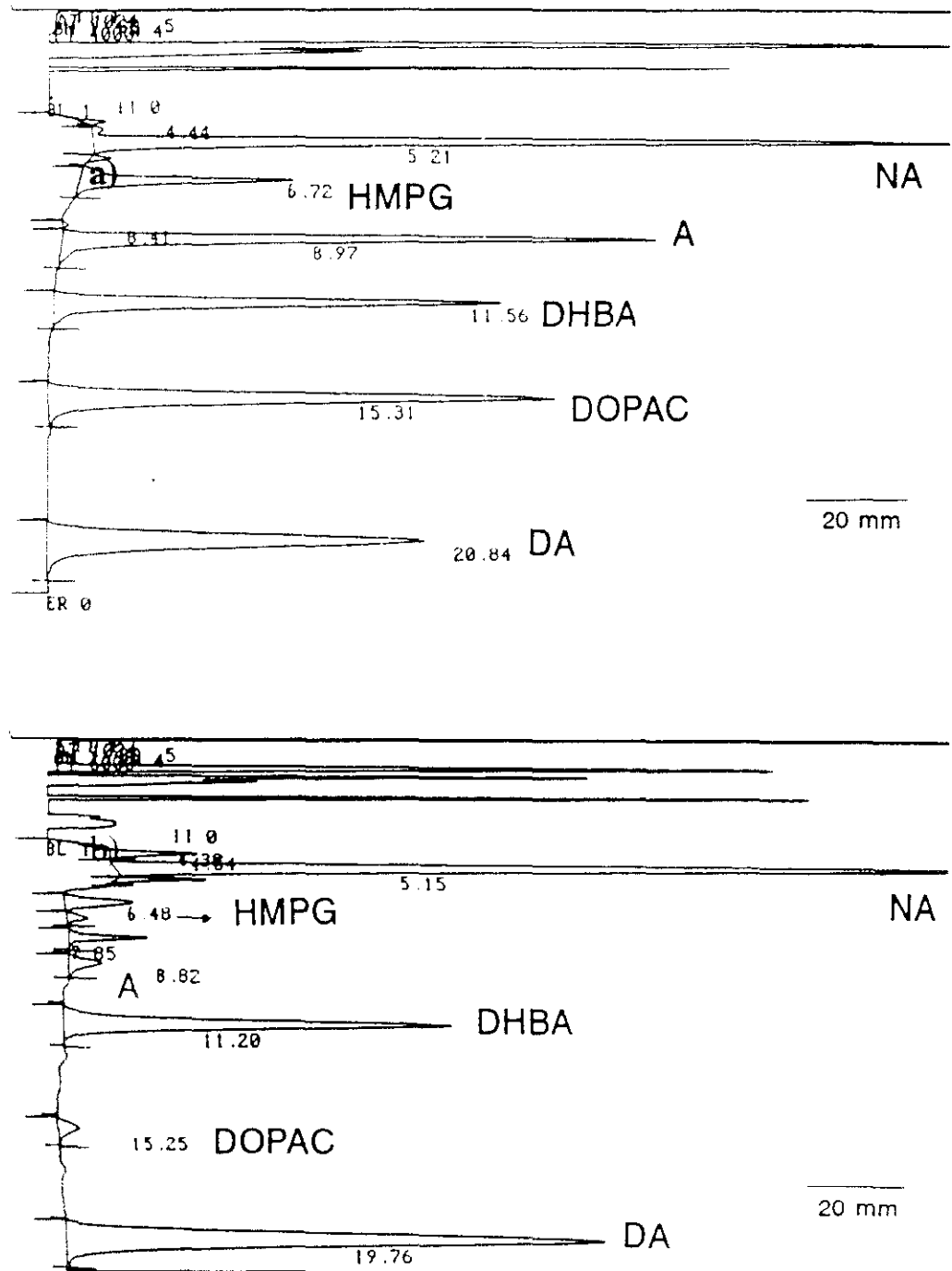


Figura 14. a) Cromatograma de la solución estándar conteniendo NA, HMPG, A, DHBA, DOPAC y DA a 12,5 ng/ml (ensayo C, valoración de catecolaminas y metabolitos a 10 na). b) Separación cromatográfica de catecolaminas (NA, A y DA) y metabolitos (HMPG y DOPAC) en hipotálamo de *C. auratus*, utilizando DHBA (12.5 ng/ml) como estándar interno).

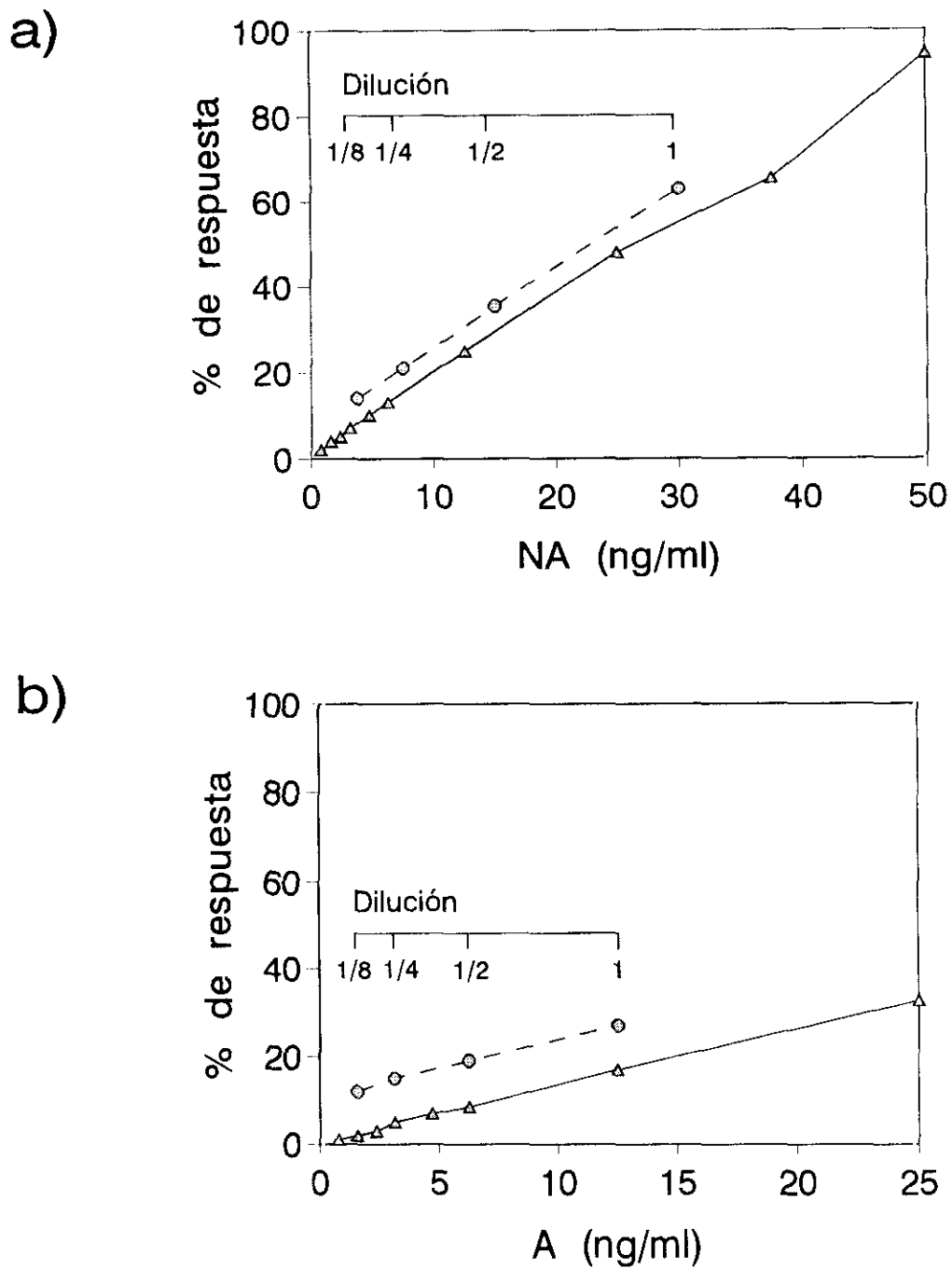


Figura 15. Paralelismo entre la curva de calibración de a) NA y b) A (ensayo A) y diluciones sucesivas de muestras de hipotálamo de *C. auratus*.

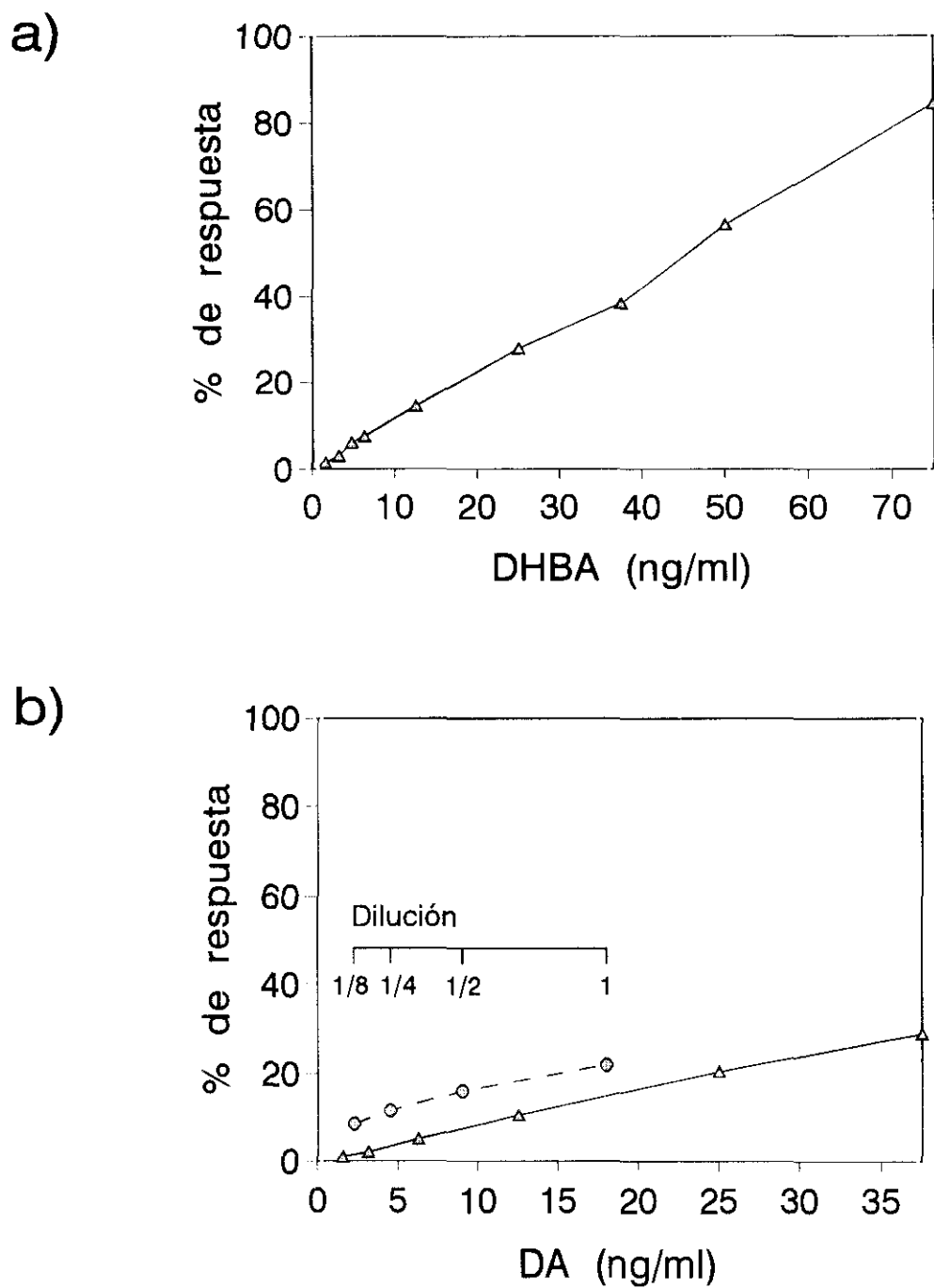


Figura 16. a) Intervalo de concentración del DHBA en el que la respuesta del detector es lineal. b) Paralelismo entre la curva de calibración de la DA (ensayo A) y diluciones sucesivas de de muestras de hipotálamo de *C. auratus*.

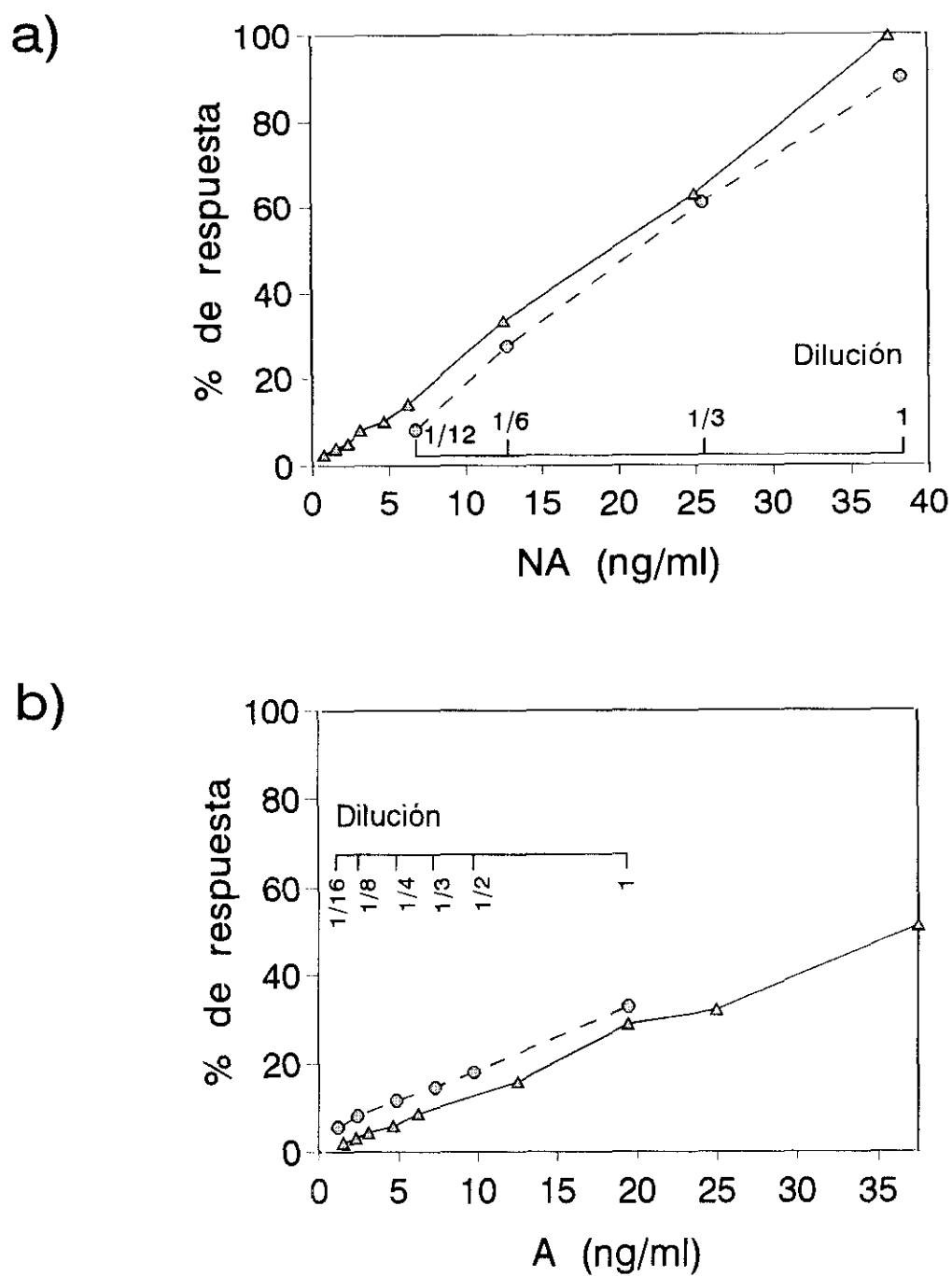


Figura 17. Paralelismo entre la curva de calibración de a) NA y b) A (ensayo B) y diluciones sucesivas de de muestras de hipotálamo de *C. auratus*.

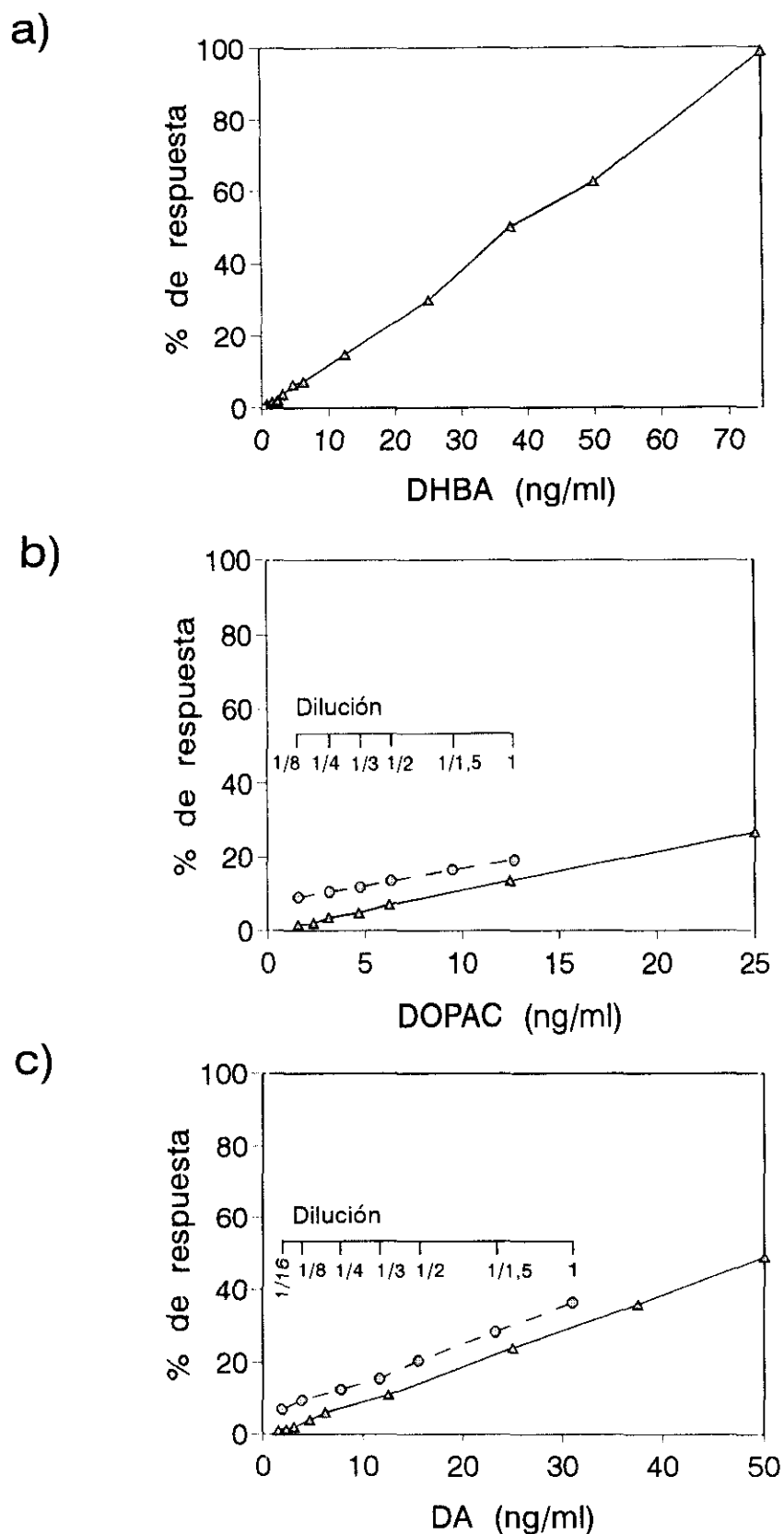


Figura 18. a) Intervalo de concentración del DHBA en el que la respuesta del detector es lineal. Paralelismo entre la curva de calibración de b) DOPAC y c) DA (ensayo B) y diluciones sucesivas de de muestras de hipotálamo de *C. auratus*.

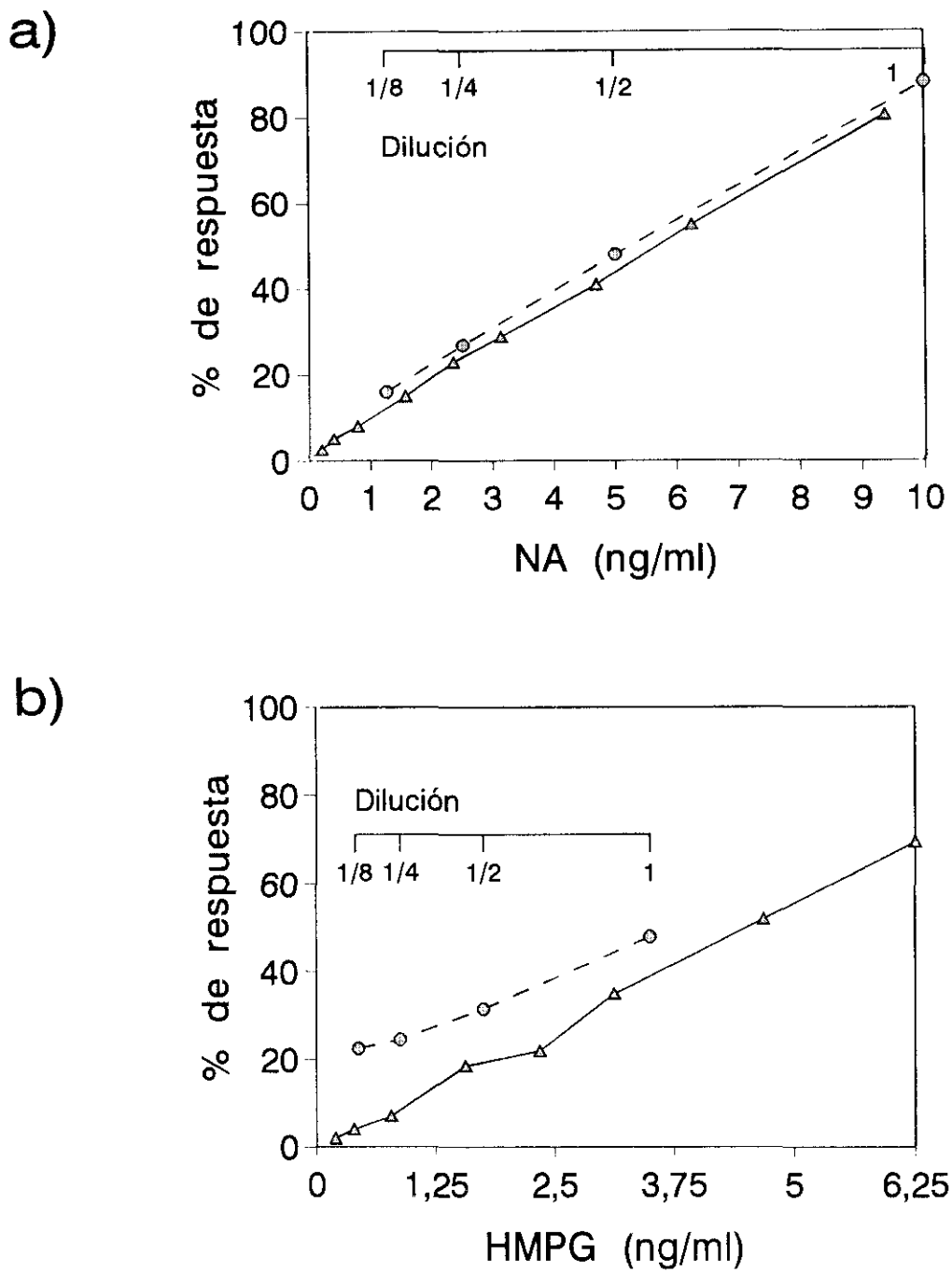


Figura 19. Paralelismo entre la curva de calibración de a) NA y b) HMPG (ensayo C) y diluciones sucesivas de de muestras de hipotálamo de *C. auratus*.

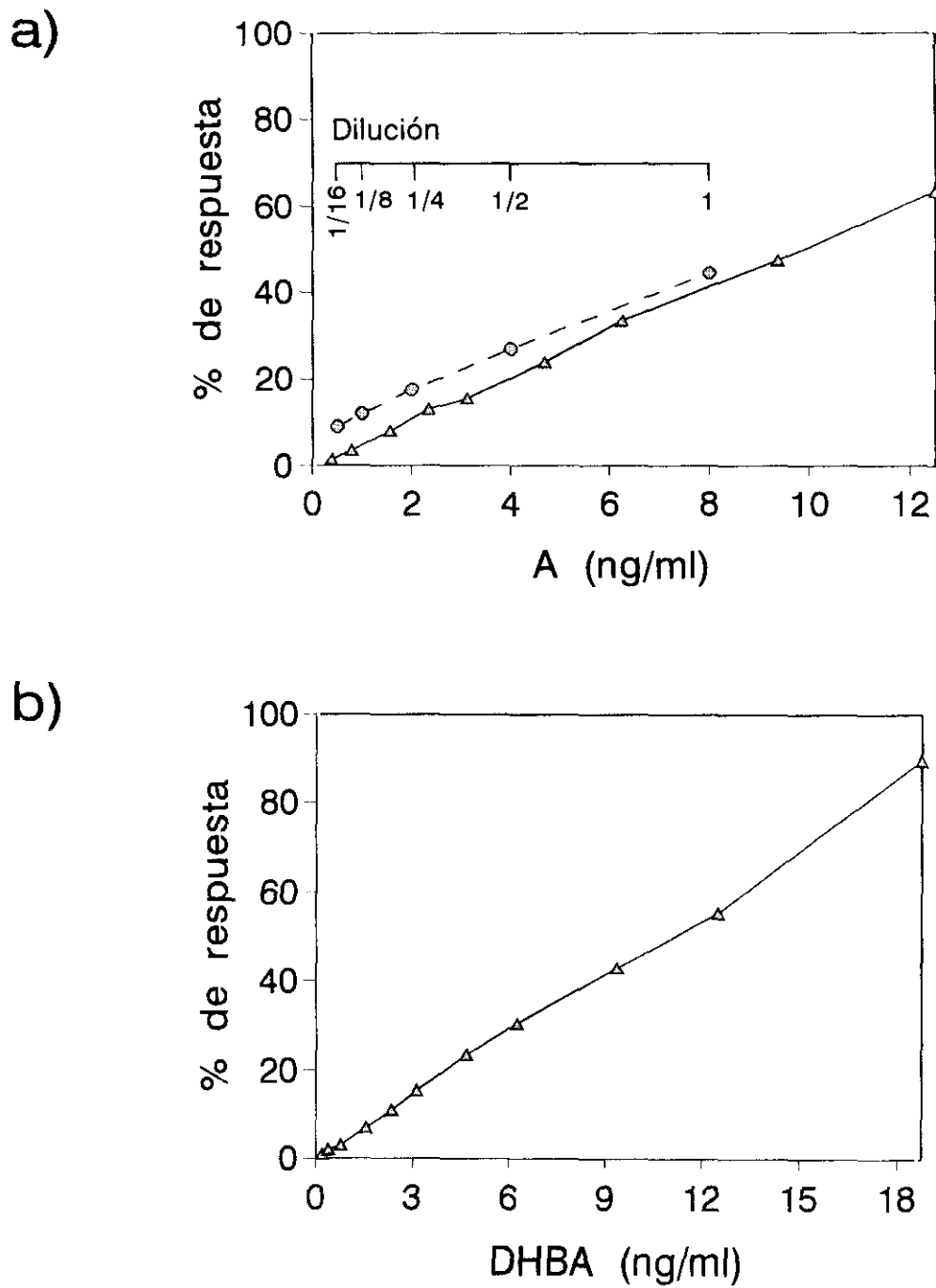


Figura 20. a) Paralelismo entre la curva de calibración de la A (ensayo C) y diluciones sucesivas de de muestras de hipotálamo de *C. auratus*. b) Intervalo de concentración del DHBA en el que la respuesta del detector es lineal.

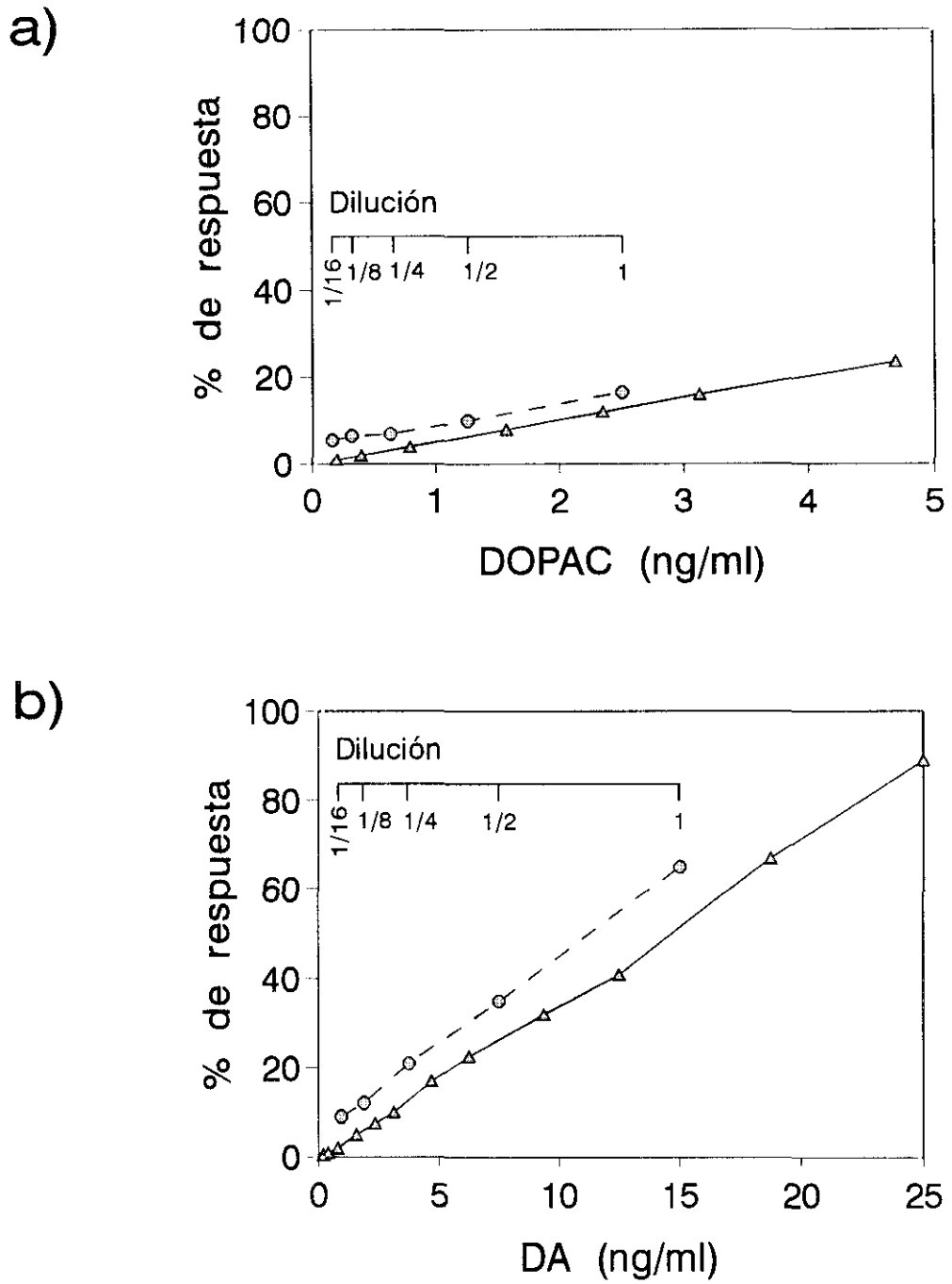


Figura 21. Paralelismo entre la curva de calibración de **a)** DOPAC y **b)** DA (ensayo C) y diluciones sucesivas de de muestras de hipotálamo de *C. auratus*.

d) Precisión y reproducibilidad.

Se calcularon los coeficientes de variación intraensayo de la solución estándar a una concentración de 25 ng/ml (ensayo A y B) y 12,5 ng/ml (ensayo C). La variación interensayo se determinó a partir de soluciones estándares inyectadas en diferentes días (n=10). Se realizó también la media (n=10) de los factores de respuesta (f_R) y los tiempos de retención relativos (t_{RR}) al estándar interno para cada amina.

Los coeficientes de variación CV (%) para cada amina calculados a partir de la solución estándar, se compararon con los valores de los CV determinados a partir de muestras cuyo contenido medio de aminas ($[\bar{x}]$ ng/ml, n=8) era similar a las concentraciones estándares seleccionadas.

En la Tabla VI se puede observar que en los tres ensayos los CV interensayo son siempre mayores a los CV intraensayo. Igualmente los f_R y t_{RR} son similares en los tres ensayos. Los factores de respuesta individual para cada amina se aproximan a 1 en la mayoría de los casos, lo cual indica que su comportamiento cromatográfico es similar al del estándar interno.

Cuando comparamos los CV intraensayo en la solución estándar y en las muestras biológicas se observa que en estas últimas los CV son mayores como consecuencia de la mayor variabilidad de las muestras biológicas. La cuantificación de catecolaminas que hemos realizado por HPLC posee así, una reproducibilidad aceptable para la determinación en nuestras muestras biológicas.

Tabla IV. Coeficientes de determinación e intervalos de linealidad para cada catecolamina en los tres ensayos utilizados.

<u>ENSAYO A</u>	<u>n</u>	<u>Coeficiente de determinación (r^2)</u>	<u>Intervalo de linealidad (ng/ml)</u>
NA	10	0,9972	50-0,781
A	11	0,9968	75-0,781
DHBA	9	0,9978	75-1,562
DA	9	0,9988	100-1,562
<u>ENSAYO B</u>	<u>n</u>	<u>Coeficiente de determinación (r^2)</u>	<u>Intervalo de linealidad (ng/ml)</u>
NA	9	0,9982	37,5-0,781
A	10	0,9988	75-1,562
DHBA	11	0,9984	75-0,781
DOPAC	10	0,9956	75-1,562
DA	11	0,9996	100-1,562
<u>ENSAYO C</u>	<u>n</u>	<u>Coeficiente de determinación (r^2)</u>	<u>Intervalo de linealidad (ng/ml)</u>
NA	9	0,9992	9,37-0,195
HMPG	9	0,9918	9,37-0,195
A	10	0,9994	18,7-0,195
DHBA	11	0,9976	18,7-0,195
DOPAC	11	0,9978	18,7-0,195
DA	12	0,9986	25-0,195

Tabla V. Comparación de las pendientes de las rectas de la curva de calibración y muestras de hipotálamo de *C. auratus*.

<u>Ensayo A</u>	<u>Curva calibración</u>	<u>Hipotálamo</u>
NA	$b=1,824 \pm 0,037$	$b=1,868 \pm 0,009$
A	$b=1,214 \pm 0,023$	$b=1,341 \pm 0,059$
DA	$b=0,854 \pm 0,009$	$b=0,792 \pm 0,056$
<u>Ensayo B</u>	<u>Curva calibración</u>	<u>Hipotálamo</u>
NA	$b=2,642 \pm 0,039$	$b=2,504 \pm 0,013$
A	$b=1,328 \pm 0,015$	$b=1,480 \pm 0,026$
DOPAC	$b=1,020 \pm 0,024$	$b=0,927 \pm 0,015$
DA	$b=0,968 \pm 0,006$	$b=1,012 \pm 0,024$
<u>Ensayo C</u>	<u>Curva calibración</u>	<u>Hipotálamo</u>
NA	$b=8,453 \pm 0,047$	$b=8,202 \pm 0,094$
HMPG	$b=9,805 \pm 0,049$	$b=7,965 \pm 0,219$
A	$b=5,141 \pm 0,042$	$b=4,691 \pm 0,132$
DOPAC	$b=5,112 \pm 0,078$	$b=4,662 \pm 0,219$
DA	$b=3,560 \pm 0,042$	$b=3,989 \pm 0,054$

Tabla VI. Comparación de los CV intra- e interensayo de la determinación de catecolaminas calculados a partir de la solución estándar y a partir de muestras de hipotálamo.

ENSAYO A								
CV (%)	Solución estándar				<i>C. auratus</i>		<i>T. tinca</i>	
	INTRA-	INTER-	f_R	t_{RR}	CV	$[\bar{x}]$	CV	$[\bar{x}]$
NA	2,4	8,5	0,887	0,466	10,2	[30,1]	9,7	[39,7]
A	2,8	6,0	1,093	0,806	8,4	[1,17]	7,5	[3,58]
DHBA	3,1	5,2	--	--	5,3	[25,0]	5,8	[25,0]
DA	3,2	6,6	0,905	1,721	8,5	[26,6]	7,9	[27,5]

ENSAYO B						
CV (%)	Solución estándar				<i>C. auratus</i>	
	INTRA-	INTER-	f_R	t_{RR}	CV	$[\bar{x}]$
NA	7,3	11,6	1,093	0,465	9,2	[27,7]
A	5,3	9,7	1,295	0,789	7,3	[10,9]
DHBA	4,4	7,9	--	--	3,8	[25,0]
DOPAC	4,7	7,8	0,921	1,424	6,8	[10,3]
DA	3,8	5,9	0,872	1,733	10,7	[18,9]

ENSAYO C						
CV (%)	Solución estándar				<i>C. auratus</i>	
	INTRA-	INTER-	f_R	t_{RR}	CV	$[\bar{x}]$
NA	8,1	10,4	1,055	0,461	9,9	[15,3]
HMPG	5,5	13,9	4,579	0,665	7,3	[6,48]
A	4,7	9,9	1,162	0,784	10,6	[0,26]
DHBA	5,1	6,9	--	--	5,3	[12,5]
DOPAC	4,4	7,5	0,902	1,417	10,7	[0,65]
DA	3,7	5,3	0,919	1,741	10,3	[18,1]

3. CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN ALIMENTARIO EN *Tinca tinca*.

3.1. Determinación del patrón alimentario.

En la Fig. 22 se puede observar la ingestión de alimento a las 2, 4, 8 y 12 h en *T. tinca*. El intervalo 4-8 h representa el período de máxima ingesta ($p < 0,005$), no existiendo diferencias estadísticas entre los restantes intervalos analizados.

La Fig. 23a muestra las diferencias entre la ingesta a las 8 h durante la fase luminosa y la fase oscura del fotociclo diario, observándose que la ingesta es mayor durante la fase oscura ($p < 0,01$).

Como se puede observar en la Fig. 23b, el anestésico MS-222 no produce modificaciones de la ingesta, al menos, a la dosis utilizada (1/10.000). Por otro lado, la inyección intracerebroventricular (1 μ l) tampoco parece afectar al grado de ingestión a las 8 h de ser inyectados los animales.

3.2. Determinación de parámetros metabólicos y hormonales.

a) Ciclos diarios.

Aparece un ritmo día/noche significativo para todos los parámetros estudiados. ANOVAS: Actividad NAT (Fig. 24a, $p < 0,0001$), cortisol plasmático (Fig. 24b, $p < 0,0001$), glucosa plasmática (Fig. 25a, $p < 0,005$), glucógeno hepático (Fig. 25b, $p < 0,0001$) y catecolaminas hipotalámicas (Fig. 26: A, $p < 0,05$; DA, $p < 0,01$).

La actividad NAT nocturna muestra niveles significativamente elevados a las 22:00, 2:00 y 6:00 horas ($p < 0,01$) respecto a los valores diurnos (Fig. 24a).

Los niveles plasmáticos de cortisol (Fig. 24b) también presentaron cambios día/noche significativos con un máximo ($p < 0,05$) al principio de la fase oscura, y un mínimo ($p < 0,01$) en la mitad de la fase diurna.

En cuanto a la glucosa plasmática (Fig. 25a), aparecen valores bajos durante la noche, siendo mínimos inmediatamente antes de comer, observándose a continuación un incremento a las 4 h (14:00) de la ingestión de alimento ($p < 0,01$), disminuyendo luego progresivamente.

El contenido hepático de glucógeno (Fig. 25b) muestra también niveles elevados a las 14:00 y 18:00 h. Además, aparece otro máximo en la medianoche ($p < 0,01$).

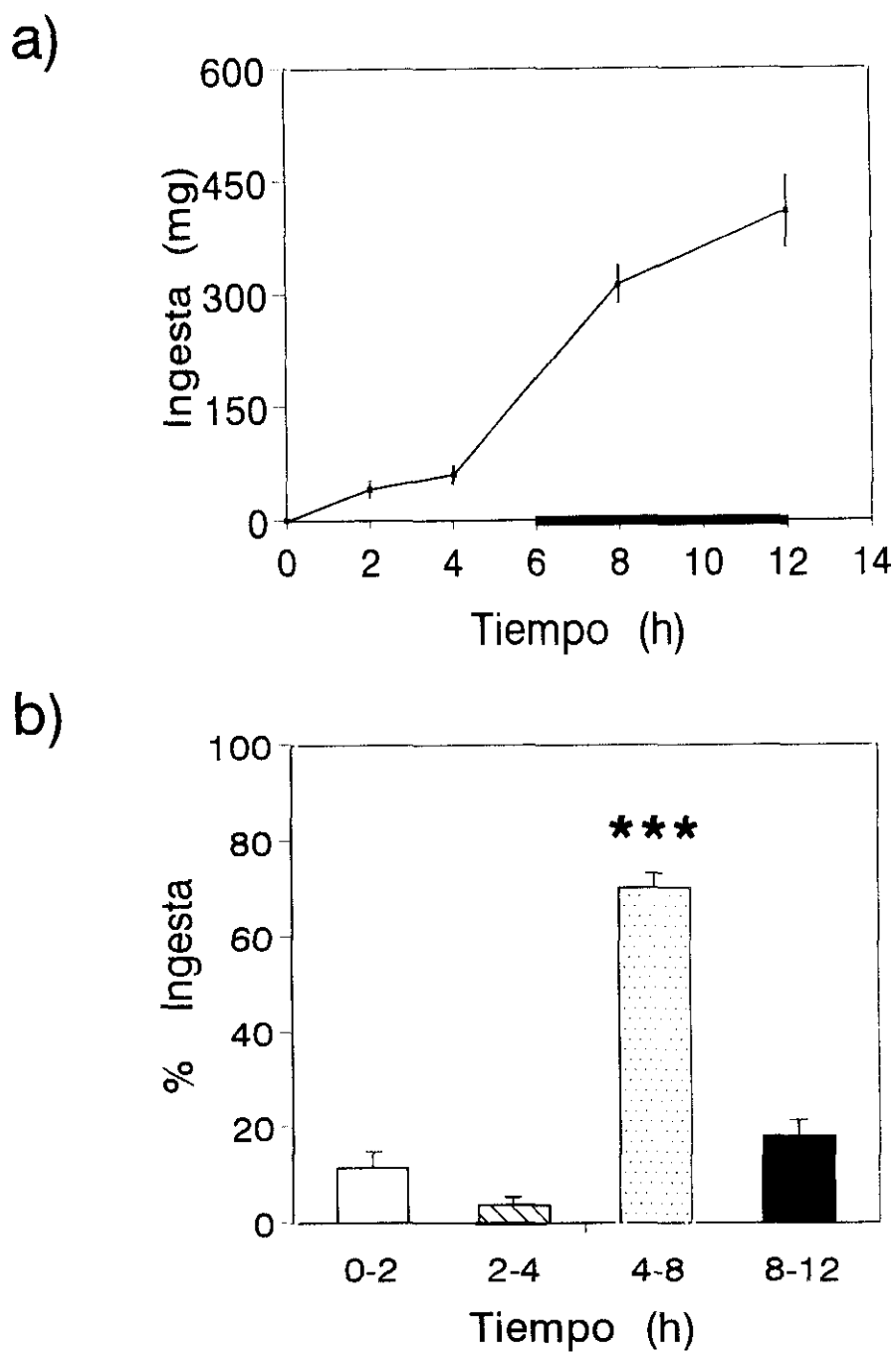


Figura 22. a) Ingesta acumulativa a las 2, 4, 8 y 12 h de recibir el alimento en *T. tinca*. La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario. b) Contribución de cada intervalo sobre la ingesta total a las 12 h en *T. tinca*. Los datos se representan como $\bar{x} \pm e.e.m.$ (n=8/grupo). *** $p < 0,005$.

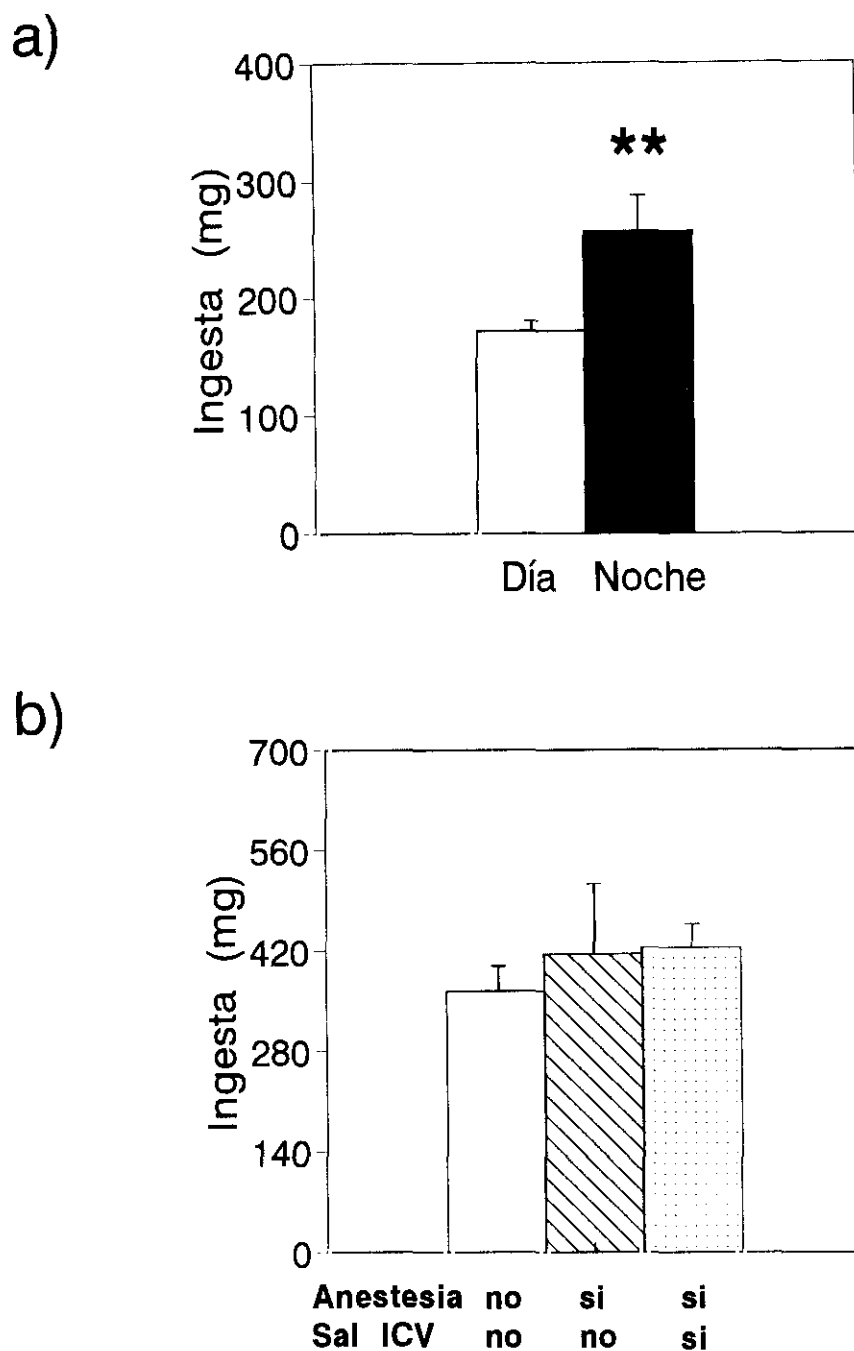


Figura 23. a) Ingesta a las 8 h en *T. tinca* durante la fase luminosa y oscura del ciclo diario (12L:12D, luces a las 4:00 h). b) Efecto del anestésico (MS-222, 1/10.000) y la inyección ICV de solución salina (1 μ l) sobre la ingestión de alimento a las 8 h en *T. tinca*. Los datos se representan como \bar{x} +e.e.m. (n=6/grupo). ** p<0,01.

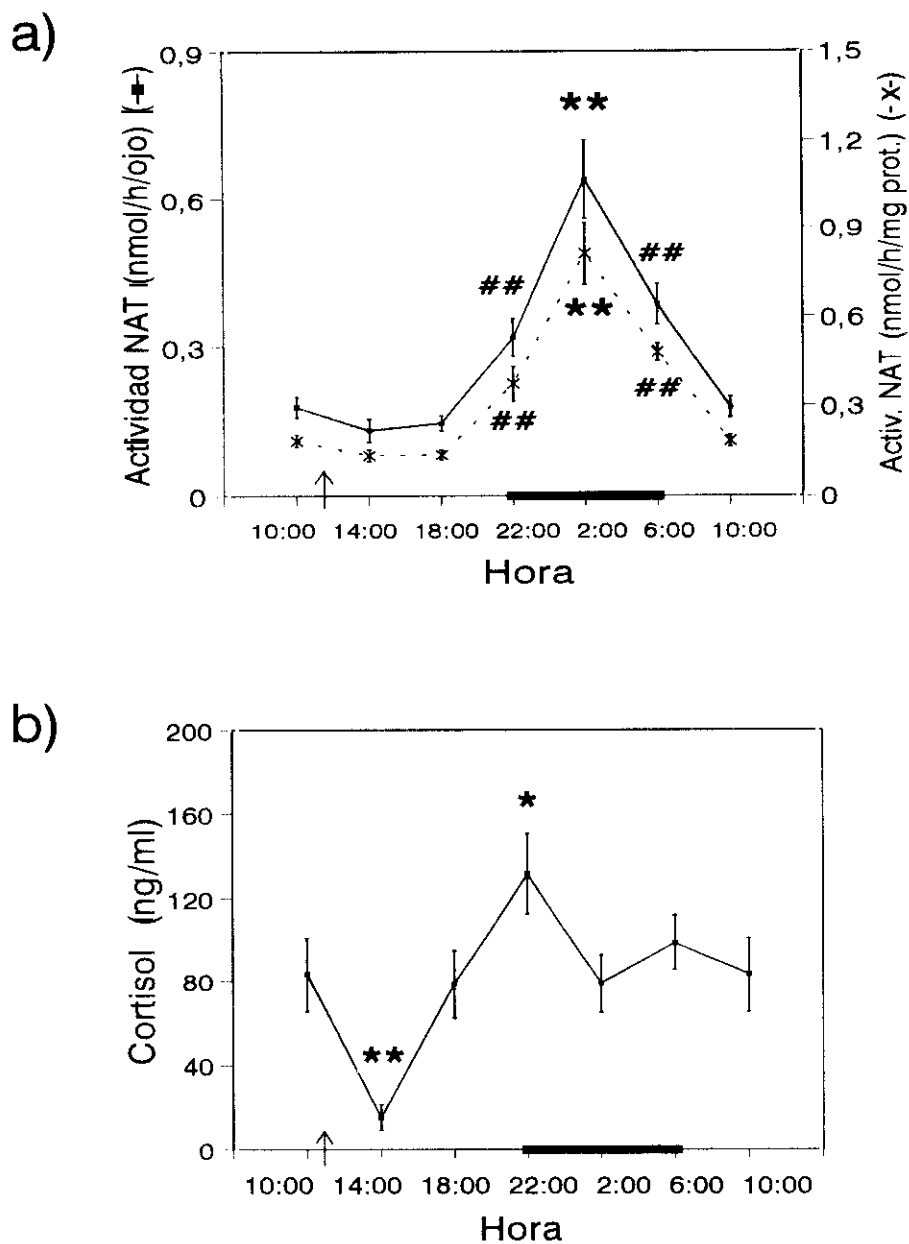


Figura 24. Cambios diarios de a) la actividad serotonina N-acetiltransferasa (NAT) y b) los niveles plasmáticos de cortisol en *T. tinca*. La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario, y la flecha el momento de la alimentación. Los datos se representan como $\bar{x} \pm e.e.m.$ ($n=9$ /grupo). Significación estadística: a) ** $p < 0,01$ respecto al resto de las horas; ## $p < 0,01$ respecto a las 10, 14 y 18:00 h. b) * $p < 0,05$ respecto a las 10, 18 y 2:00 h; ** $p < 0,01$ respecto al resto de las horas.

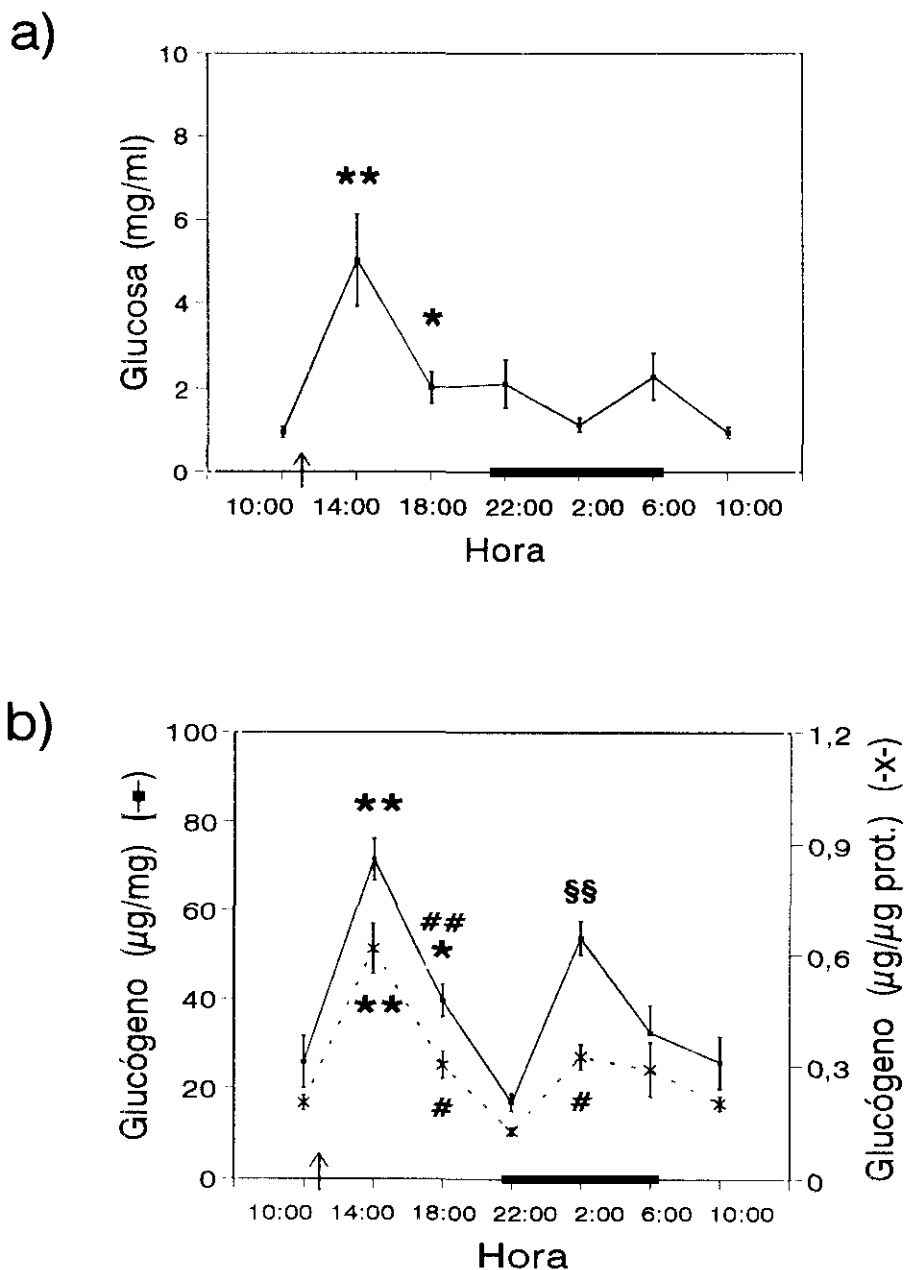


Figura 25. Cambios diarios de a) niveles plasmáticos de glucosa y b) contenido hepático de glucógeno en *T. tinca*. La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario, y la flecha el momento de la alimentación. Los datos se representan como $\bar{x} \pm e.e.m.$ ($n=9/\text{grupo}$). Significación estadística: a) * $p < 0,05$ respecto a las 10 y 14:00 h; ** $p < 0,01$ respecto a las 10, 22, 2 y 6:00 h. b) * $p < 0,05$ respecto a las 10:00 h; # $p < 0,05$ respecto a las 22:00 h; ** $p < 0,01$ respecto al resto de las horas; ## $p < 0,01$ respecto a las 22:00 h; §§ $p < 0,01$ respecto al resto de las horas.

La Fig. 26 muestra los cambios día/noche del contenido hipotalámico de catecolaminas. La A (Fig. 26b) y la DA (Fig. 26c) presentan perfiles paralelos con un máximo a las 4 h de la ingestión de alimento. En cuanto a la NA (Fig. 26a), no hay diferencias a lo largo de día, aunque se observa una tendencia a un mayor contenido de dicha catecolamina a las 4 h de la alimentación.

b) Correlación con la ingesta a distintos tiempos.

En la Fig. 27 se han representado los valores de glucosa en plasma y glucógeno hepático en animales sin recibir comida (CB, 0 mg de ingestión) y a las 4 h (ingesta de $98,3 \pm 2$ mg) y 8 h (ingesta de $336,2 \pm 3,5$ mg) de recibir el alimento. Los niveles de glucosa (Fig. 27a) fueron superiores en los animales alimentados, tanto a las 4 ($p < 0,005$) como a las 8 h ($p < 0,05$), que en los que estaban en ayuno (24 h). El contenido hepático de glucógeno (Figs 27b y c) muestra también un incremento tras 4 h de alimentación respecto a los animales en ayuno, recuperándose a las 8 h de recibir el alimento los valores encontrados en los animales tras 24 h de ayuno.

Los niveles plasmáticos de T_3 y T_4 (Figs 28a y b) fueron mayores en los animales alimentados, aunque este incremento sólo resultó significativo en el grupo que disponía de alimento durante 8 h ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias en ninguno de los grupos en la relación T_3/T_4 plasmática (Fig. 28c).

c) Efecto del ayuno.

Un período de ayuno de una semana provocó un fuerte descenso de la glucosa en sangre ($p < 0,005$), que fue revertido totalmente ($p < 0,005$) por la realimentación durante 2 días tras los 7 días de ayuno (Fig. 29).

En la Fig. 30 podemos observar que tanto el contenido hepático de glucógeno (a y b), como el índice hepatosomático (c) disminuyeron tras el período de ayuno ($p < 0,005$). La realimentación en ambos casos revierte este descenso hacia los valores encontrados en los animales alimentados diariamente, pero quedando intermedios entre éstos ($p < 0,005$) y los valores medidos en animales en ayuno ($p < 0,005$).

En cuanto al contenido de hormonas tiroideas, fracciones libre y unida, así como sus respectivas relaciones (Fig. 31), no presentan en general cambios significativos entre ninguno de los tres grupos. Únicamente el contenido de FT_4 (fracción libre de T_4) descendió con el ayuno ($p < 0,05$) y fue revertido totalmente con la realimentación ($p < 0,05$).

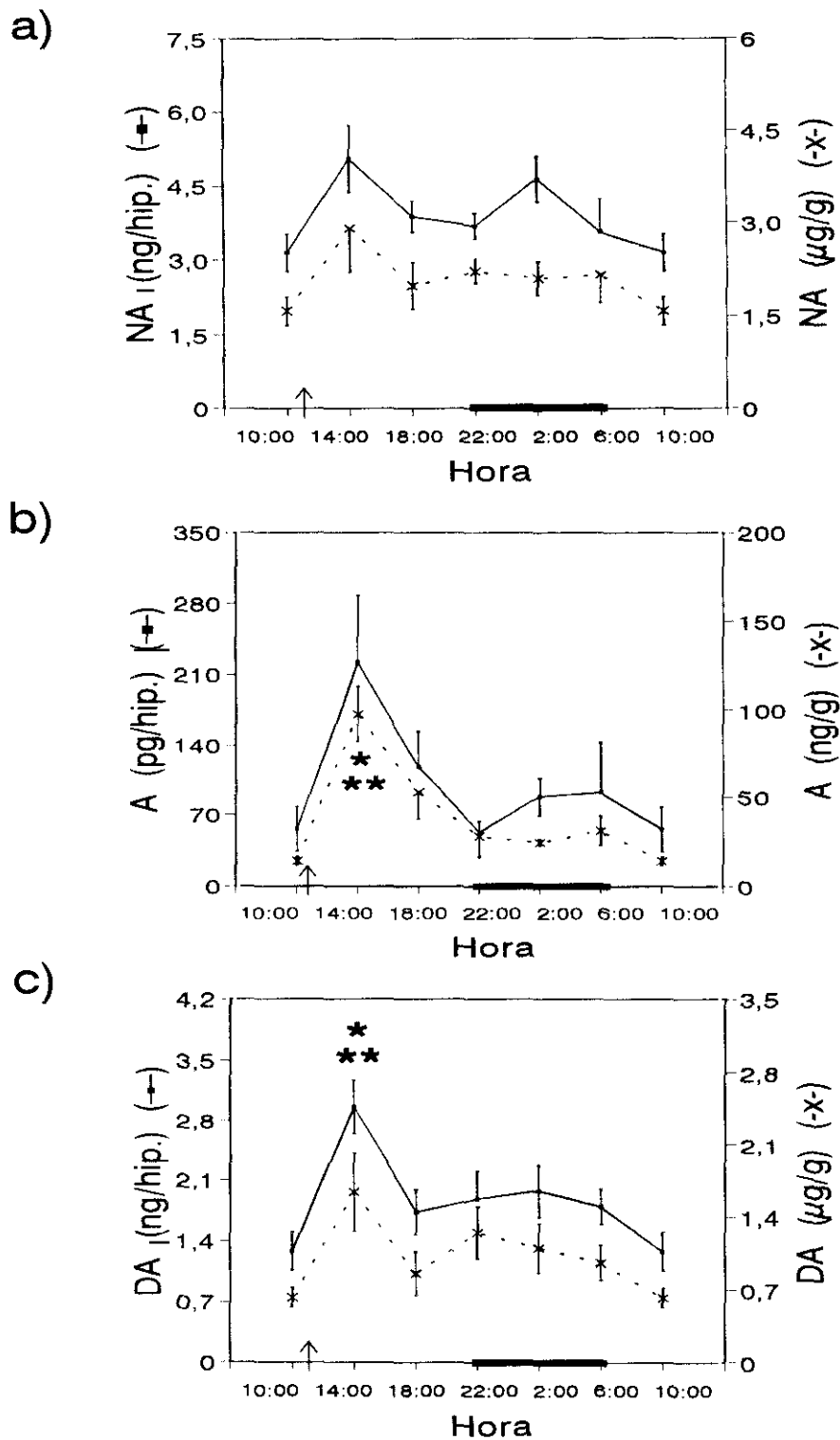


Figura 26. Cambios diarios del contenido hipotalámico de catecolaminas en *T. tinca*: **a)** noradrenalina, **b)** adrenalina y **c)** dopamina. La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario, y la flecha el momento de la alimentación. Los datos se representan como $\bar{x} \pm e.e.m.$ ($n=9/\text{grupo}$). Significación estadística: **b)** * $p < 0,05$ respecto a las 18:00 h; ** $p < 0,01$ respecto a las 10, 22, 2 y 6:00 h. **c)** * $p < 0,05$ respecto a las 22, 2 y 6:00 h; ** $p < 0,01$ respecto a las 10 y 18:00 h.

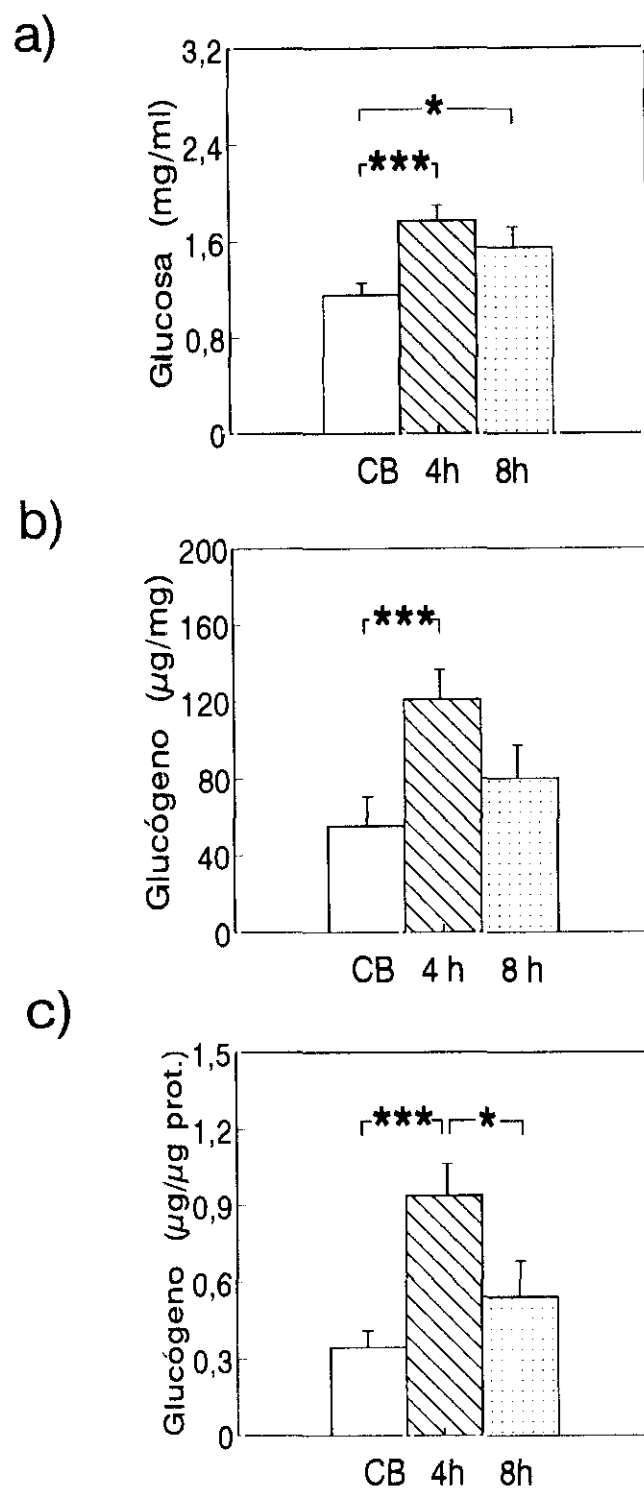


Figura 27. a) Niveles plasmáticos de glucosa y b), c) contenido hepático de glucógeno en ejemplares de *T. tinca* sacrificados sin comer (CB, condiciones basales) y a las 4 (4 h) y 8 h (8 h) de recibir la comida (1% peso corporal). Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ (n=8-13/grupo). * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

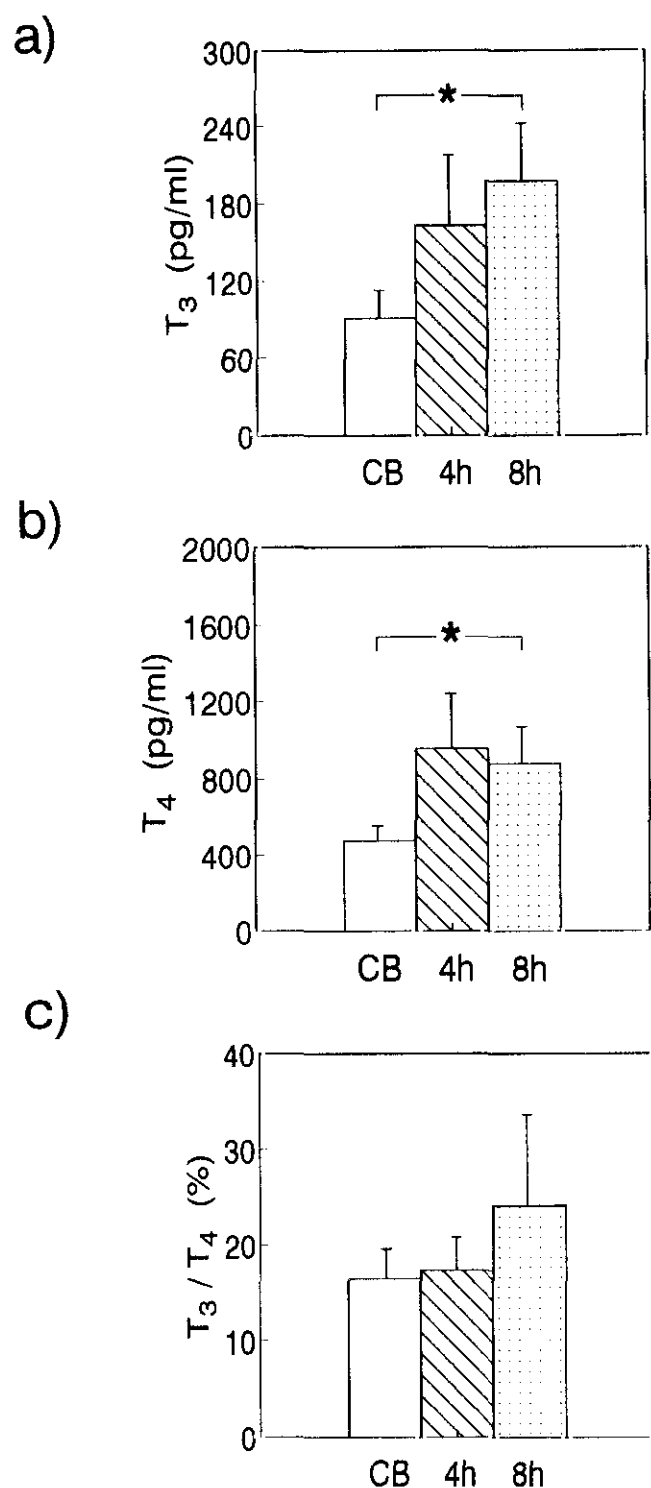


Figura 28. Niveles plasmáticos de a) T_3 , b) T_4 y c) relación T_3/T_4 plasmática en ejemplares de *T. tinca* sacrificados sin comer (CB, condiciones basales) y a las 4 (4 h) y 8 h (8 h) de recibir la comida (1% peso corporal). Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ (n=8-13/grupo). * $p < 0,05$.

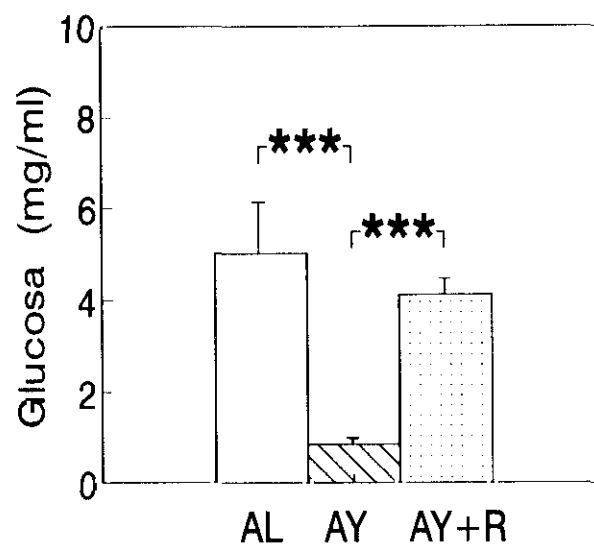


Figura 29. Niveles plasmáticos de glucosa en *T. tinca* en animales que recibieron alimento diariamente (AL), sometidos a una semana de ayuno (AY) y tras una semana de ayuno más dos días de realimentación (AY+R). Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ (n=9-10/grupo). *** p < 0,005.

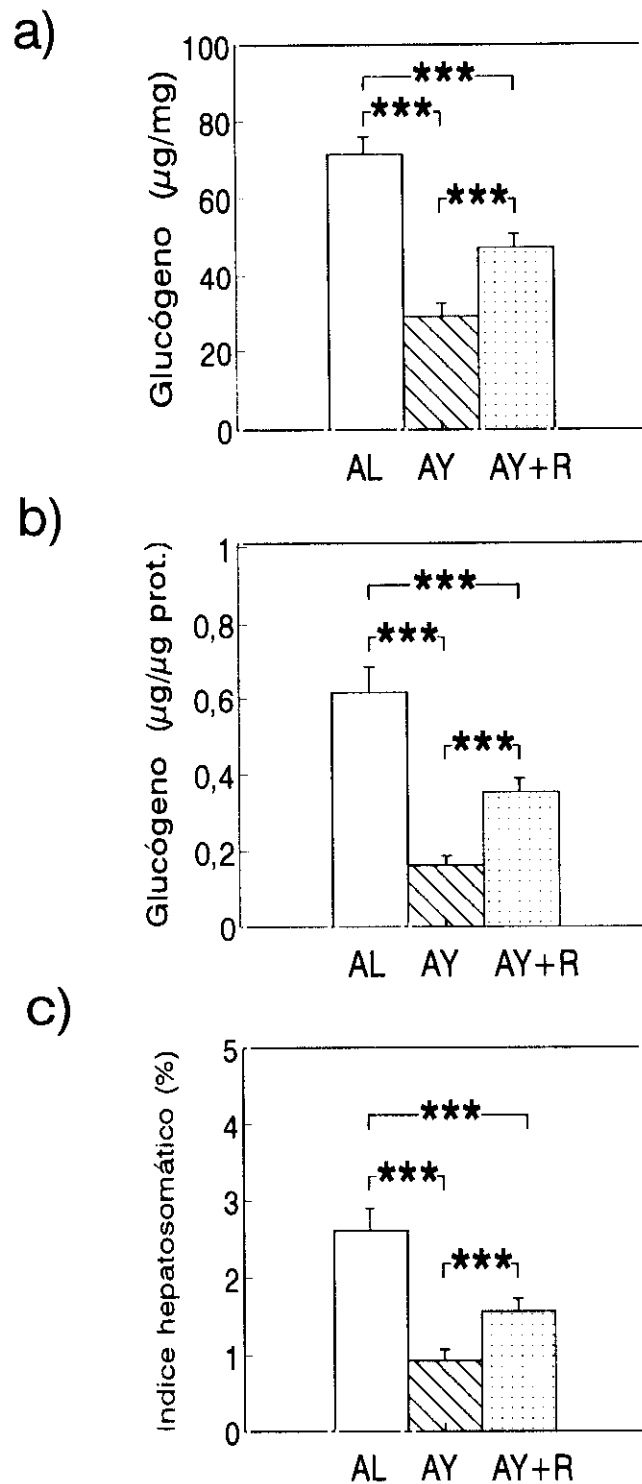


Figura 30. a) y b) Contenido hepático de glucógeno y c) índice hepatosomático en *T. tinca* en animales que recibieron alimento diariamente (AL), sometidos a una semana de ayuno (AY) y tras una semana de ayuno más dos días de realimentación (AY+R). Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=9-10/\text{grupo}$). *** $p < 0,005$.

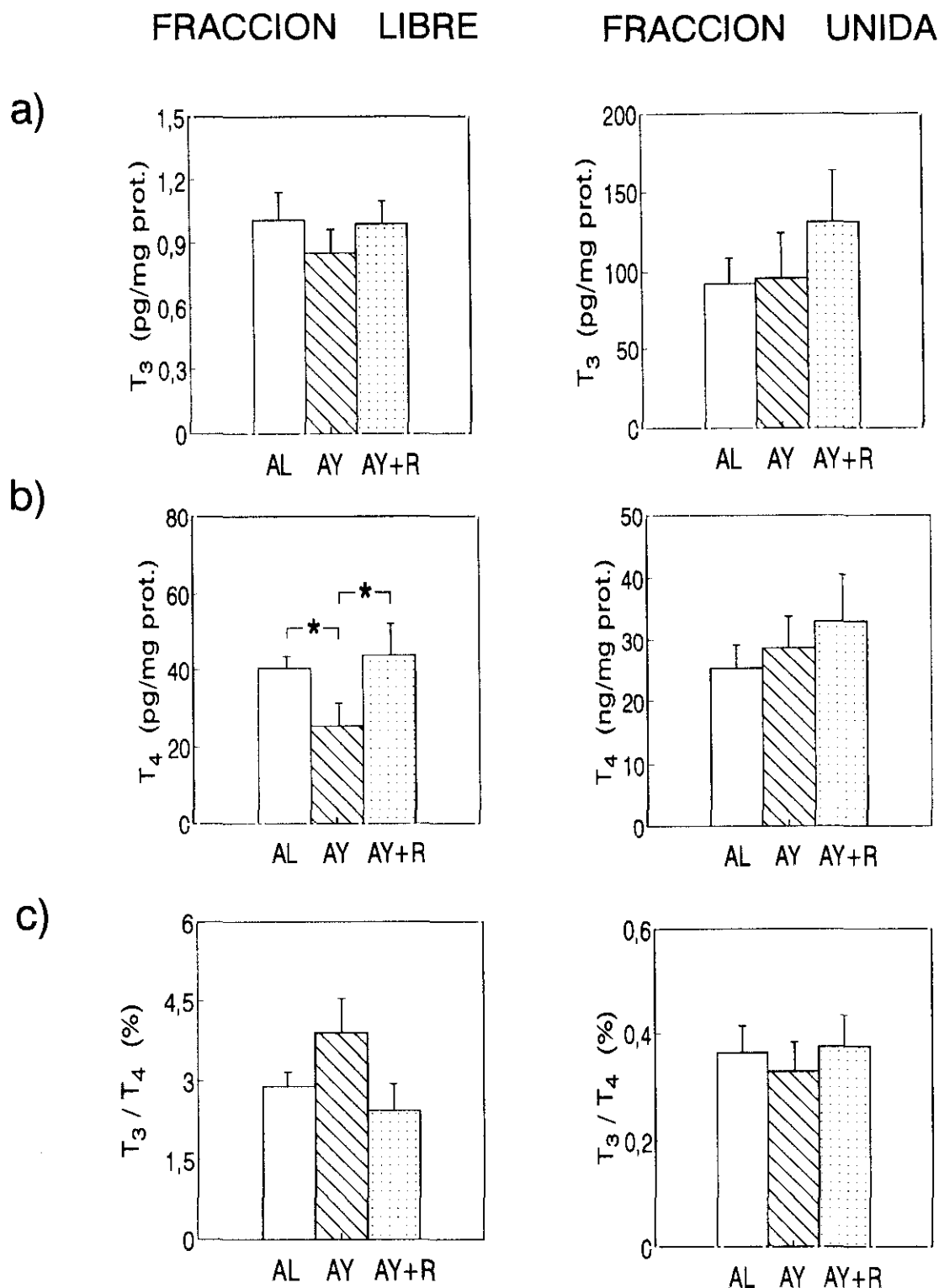


Figura 31. Contenido tiroideo de las fracciones libre y unida de **a)** T_3 , **b)** T_4 y **c)** las correspondientes relaciones T_3/T_4 tiroideas en *T. tinca* en animales que recibieron alimento diariamente (AL), sometidos a una semana de ayuno (AY) y tras una semana de ayuno más dos días de realimentación (AY+R). Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ (n=9-10/grupo). * $p < 0,05$.

Los niveles plasmáticos de T_3 (Fig. 32a) y T_4 (Fig. 32b) disminuyeron significativamente ($p < 0,05$ y $p < 0,005$, respectivamente) tras el período de ayuno, y la realimentación consiguió revertir esta disminución ($p < 0,01$, para la T_4). La relación T_3/T_4 parece aumentar con el ayuno pero sin llegar a ser este aumento estadísticamente significativo (Fig. 32c).

La Fig. 33 muestra los valores de catecolaminas hipotalámicas. El contenido de NA (a) y DA (c) aumentó significativamente ($p < 0,01$ y $p < 0,005$, respectivamente) en los dos grupos sometidos a una semana de ayuno, independientemente de que uno de ellos fuera luego realimentado durante dos días.

4. REGULACIÓN DE LA INGESTA POR EL CRF.

4.1. Optimización del test de ingesta en *Carassius auratus*.

Las Figs 34a y b muestran la ingestión de alimento al cado de 1, 2 y 8 h en *C. auratus*. Se puede observar que el intervalo 2-8 h representa el período de máxima ingesta absoluta ($p < 0,005$) de los tres intervalos estudiados, aunque la ingesta relativa (mg/h) durante este intervalo es menor que durante las dos primeras horas analizadas.

En cuanto al efecto del anestésico MS-222 o las inyecciones ICV ($1 \mu\text{l}$), no encontramos diferencias significativas en la ingesta como consecuencia de dichos tratamientos (Fig. 34c).

4.2. Administración ICV e IP de CRF. Efecto sobre la ingesta.

En la Fig. 35 se han representado los resultados obtenidos en relación a la administración ICV de CRF a 5 dosis distintas. Podemos observar un descenso ($p < 0,05$) en la ingesta con las dosis de 1 y 2 μg a las 2 h (Fig. 35a), mientras que en el siguiente intervalo (2-8 h, Fig. 35b) las mismas dosis inducen el efecto opuesto, aumentando la ingesta ($p < 0,05$). Las dosis inferiores utilizadas (0,1 y 0,33 μg) presentan un comportamiento similar, con tendencias depresoras de la ingesta en el intervalo 0-2 h y estimuladoras en el intervalo 2-8 h, pero sin llegar a ser significativamente diferentes de los valores observados en el grupo control. A las 8 h del tratamiento (Fig. 35c) no encontramos modificaciones de

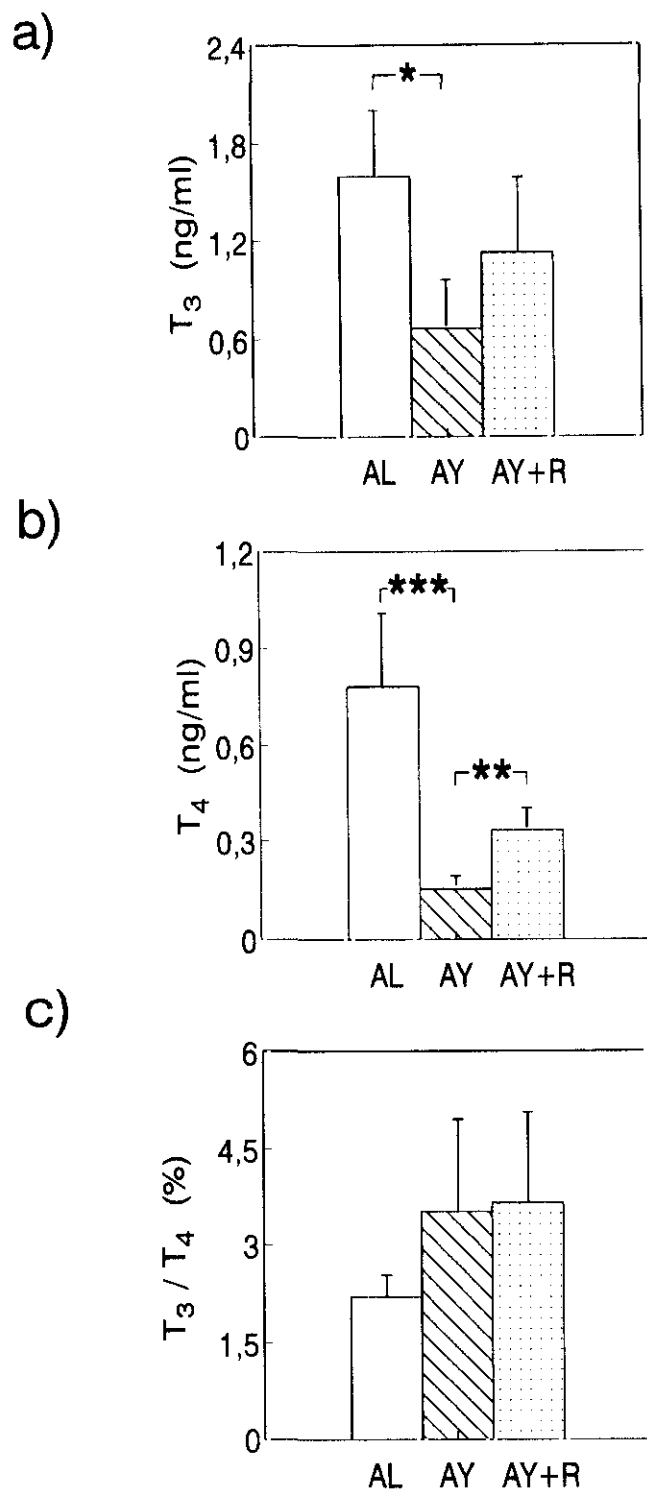


Figura 32. Niveles plasmáticos de a) T₃, b) T₄ y c) relación T₃/T₄ plasmática en *T. tinca* en animales que recibieron alimento diariamente (AL), sometidos a una semana de ayuno (AY) y tras una semana de ayuno más dos días de realimentación (AY+R). Los datos se representan como \bar{x} + e.e.m. (n=9-10/grupo). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,005.

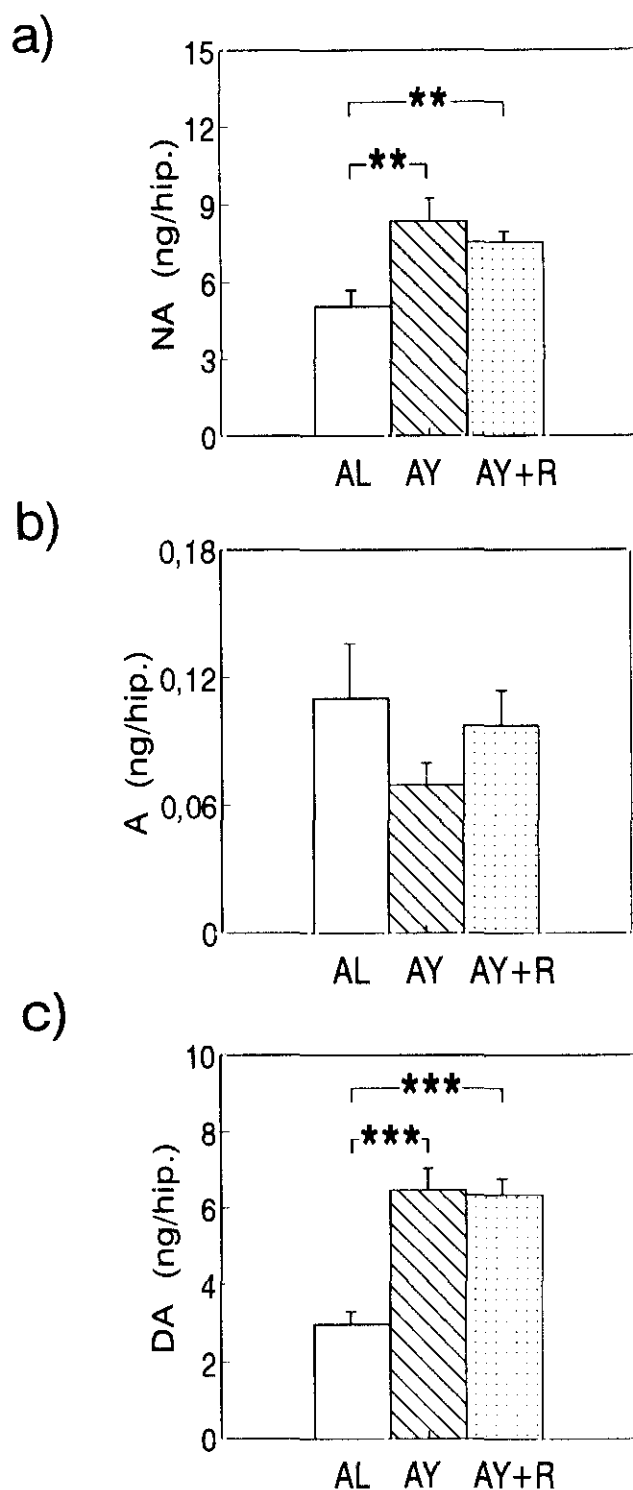


Figura 33. Contenido hipotalámico de catecolaminas: a) noradrenalina, b) adrenalina y c) dopamina, en *T. tinca* en animales que recibieron alimento diariamente (AL), sometidos a una semana de ayuno (AY) y tras una semana de ayuno más dos días de realimentación (AY+R). Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=9-10$ /grupo). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

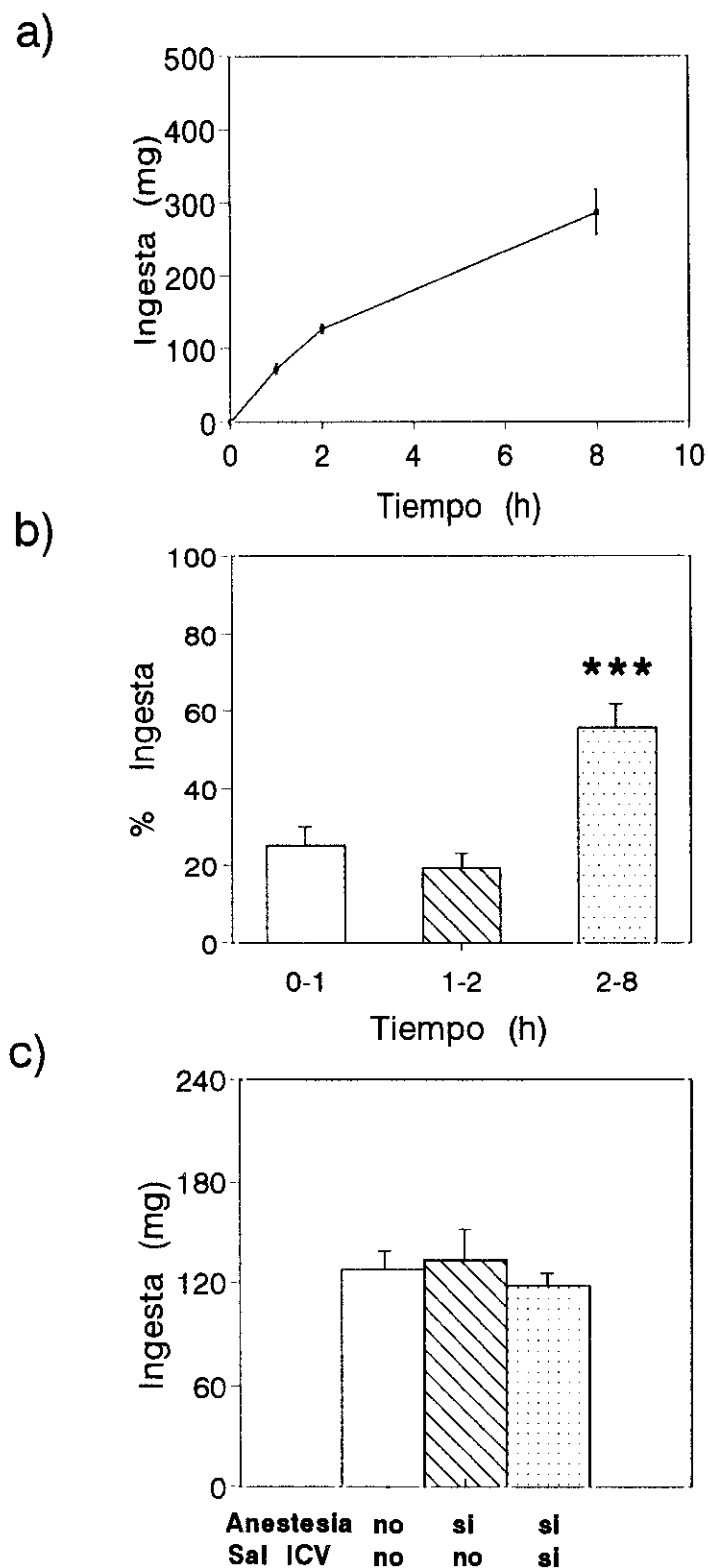


Figura 34. a) Ingesta acumulativa tras la 1, 2 y 8 h de recibir el alimento en *C. auratus*. Los datos se representan como $\bar{x} \pm e.e.m.$ ($n=9/\text{grupo}$). b) Contribución de cada intervalo sobre la ingesta total a las 8 h en *C. auratus*. c) Efecto del anestésico (MS-222, 1/10.000) y la inyección ICV de solución salina ($1 \mu\text{l}$) sobre la ingestión de alimento a las 2 h en *C. auratus*. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=7/\text{grupo}$). *** $p < 0,005$.

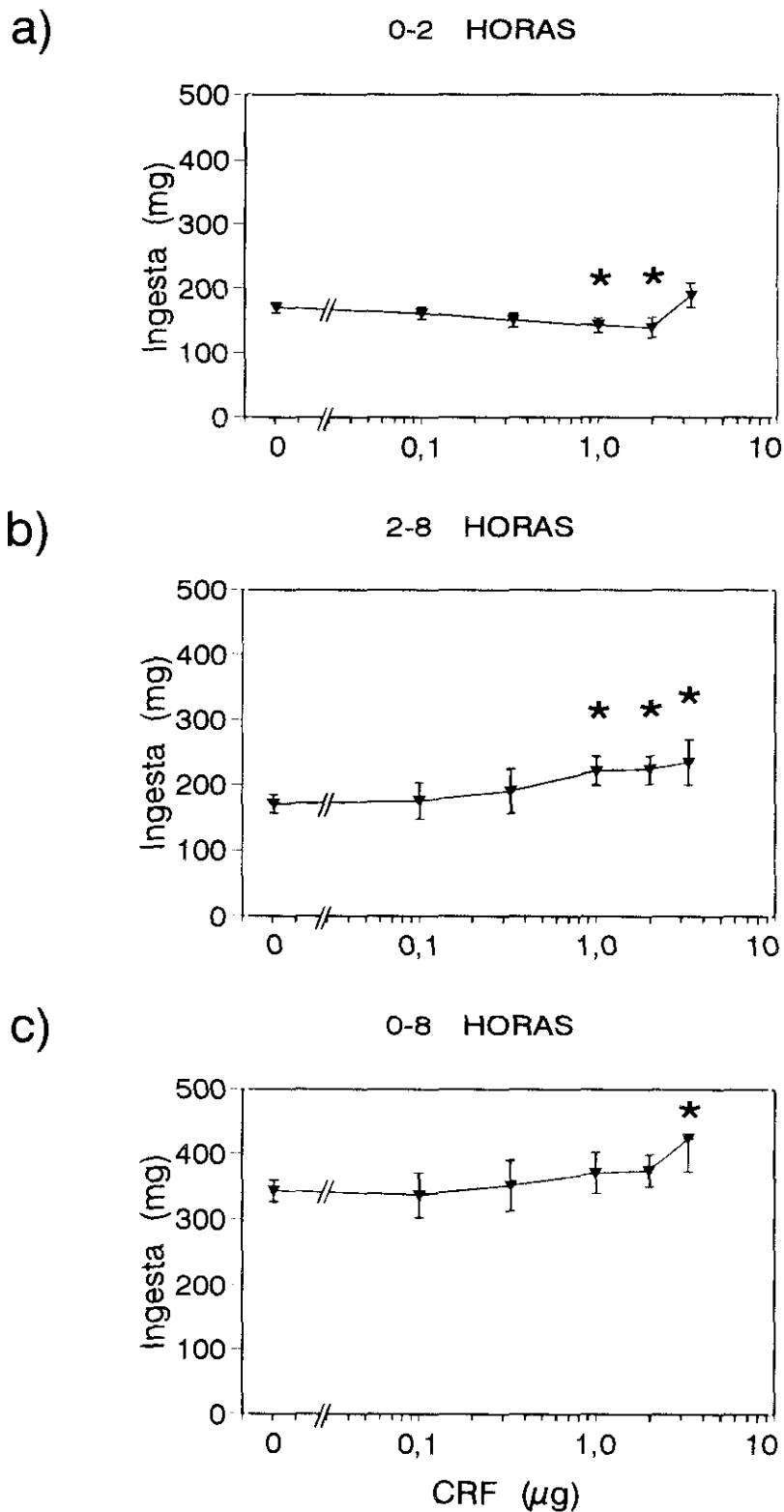


Figura 35. Efecto de la administración ICV del CRF sobre la ingesta en *C. auratus* durante los intervalos a) 0-2, b) 2-8 y c) 0-8 h. Controles (n=18), CRF: 0,1 (n=9), 0,33 (n=9), 1 (n=18), 2 (n=9) y 3,33 (n=9) μg . El eje "x" representa dosis absolutas de CRF (μg) en las tres gráficas. Los datos se representan como $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$ * $p < 0,05$ respecto a los controles.

la ingesta acumulativa con ninguna de las dosis utilizadas, a excepción de la dosis más alta (3,33 μg) que produce un aumento de la alimentación ($p < 0,05$).

Cuando disminuimos el tiempo de valoración de la ingesta a 1 h, la reducción producida por la dosis de 2 μg a las 2 h no se observa (Fig. 36a).

En lo que se refiere a la administración IP de CRF (Fig. 36b) no hemos encontrado diferencias significativas en la ingesta ni a las 2, ni a las 8 h del tratamiento.

4.3. Interacción CRF-alimentación-hormonas tiroideas.

a) Efecto del CRF sobre la ingesta, glucosa y HT en *C. auratus* y *T. tinca*.

En ambas especies, podemos observar una reducción de la ingesta (Figs 37a y 39a) por el CRF, sin modificaciones en los niveles plasmáticos de glucosa (Figs 37b y 39b).

Los datos relacionados con el contenido tiroideo de HT, así como las correspondientes relaciones T_3/T_4 a las 8 h, se presentan en las Figs 38 (*C. auratus*) y 40 (*T. tinca*). En *C. auratus* se observa una disminución ($p < 0,05$) de la fracción libre de T_3 (FT_3) (Fig. 38a), encontrándose un efecto similar en las fracciones libre y unida de T_3 en *T. tinca* (Fig. 40a). El contenido tiroideo de T_4 y las relaciones T_3/T_4 libre y unida no experimentaron modificaciones por el CRF en ninguna de las dos especies.

b) Efectos aislados del CRF y la alimentación.

Los efectos independientes del CRF y la alimentación sobre la glucosa plasmática se muestran en la Fig. 41. Los niveles circulantes de glucosa son similares en el grupo tratado con salino y el inyectado con CRF, y 3 veces más bajos que en el grupo realimentado ($p < 0,005$).

En cuanto al contenido tiroideo de las fracciones libre y unida de HT (Fig. 42), podemos observar una disminución de FT_3 (Fig. 42a) y un aumento de FT_4 (Fig. 42b) ($p < 0,05$) en el grupo tratado con CRF respecto a los inyectados con salino. Esto se ve reflejado en una reducción de la relación FT_3/FT_4 ($p < 0,005$) en el grupo tratado con CRF (Fig. 42c). Un comportamiento similar se observa en el grupo realimentado respecto a su grupo control (salino) en ayuno. La fracción unida de T_3 (BT_3) no presenta diferencias significativas entre ninguno de los tres grupos estudiados (Fig. 42a). En lo referente a la BT_4 , se observa un aumento ($p < 0,05$) inducido por el CRF (Fig. 42b). Por último, los valores de la relación BT_3/BT_4 son similares en los grupos en ayuno e inferiores a los observados en el grupo realimentado (Fig. 42c).

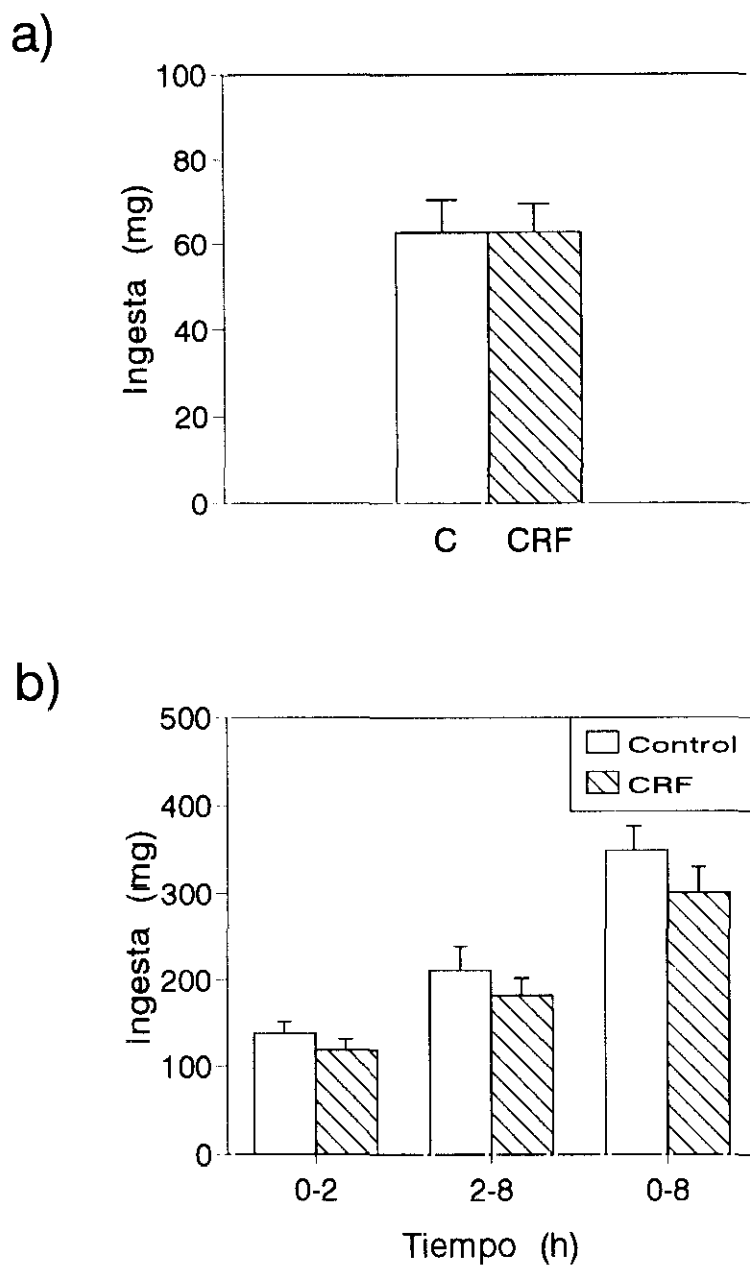


Figura 36. a) Efecto de la administración ICV de CRF ($1 \mu\text{g}$) sobre la ingesta en *C. auratus* durante el intervalo 0-1 h ($n=8/\text{grupo}$). b) Efecto de la administración IP de CRF ($0,1 \mu\text{g/g}$ peso corporal) sobre la ingesta en *C. auratus* durante los intervalos 0-2, 2-8 y 0-8 h, ($n=9/\text{grupo}$). Los datos se representan como $\bar{x}+e.e.m.$

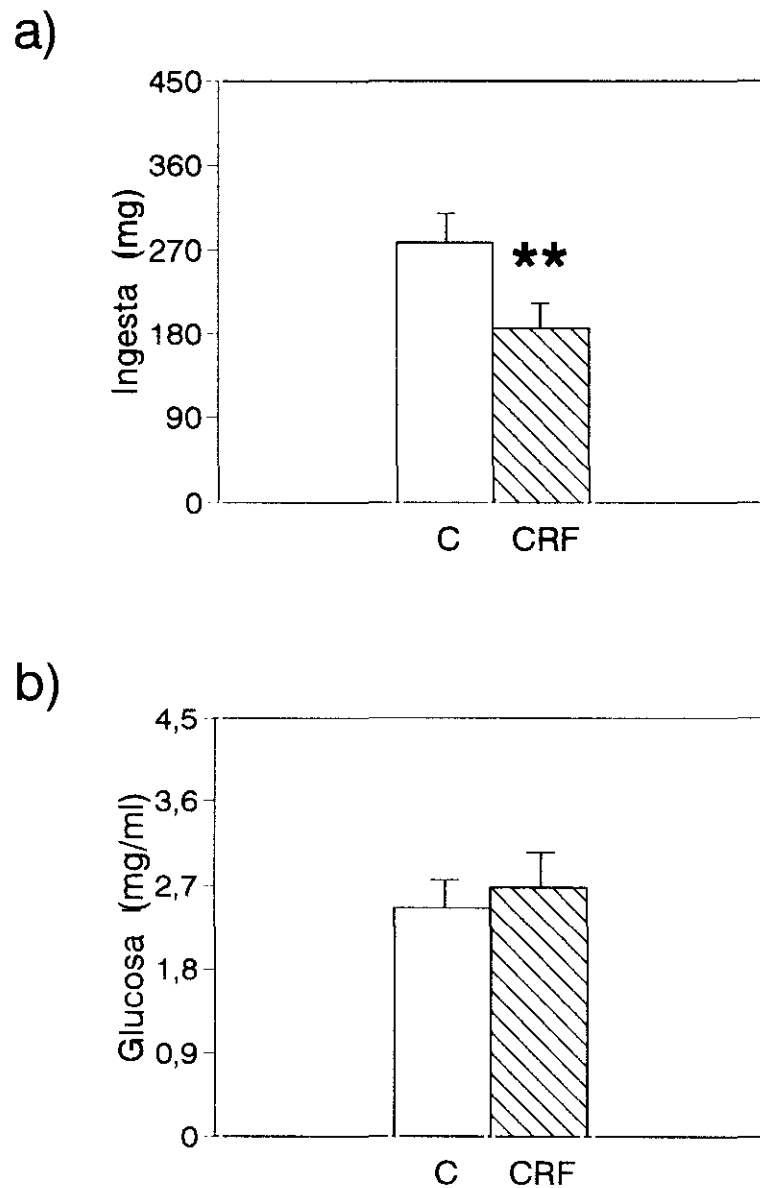


Figura 37. Efecto de la administración ICV de CRF ($2 \mu\text{g}$) en *C. auratus* sobre a) la ingesta a las 2 h de las inyecciones y b) los niveles plasmáticos de glucosa a las 8 h de la inyecciones. C, control=salino + alimentación; CRF=CRF + alimentación. Los datos se representan como $\bar{x} + \text{e.e.m.}$ ($n=8/\text{grupo}$). ** $p < 0,01$.

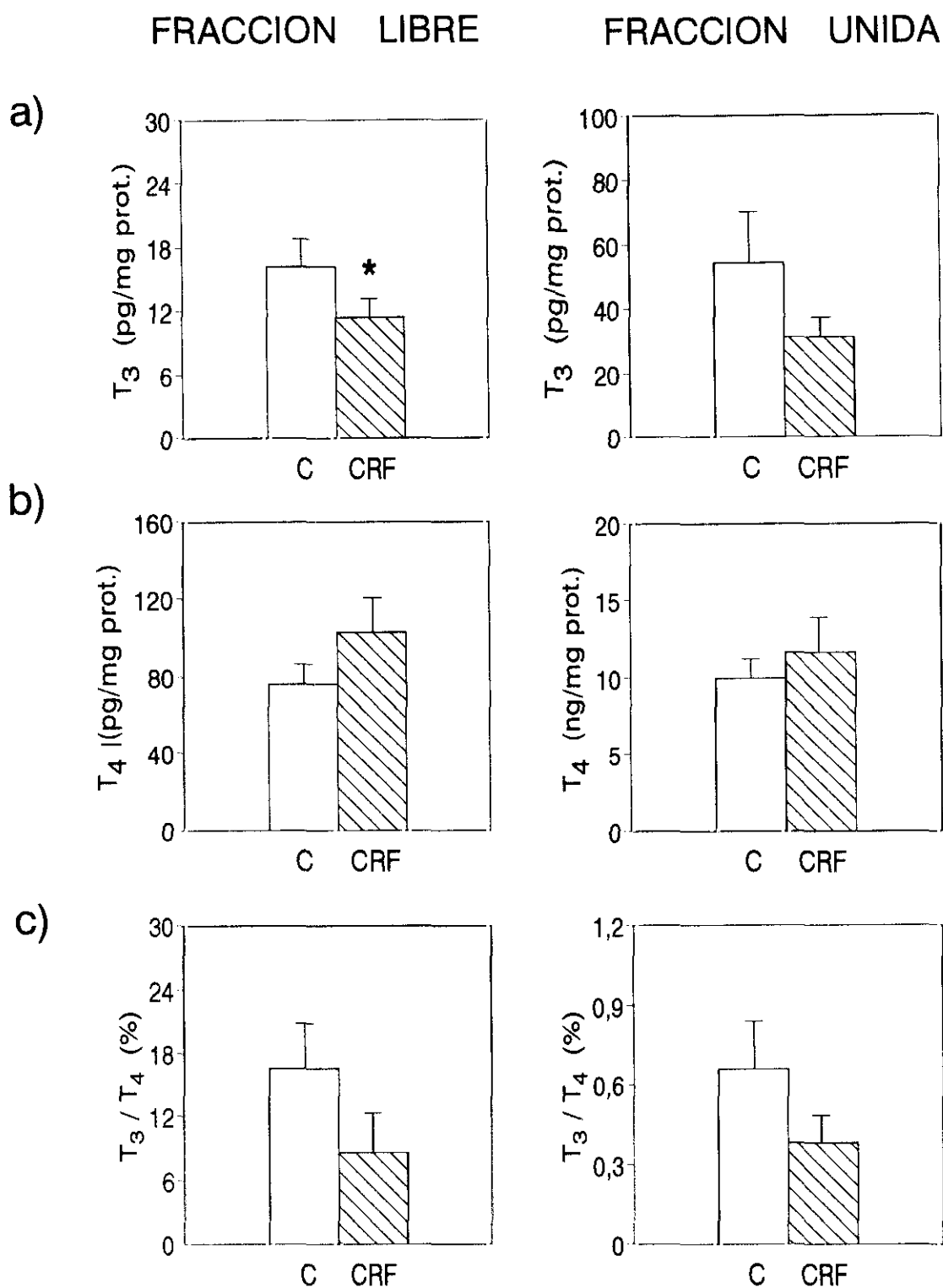


Figura 38. Efecto de la administración ICV de CRF (2 μ g) sobre las fracciones libre y unida de **a)** T_3 , **b)** T_4 y **c)** las correspondientes relaciones T_3/T_4 tiroideas en *C. auratus* a las 8 h de las inyecciones. C, control=salino + alimentación; CRF=CRF + alimentación. Los datos se representan como \bar{x} +e.e.m. (n=8/grupo). * $p < 0,05$.

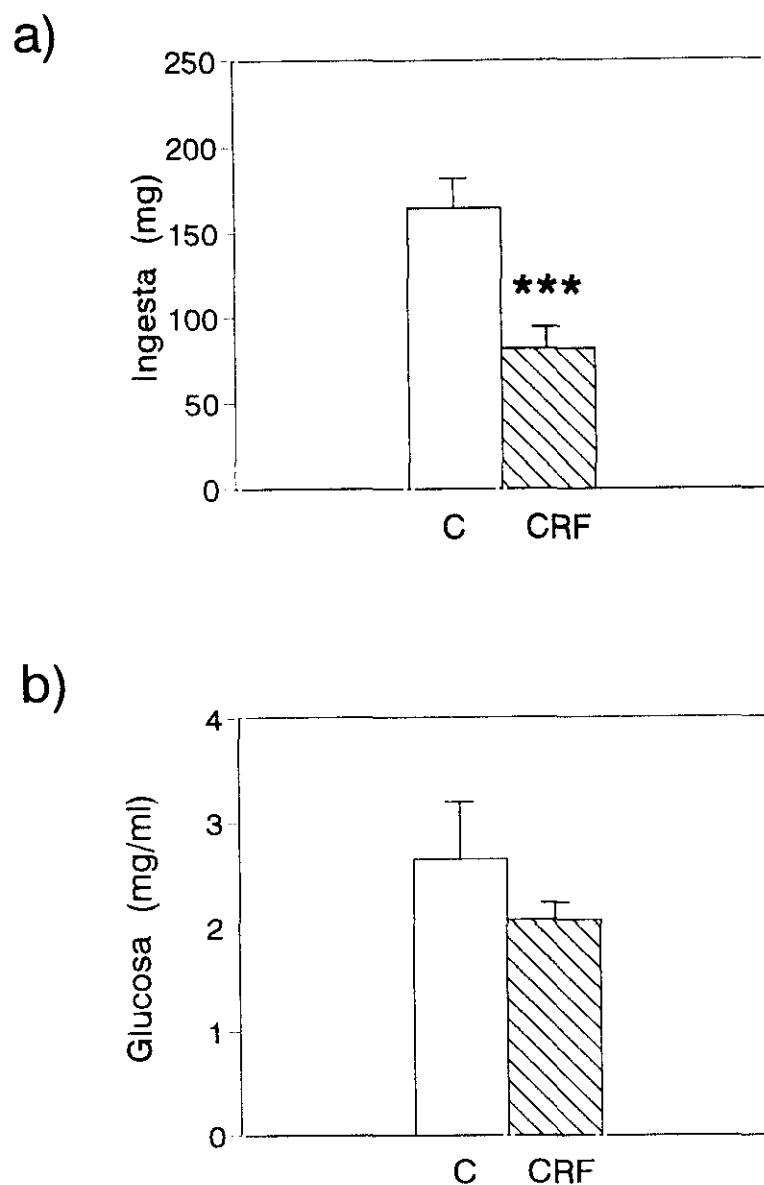


Figura 39. Efecto de la administración ICV de CRF ($1 \mu\text{g}$) en *T. tinca* sobre a) la ingesta y b) los niveles plasmáticos de glucosa a las 8 h de las inyecciones. C, control=salino + alimentación; CRF=CRF + alimentación. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=6/\text{grupo}$). *** $p < 0,005$.

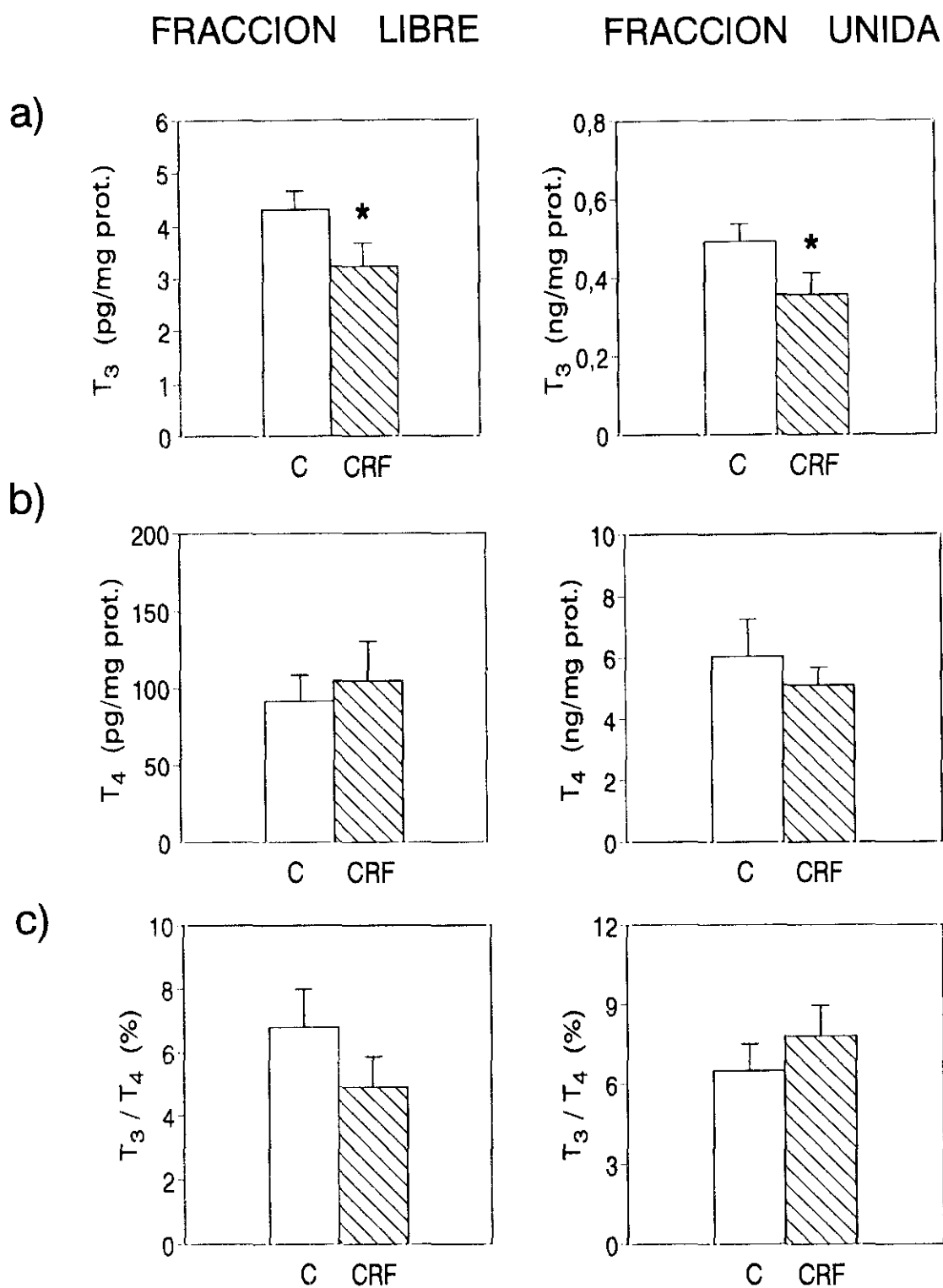


Figura 40. Efecto de la administración ICV de CRF ($1 \mu\text{g}$) sobre las fracciones libre y unida de a) T_3 , b) T_4 y c) las correspondientes relaciones T_3/T_4 tiroideas en *T. tinca* a las 8 h de las inyecciones. C, control=salino + alimentación; CRF=CRF + alimentación. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=6/\text{grupo}$). * $p < 0,05$.

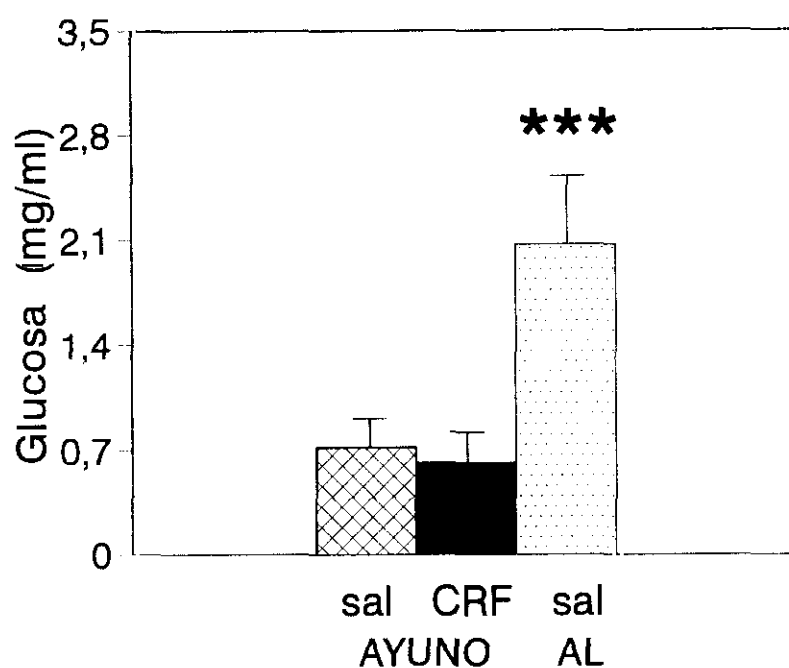


Figura 41. Niveles plasmáticos de glucosa en *C. auratus* a las 8 h de las inyecciones ICV. sal+AYUNO, animales inyectados con salino y sin recibir comida; CRF+AYUNO, inyectados con CRF (2 μ g) y sin comida tras las inyecciones; sal+AL, inyectados con salino y recibieron la ración diaria de alimento. Los datos se representan como \bar{x} +e.e.m. (n=11/grupo). *** p<0,005.

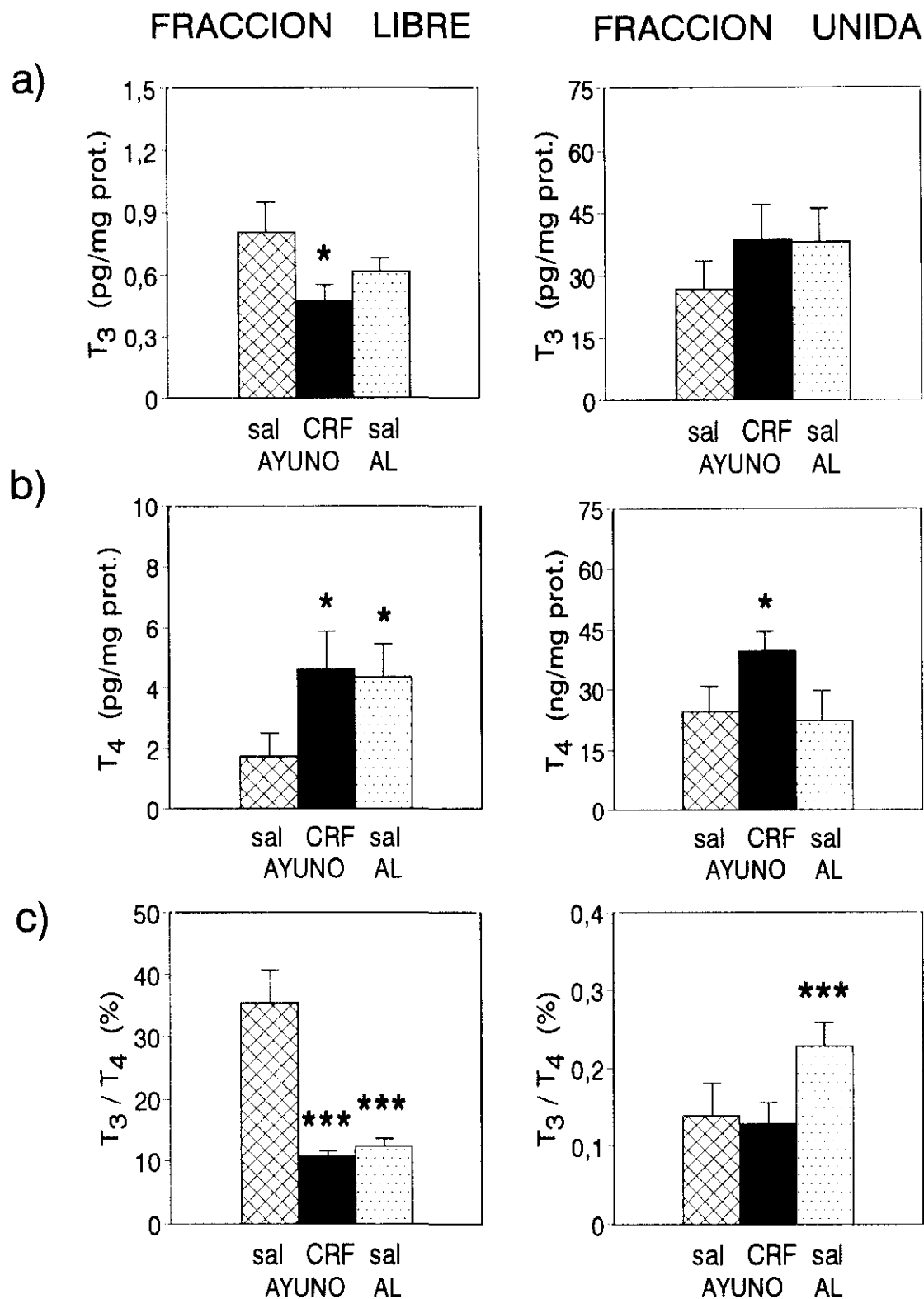


Figura 42. Contenido tiroideo de las fracciones libre y unida de a) T₃, b) T₄ y c) las correspondientes relaciones T₃/T₄ tiroideas en *C. auratus* a las 8 h de las inyecciones ICV. sal+AYUNO, animales inyectados con salino y sin recibir comida; CRF+AYUNO, inyectados con CRF (2 μg) y sin comida tras las inyecciones; sal+AL, inyectados con salino y recibieron la ración diaria de alimento. Los datos se representan como \bar{x} +e.e.m. (n=11/grupo). * p<0,05; *** p<0,005.

Los niveles circulantes de HT se representan en la Fig. 43, observándose una reducción de los niveles plasmáticos de T_3 (Fig. 43a, $p < 0,01$) y T_4 (Fig. 43b, $p < 0,05$) en los animales sometidos a dos días de ayuno respecto a los realimentados, sin modificaciones de la relación T_3/T_4 plasmática (Fig. 43c).

El contenido hipotalámico de catecolaminas (NA, A y DA) en estos mismos grupos experimentales se presenta en la Fig. 44. El contenido de las tres catecolaminas es similar en los grupos sometidos a dos días de ayuno, con independencia de si eran inyectados con salino o CRF, e inferiores significativamente (NA, $p < 0,05$; DA, $p < 0,005$) respecto al grupo realimentado.

4.4. Efecto del ayuno sobre las catecolaminas en hipotálamo.

En el análisis de las modificaciones del contenido hipotalámico de catecolaminas inducidas por el ayuno y la realimentación, podemos observar una reducción ($p < 0,05$) de la NA (Fig. 45a) y un aumento ($p < 0,05$) de su metabolito, el HMPG, (Fig. 45b), de manera que la relación HMPG/NA aumenta con el ayuno (Fig. 45c). En todos los casos anteriores, la realimentación restablece valores similares a los observados en los animales alimentados diariamente.

El ayuno también produce una reducción en la DA ($p < 0,05$), aunque en este caso el descenso se mantiene tras la realimentación (Fig. 47a). El contenido de A (Fig. 46) y DOPAC (Fig. 47b), así como la relación DOPAC/DA (Fig. 47c) no se vieron afectados por dichos tratamientos (ayuno y realimentación).

4.5. Efecto del antagonista específico del CRF, α -Helical CRF_[9-41].

Tanto la reducción de la ingesta (Fig. 48a) como el incremento de los niveles plasmáticos de cortisol (Fig. 48c) inducidos por el CRF fueron revertidos parcialmente por el antagonista α -H CRF_[9-41]. Los niveles de glucosa plasmática no se modificaron significativamente por la administración de CRF, ni de su antagonista de forma aislada, ni de ambos de forma combinada (Fig. 48b).

El CRF provocó una disminución ($p < 0,01$) del contenido hipotalámico de NA (Fig. 49a) y DA (Fig. 49c), efectos que fueron también bloqueados por el pretratamiento con el antagonista. No se observaron diferencias significativas en los niveles de A entre ninguno de los grupos estudiados (Fig. 49b).

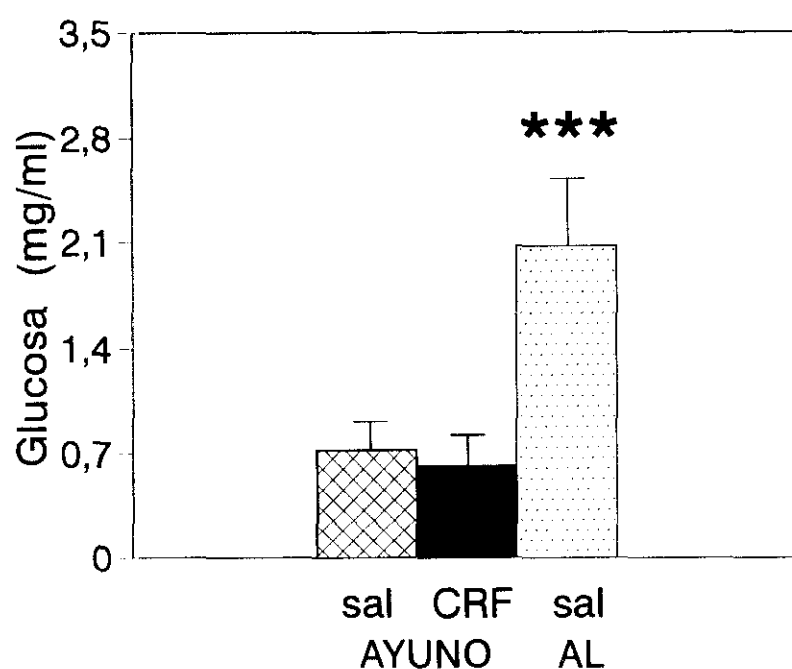


Figura 43. Niveles plasmáticos de a) T_3 , b) T_4 y c) relación T_3/T_4 plasmática en *C. auratus* a las 8 h de las inyecciones ICV. sal+AYUNO, animales inyectados con salino y sin recibir comida; CRF+AYUNO, inyectados con CRF ($2 \mu\text{g}$) y sin comida tras las inyecciones; sal+AL, inyectados con salino y recibieron la ración diaria de alimento. Los datos se representan como $\bar{x} + \text{e.e.m.}$ ($n=11/\text{grupo}$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

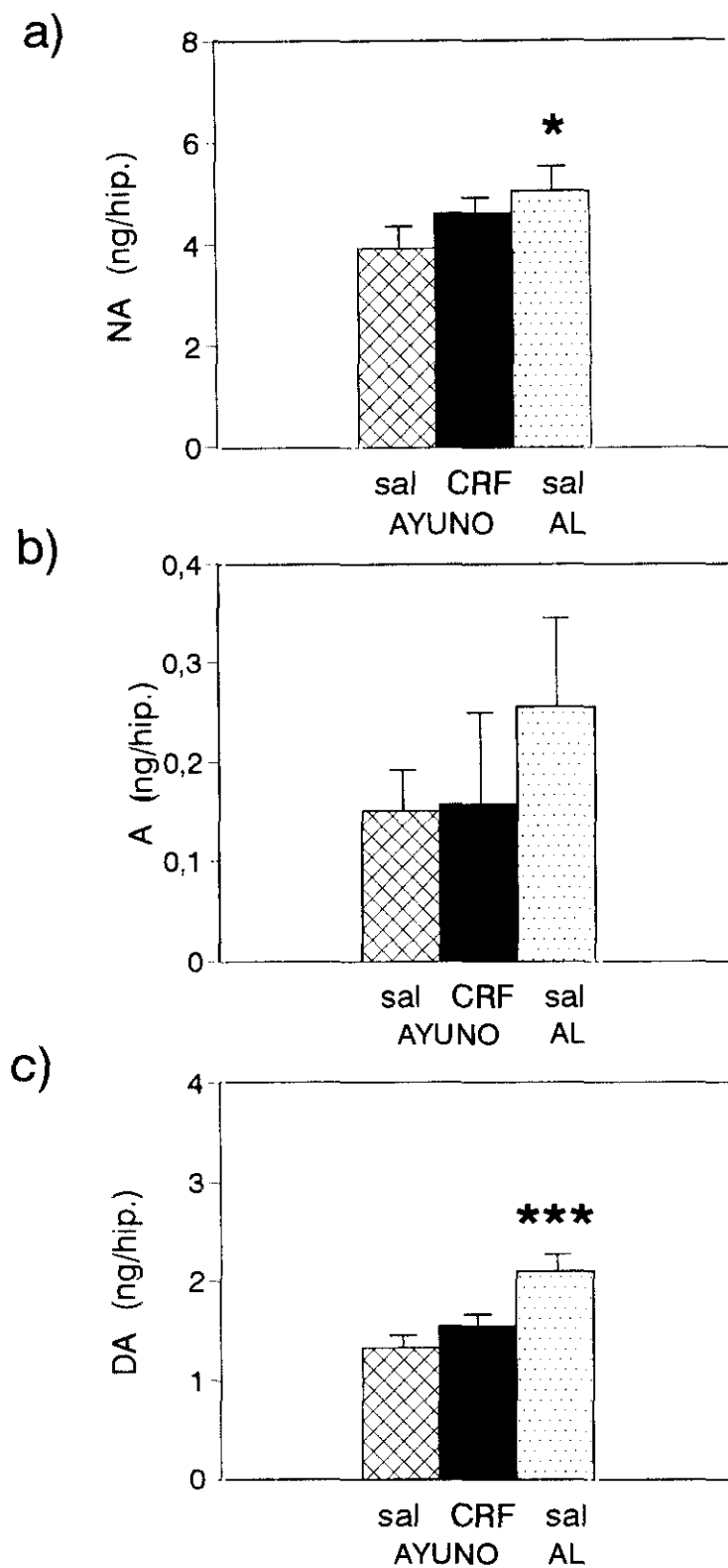


Figura 44. Contenido hipotalámico de catecolaminas: a) noradrenalina, b) adrenalina y c) dopamina, en *C. auratus* a las 8 h de las inyecciones ICV. sal+AYUNO, animales inyectados con salino y sin recibir comida; CRF+AYUNO, inyectados con CRF (2 μ g) y sin comida tras las inyecciones; sal+AL, inyectados con salino y recibieron la ración diaria de alimento. Los datos se representan como \bar{x} +e.e.m. (n=11/grupo). * p<0,05; *** p<0,005.

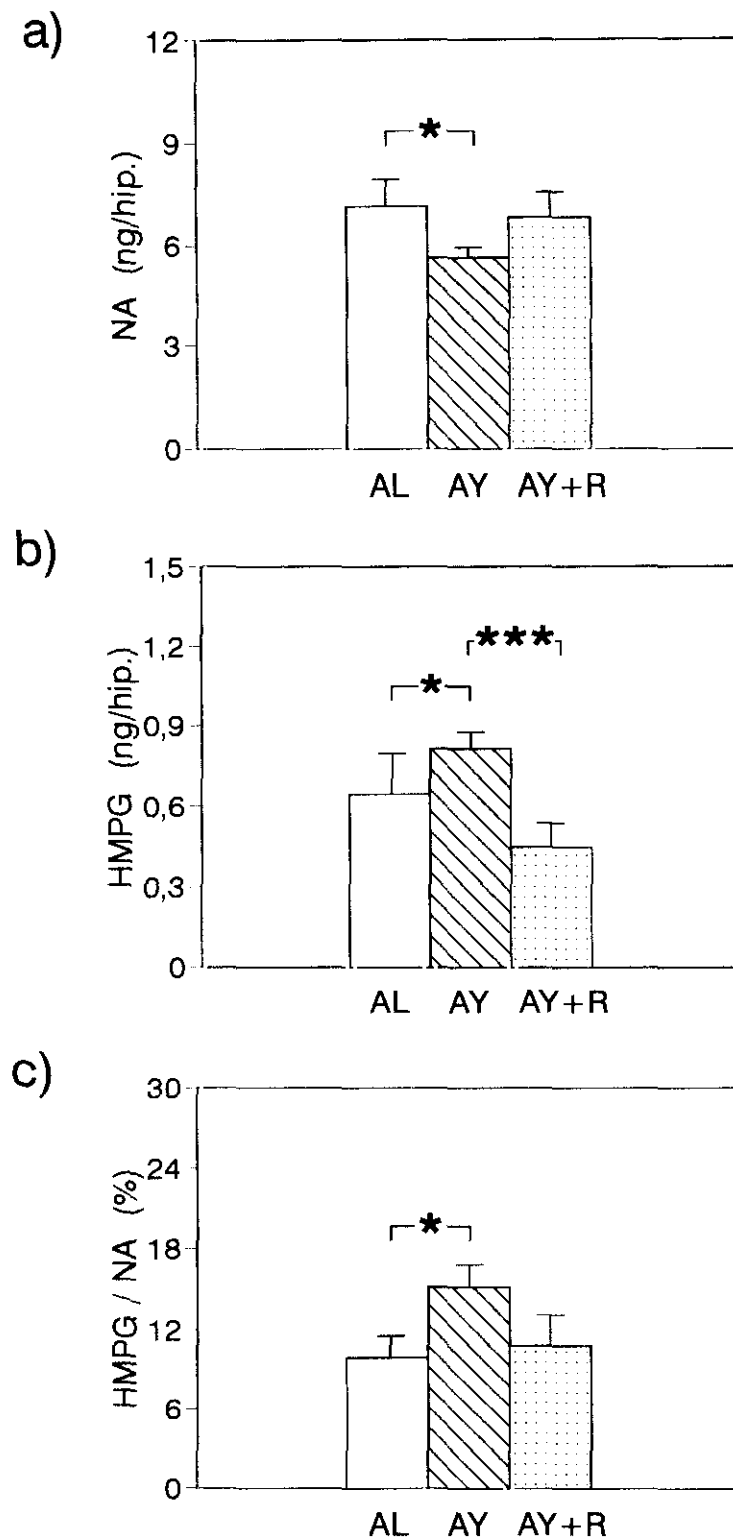


Figura 45. Contenido hipotalámico de a) noradrenalina, b) HMPG y c) relación HMPG/NA, en *C. auratus* en animales que recibieron alimento diariamente (AL); sometidos a una semana de ayuno (AY) y tras una semana de ayuno más un día de realimentación (AY+R). Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ (n=11/grupo). * p < 0,05; *** p < 0,005.

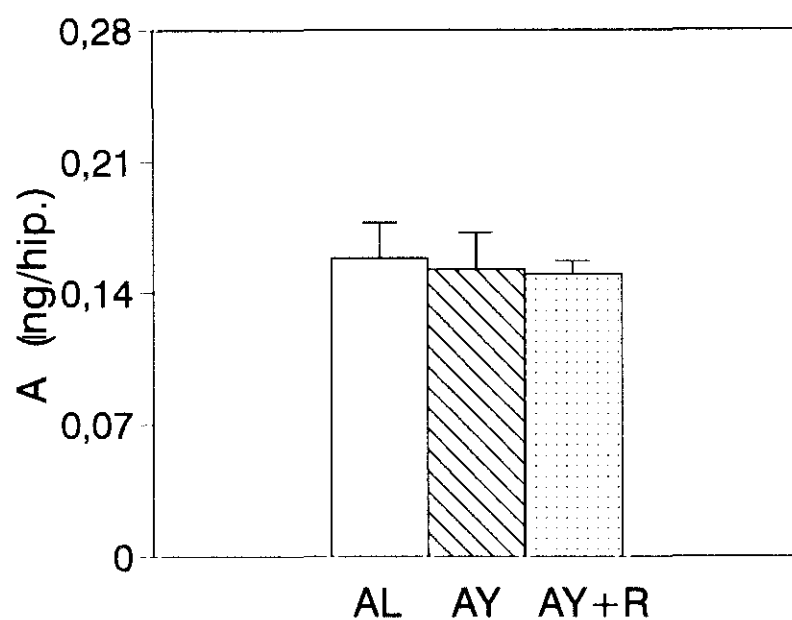


Figura 46. Contenido hipotalámico de adrenalina en *C. auratus* en animales que recibieron alimento diariamente (AL); sometidos a una semana de ayuno (AY) y tras una semana de ayuno más un día de realimentación (AY+R). Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n = 11/\text{grupo}$).

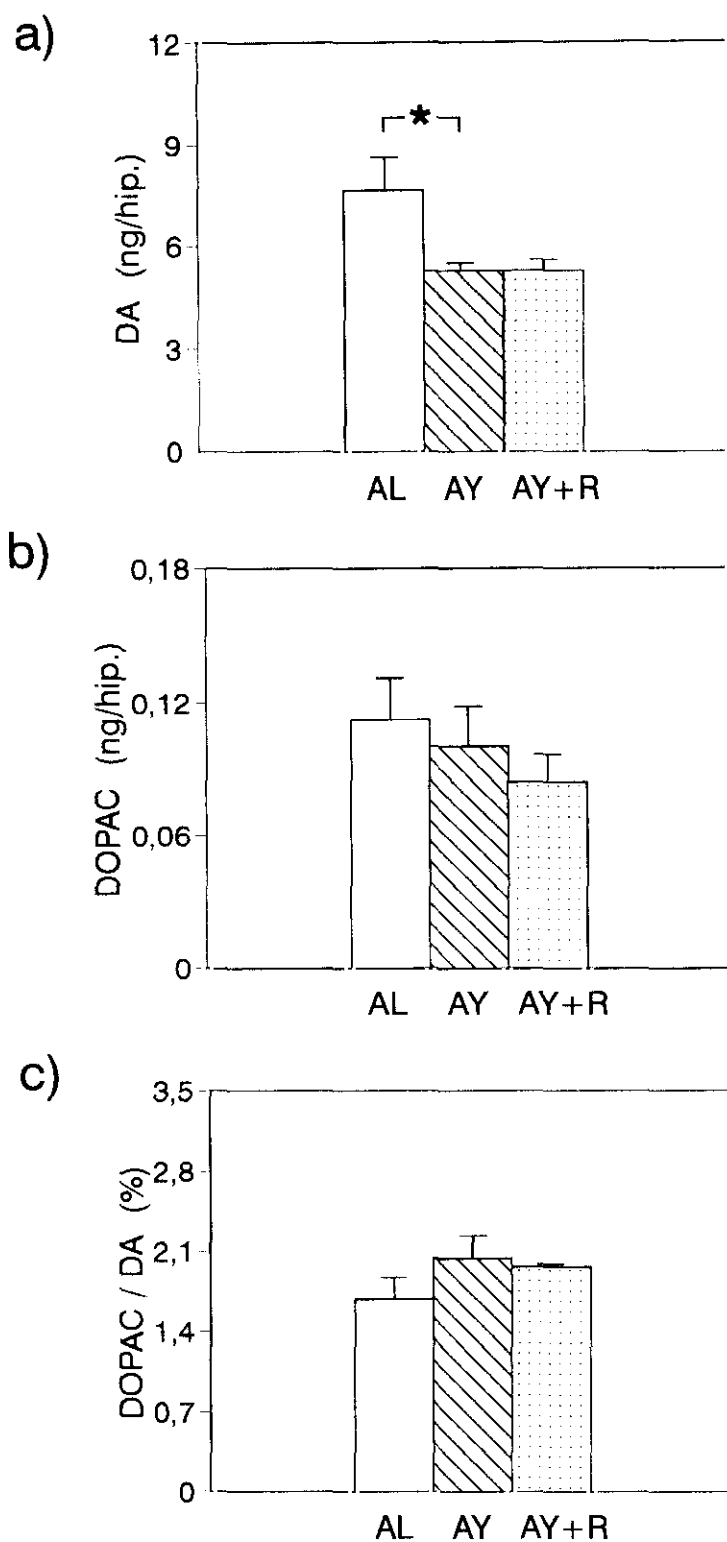


Figura 47. Contenido hipotalámico de a) dopamina, b) DOPAC y c) relación DOPAC/DA, en *C. auratus* en animales que recibieron alimento diariamente (AL); sometidos a una semana de ayuno (AY) y tras una semana de ayuno más un día de realimentación (AY+R). Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=11/\text{grupo}$). * $p < 0,05$.

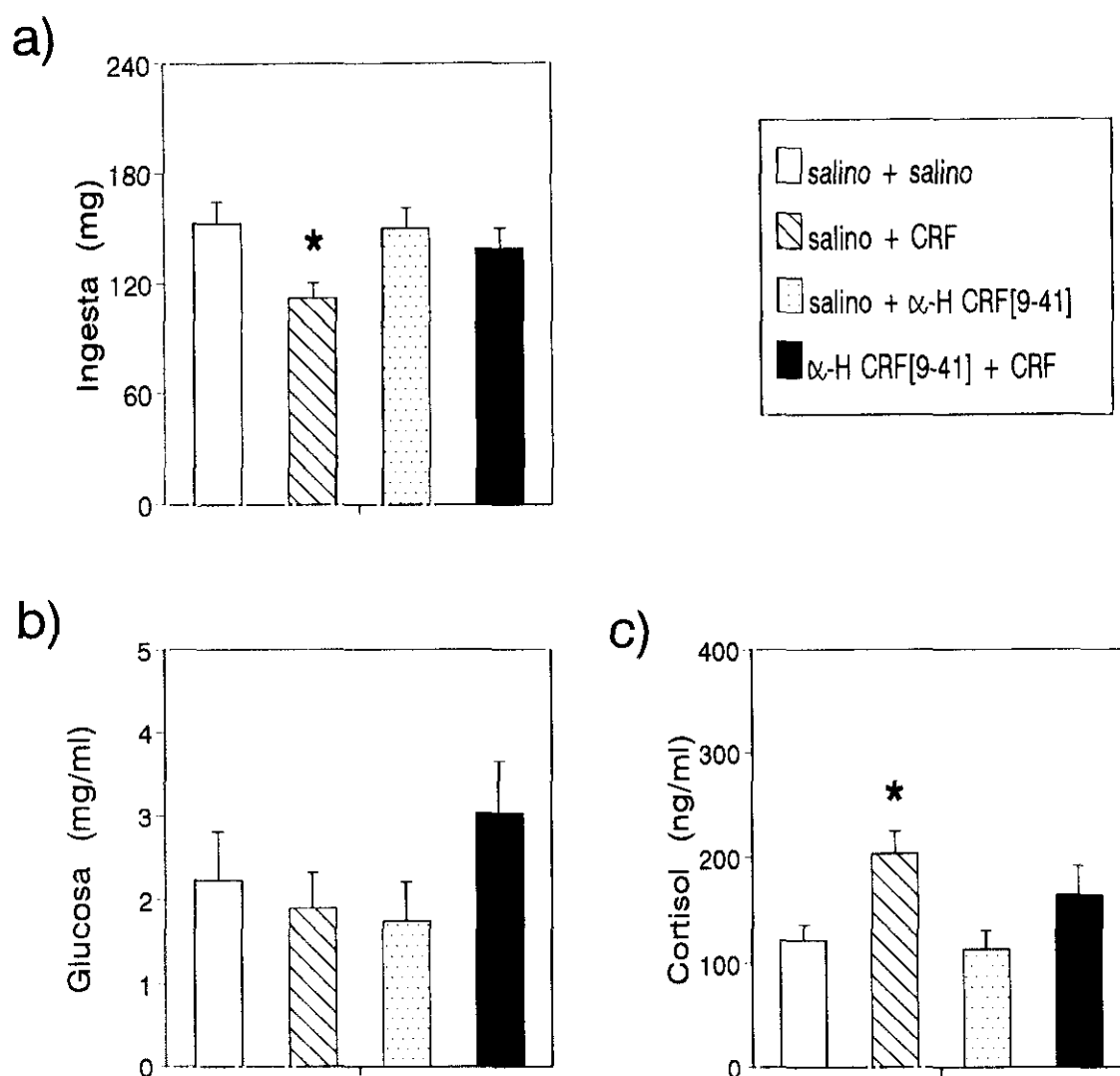


Figura 48. Efecto de la administración ICV del CRF (1 µg) y su antagonista, el α -Helical CRF_[9-41], (10 µg) sobre a) la ingesta y b) los niveles plasmáticos de glucosa y c) cortisol en *C. auratus* a las 2 h. Los datos se representan como \bar{x} +e.e.m. (n=9/grupo). * p < 0,05 respecto al grupo control (doble inyección de solución salina).

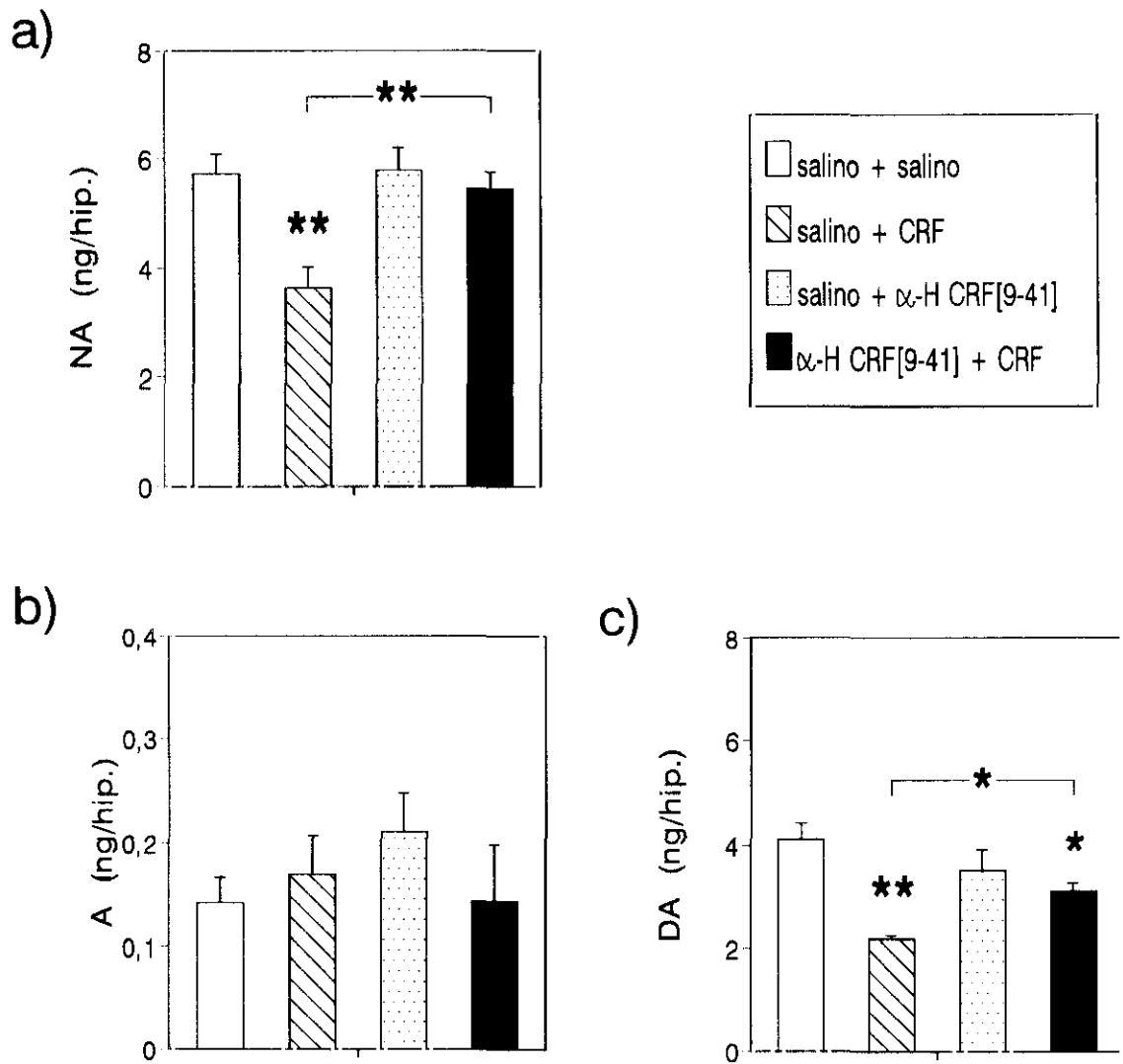


Figura 49. Efecto de la administración ICV del CRF (1 μ g) y su antagonista, el α -Helical CRF_[9-41], (10 μ g) sobre el contenido hipotalámico de a) noradrenalina, b) adrenalina y c) dopamina en *C. auratus* a las 2 h. Los datos se representan como \bar{x} +e.e.m. (n=9/grupo). * p<0,05; ** p<0,01 respecto al grupo control (doble inyección de solución salina).

La administración ICV del α -H CRF₉₋₄₁ no modificó por sí sólo ninguno de los parámetros analizados en el presente estudio (Figs 48 y 49).

4.6. Cortisol como mediador del efecto del CRF sobre la ingesta.

En primer lugar, intentamos abordar esta cuestión mediante la inhibición de la síntesis de corticosteroides con metirapona (Fig. 50). La metirapona, por un lado, mostró un efecto propio sobre la ingesta, reduciéndola ($p < 0,05$) (Fig. 50a), y por otro, a la dosis utilizada, no fue capaz de revertir el aumento inducido por el CRF de los niveles plasmáticos de cortisol ($p < 0,01$) (Fig. 50b). Todo ello nos llevó a desestimar esta aproximación experimental, realizando una serie de pruebas indirectas alternativas.

En la Fig. 51 se han representado los resultados obtenidos en relación a la administración IP de CRF y cortisol, observándose un incremento del cortisol plasmático ($p < 0,005$) después de ambos tratamientos, sin modificaciones de la ingestión de alimento.

4.7. Control catecolaminérgico del efecto del CRF sobre la ingesta.

a) α -Adrenérgico.

La Fig. 52 representa los datos de la ingesta relacionados con la mediación α -adrenérgica del efecto anorético del CRF (ANOVA, $p < 0005$). El tratamiento con prazosín (antagonista α_1), antagoniza el efecto del CRF. De los agonistas y antagonistas adrenérgicos utilizados, únicamente tiene efecto por sí sólo el antagonista α_2 (yohimbina), que reduce la ingesta ($p < 0,05$), siendo dicho efecto más acusado en el grupo tratado con la combinación de yohimbina + CRF ($p < 0,01$).

El efecto de los agonistas y antagonistas α -adrenérgicos, de forma aislada o la combinación de los antagonistas con el CRF, sobre el contenido de catecolaminas en el hipotálamo se muestra en las Figs 53, 54 y 55. Podemos observar una reducción de la NA en el grupo inyectado con CRF, que además es revertida por la yohimbina (Fig. 53a). El tratamiento conjunto de yohimbina y CRF produce un aumento en el HMPG ($p < 0,05$) respecto al grupo control y al tratado sólo con CRF (Fig. 53b), no observándose modificaciones en la relación HMPG/NA (Fig. 53c). Tampoco encontramos diferencias significativas en el contenido de A (Fig. 54) y DA, ni en su metabolismo (Fig. 55).

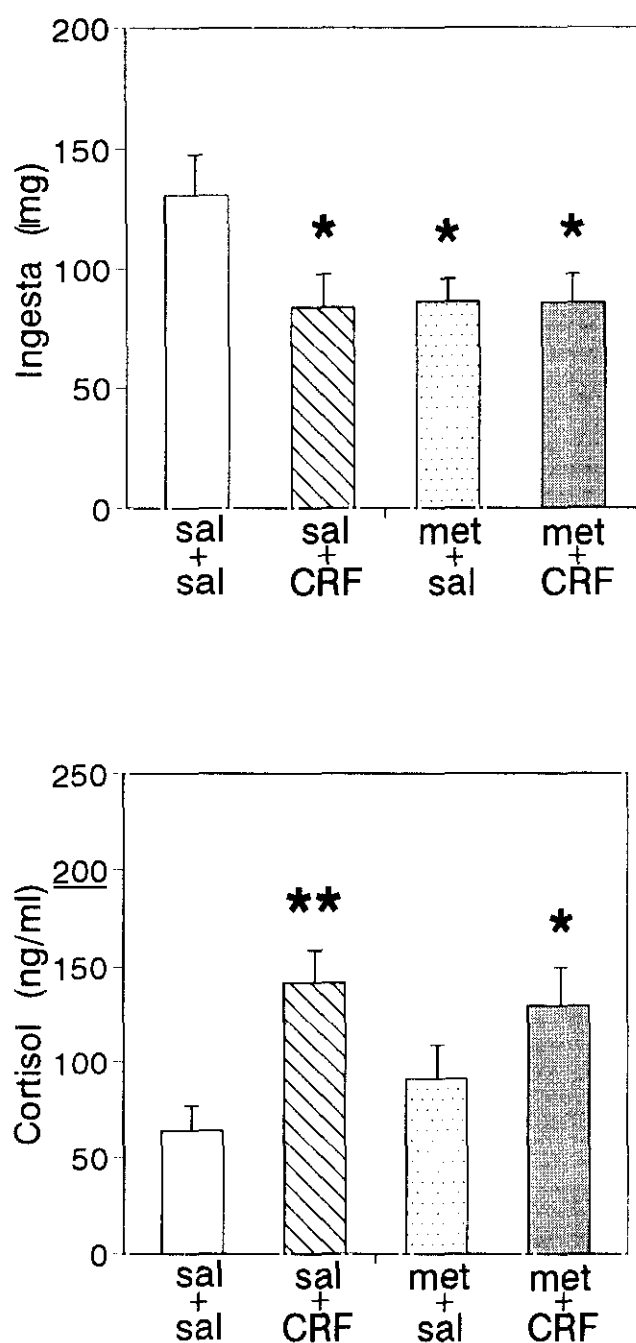


Figura 50. Efecto de la administración IP de metirapona (met, inhibidor de la síntesis de corticosteroides, 60 $\mu\text{g/g}$ peso corporal) sólo o en combinación con la administración ICV del CRF (1 μg) sobre a) la ingesta y b) los niveles plasmáticos de cortisol en *C. auratus* a las 2 h de la última inyección. Los datos se representan como $\bar{x} + \text{e.e.m.}$ (n=10/grupo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto al grupo control (doble inyección de solución salina).

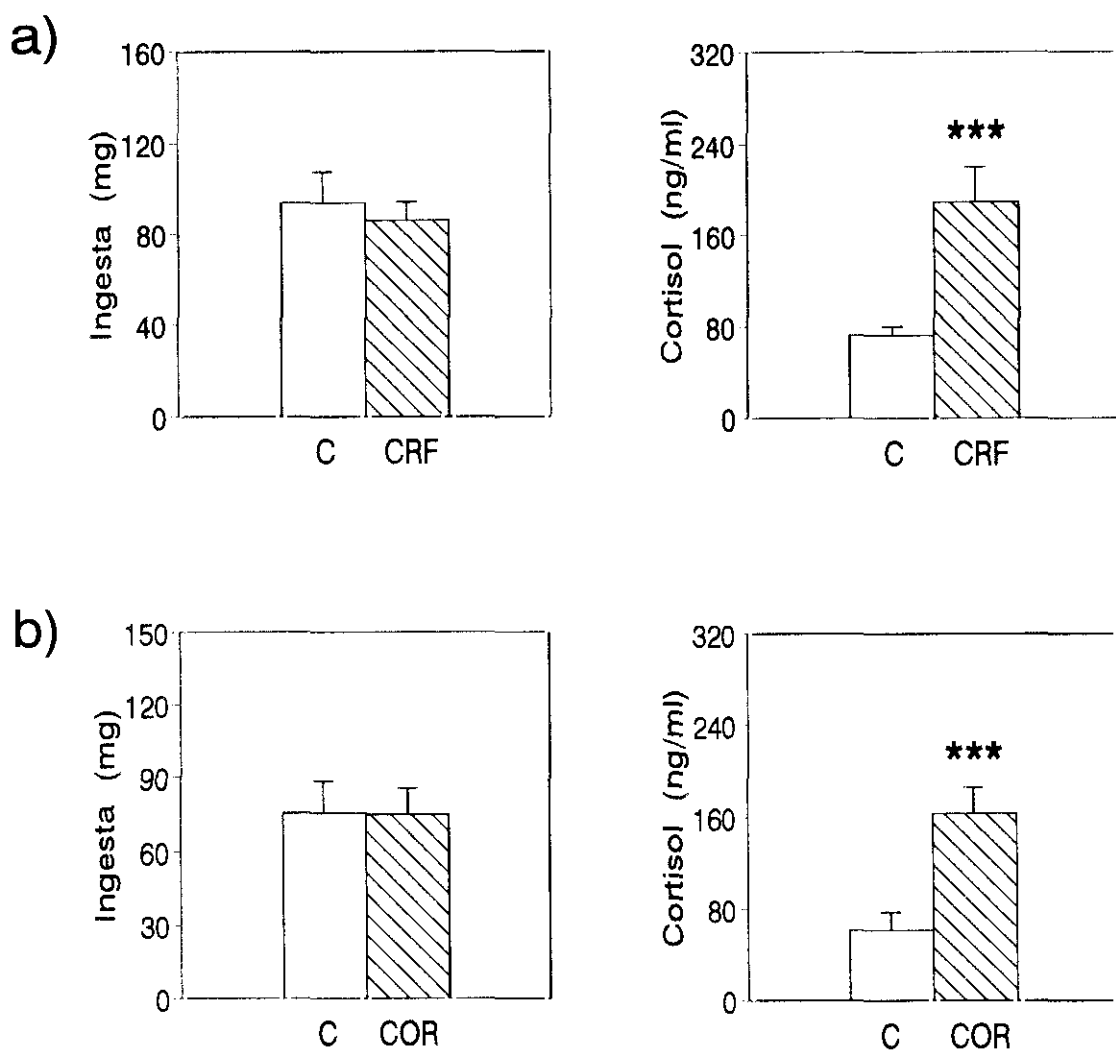


Figura 51. Efecto de la administración IP de a) CRF ($0,1 \mu\text{g/g}$ peso corporal) y b) cortisol (COR, $10 \mu\text{g/g}$ peso corporal) sobre la ingestión de alimento y los niveles plasmáticos de cortisol en *C. auratus* a las 2 h. Los datos se representan como $\bar{x} + \text{e.e.m.}$ ($n=9/\text{grupo}$). *** $p < 0,005$.

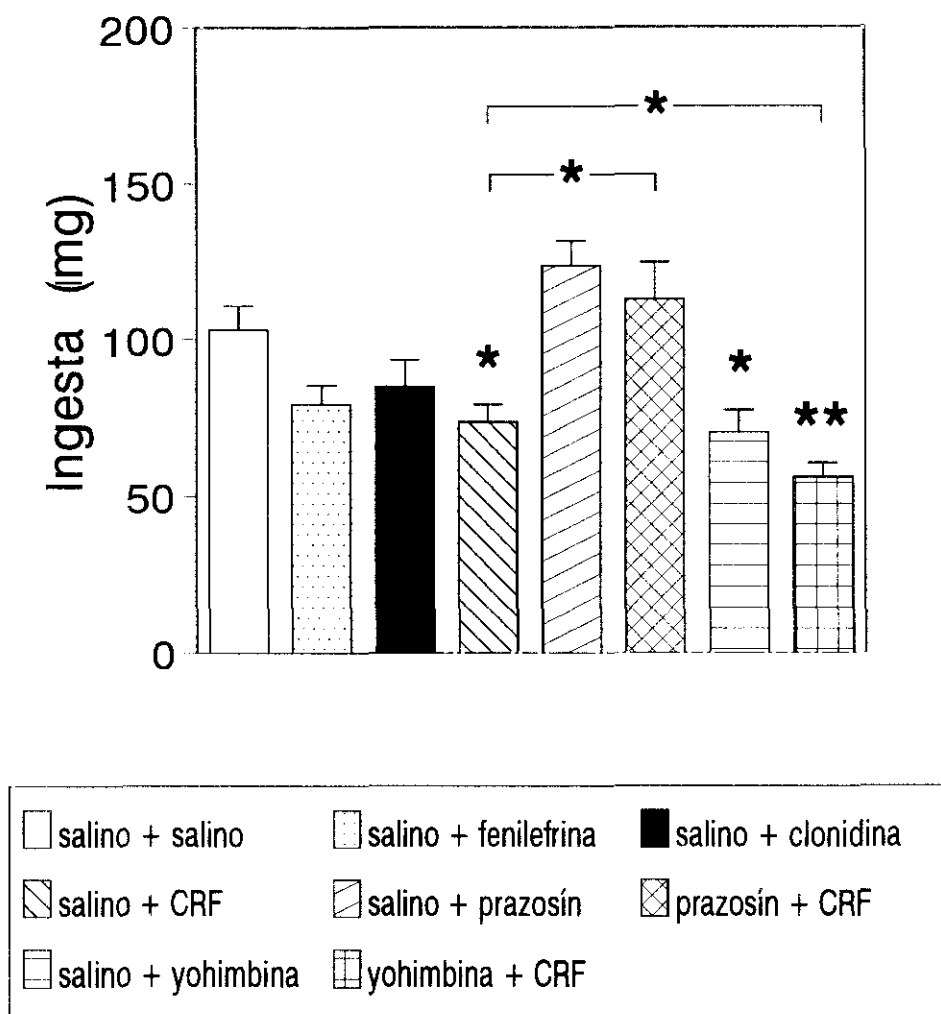


Figura 52. Ingesta en *C. auratus* a las 2 h de la administración ICV de agonistas y antagonistas α -adrenérgicos ($10 \mu\text{g}$) de forma aislada o en combinación con CRF ($1 \mu\text{g}$). Agonista α_1 , fenilefrina; agonista α_2 , clonidina; antagonista α_1 , prazosín y antagonista α_2 , yohimbina. Los datos se representan como $\bar{x} + \text{e.e.m.}$ ($n=9/\text{grupo}$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto al grupo control (doble inyección de solución salina).

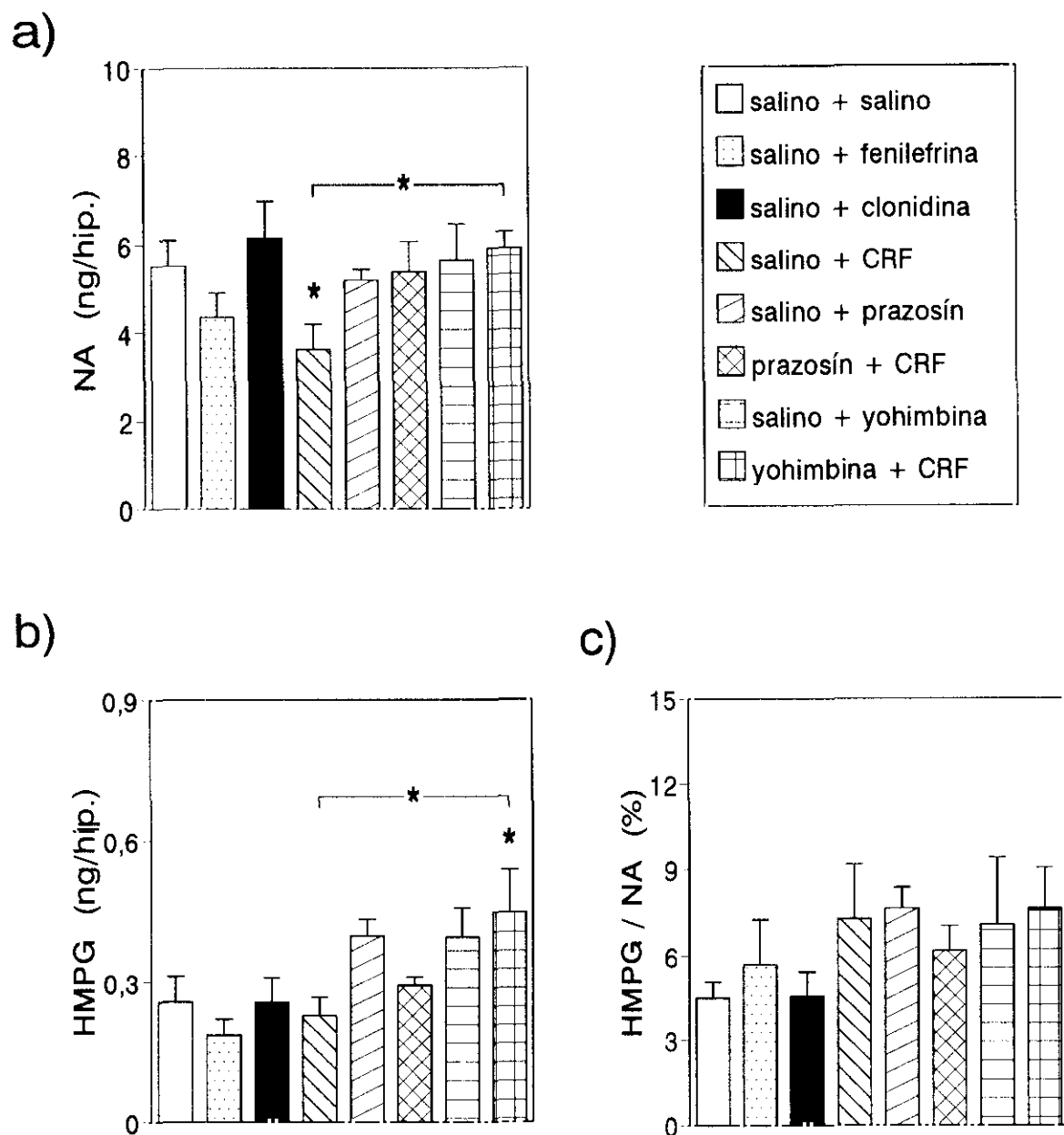


Figura 53. Contenido hipotalámico de a) noradrenalina, b) HMPG y c) relación HMPG/NA hipotalámica en *C. auratus* a las 2 h de la administración ICV de agonistas y antagonistas α -adrenérgicos (10 μ g) de forma aislada o en combinación con CRF (1 μ g). Agonista α_1 , fenilefrina; agonista α_2 , clonidina; antagonista α_1 , prazosín y antagonista α_2 , yohimbina. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ (n=9/grpo). * $p < 0,05$ respecto al grupo control (doble inyección de solución salina).

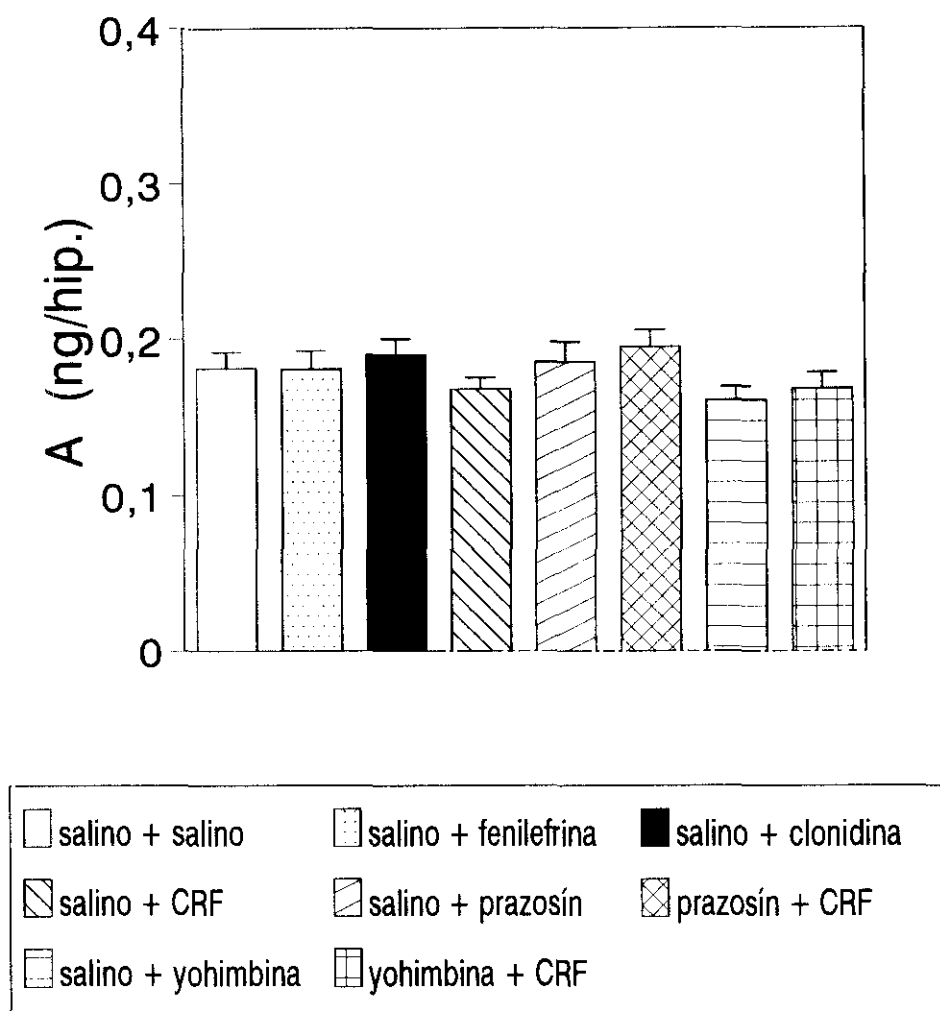


Figura 54. Contenido hipotalámico de adrenalina hipotalámica en *C. auratus* a las 2 h de la administración ICV de agonistas y antagonistas α -adrenérgicos ($10 \mu\text{g}$) sólo o en combinación con CRF ($1 \mu\text{g}$). Agonista α_1 , fenilefrina; agonista α_2 , clonidina; antagonista α_1 , prazosín y antagonista α_2 , yohimbina. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=9/\text{grupo}$).

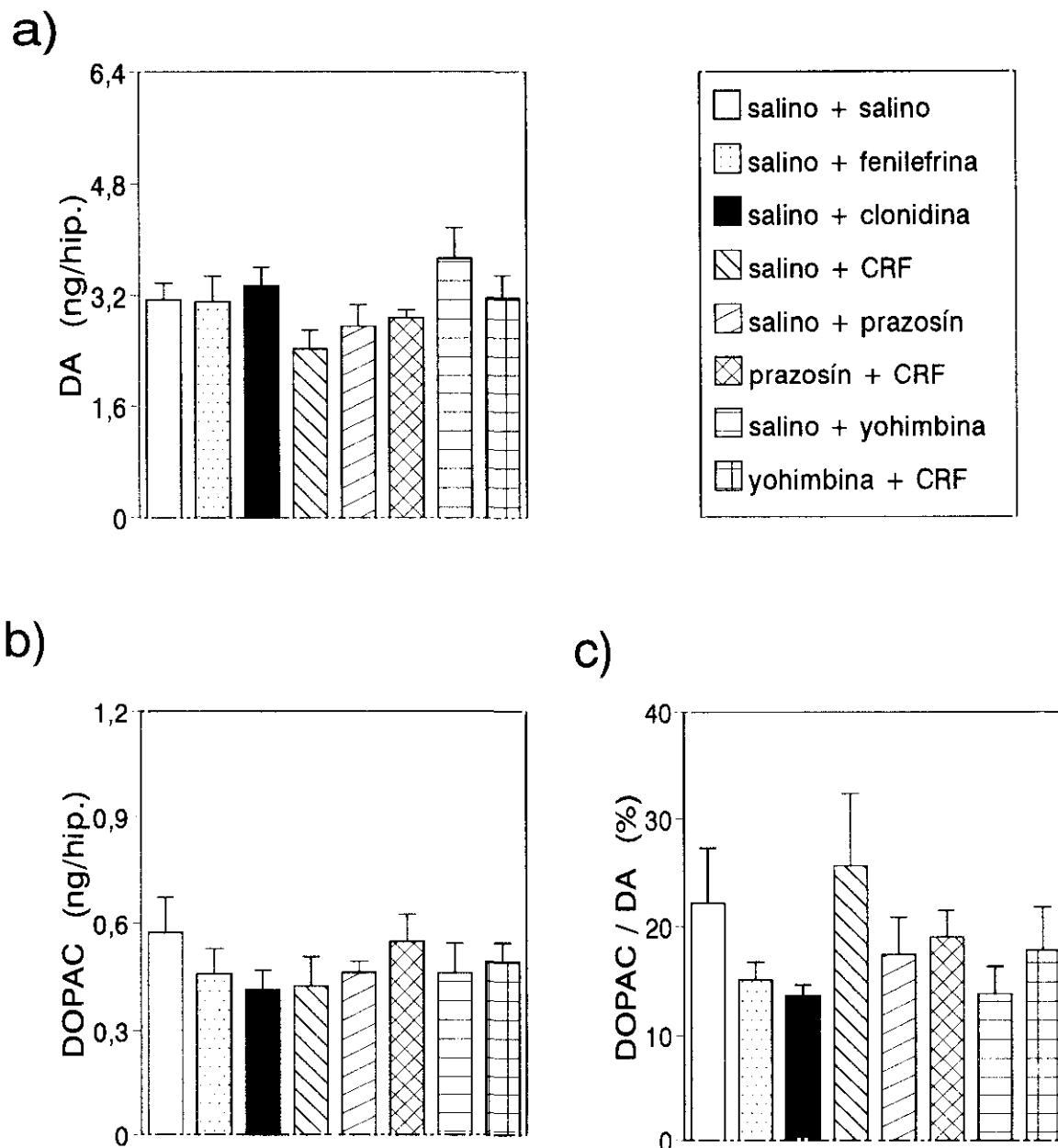


Figura 55. Contenido hipotalámico de a) dopamina, b) DOPAC y c) relación DOPAC/DA hipotalámica en *C. auratus* a las 2 h de la administración ICV de agonistas y antagonistas α -adrenérgicos (10 μ g) de forma aislada o en combinación con CRF (1 μ g). Agonista α_1 , fenilefrina; agonista α_2 , clonidina; antagonista α_1 , prazosín y antagonista α_2 , yohimbina. Los datos se representan como \bar{x} +e.e.m. (n=9/grupo).

b) Dopaminérgico.

En la Fig. 56 podemos observar los resultados referentes a la ingesta tras el tratamiento con agonistas y antagonistas dopaminérgicos y las interacciones con el CRF (ANOVA, $p < 0001$). Los agonistas dopaminérgicos D_1 (SKF 38393) y D_2 (quinpirol) reducen significativamente la ingesta ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente), mientras que el antagonista D_2 , pero no el D_1 , presenta el efecto opuesto, incrementando el grado de ingestión de alimento ($p < 0,05$). No obstante, ambos dos antagonistas bloquean el efecto del CRF.

En cuanto a las catecolaminas hipotalámicas (Figs 57 y 58), sólo se observan diferencias significativas en el contenido de DA (Fig. 58a), mostrando una reducción en los grupos tratados con SKF 38393 (D_1 agonista), SCH 23390 (D_1 antagonista) y CRF.

5. REGULACIÓN DE LA INGESTA POR LA β -ENDORFINA.

5.1. Administración ICV e IP de β -Endorfina. Efecto sobre la ingesta.

Del estudio de los efectos de la administración ICV de β -E sobre la ingestión de alimento se obtuvieron los siguientes resultados (Figs 59 y 60a): las dosis de 0,1 y 1 μ g de β -E incrementaron significativamente ($p < 0,01$; $p < 0,05$, respectivamente) la ingesta a las 2 y a las 8 h (Figs 59a y c), sin encontrarse modificaciones durante el intervalo 2-8 h (Fig. 59b). Se observa una tendencia estimuladora de la ingesta por parte de la dosis más baja utilizada (0,001 μ g), aunque en ningún intervalo los incrementos llegaron a ser significativos (Fig. 59). Los efectos observados con la dosis eficaz de 1 μ g a las 2 y 8 h no se obtuvieron cuando el tiempo transcurrido entre la inyección y la valoración de la ingesta fue de 1 hora (Fig. 60a).

El tratamiento IP de β -E no modificó significativamente los niveles de ingesta en ninguno de los intervalos de tiempo estudiados (0-2, 2-8 y 0-8 h) (Fig. 60b).

5.2. Efecto de la β -Endorfina sobre la ingesta, glucosa, hormonas tiroideas y catecolaminas hipotalámicas.

El aumento significativo ($p < 0,005$) de la ingesta por β -E (1 μ g) a las 2 h (Fig. 61a) no fue acompañado por modificaciones de los niveles plasmáticos de glucosa (Fig. 61b), ni

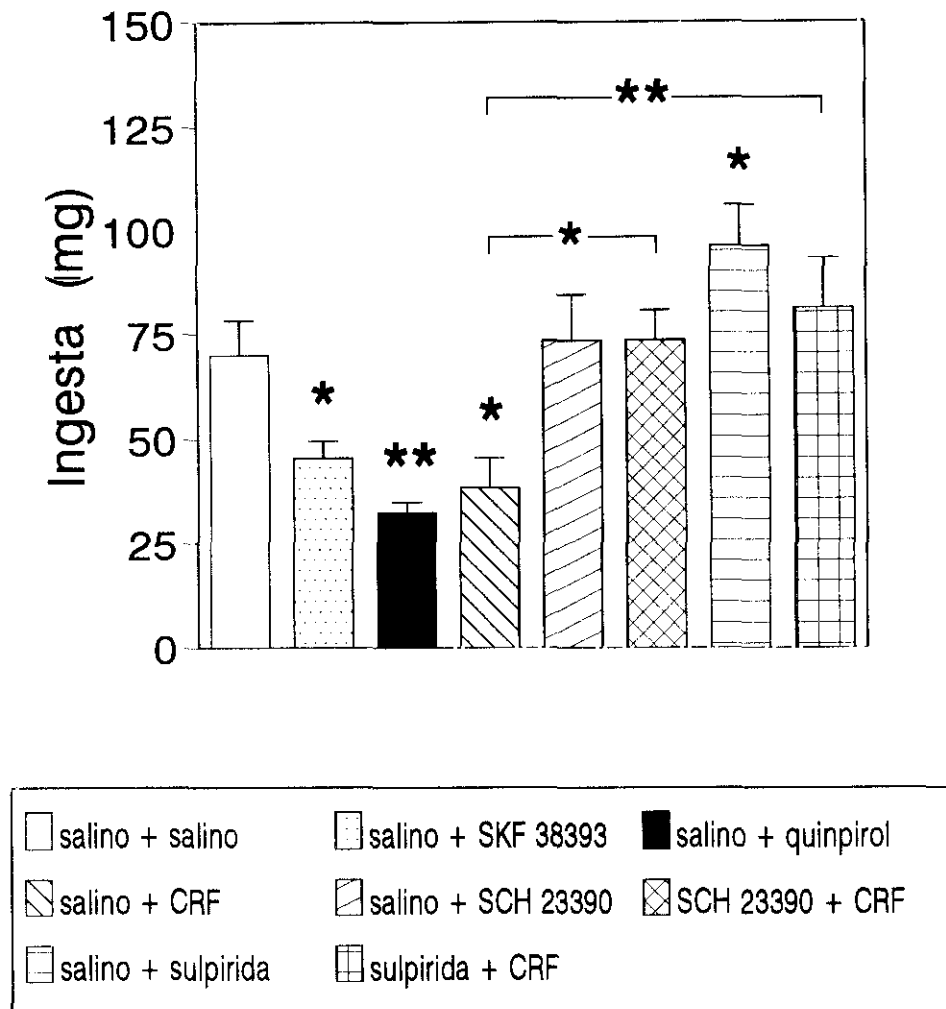


Figura 56. Ingesta en *C. auratus* a las 2 h de la administración ICV de agonistas y antagonistas dopaminérgicos (10 μ g) de forma aislada o en combinación con CRF (1 μ g). Agonista D₁, SKF 38393; agonista D₂, quinpirol; antagonista D₁, SCH 23390 y antagonista D₂, sulpirida. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ (n=9/grupo). * p < 0,05; ** p < 0,01 respecto al grupo control (doble inyección de solución salina).

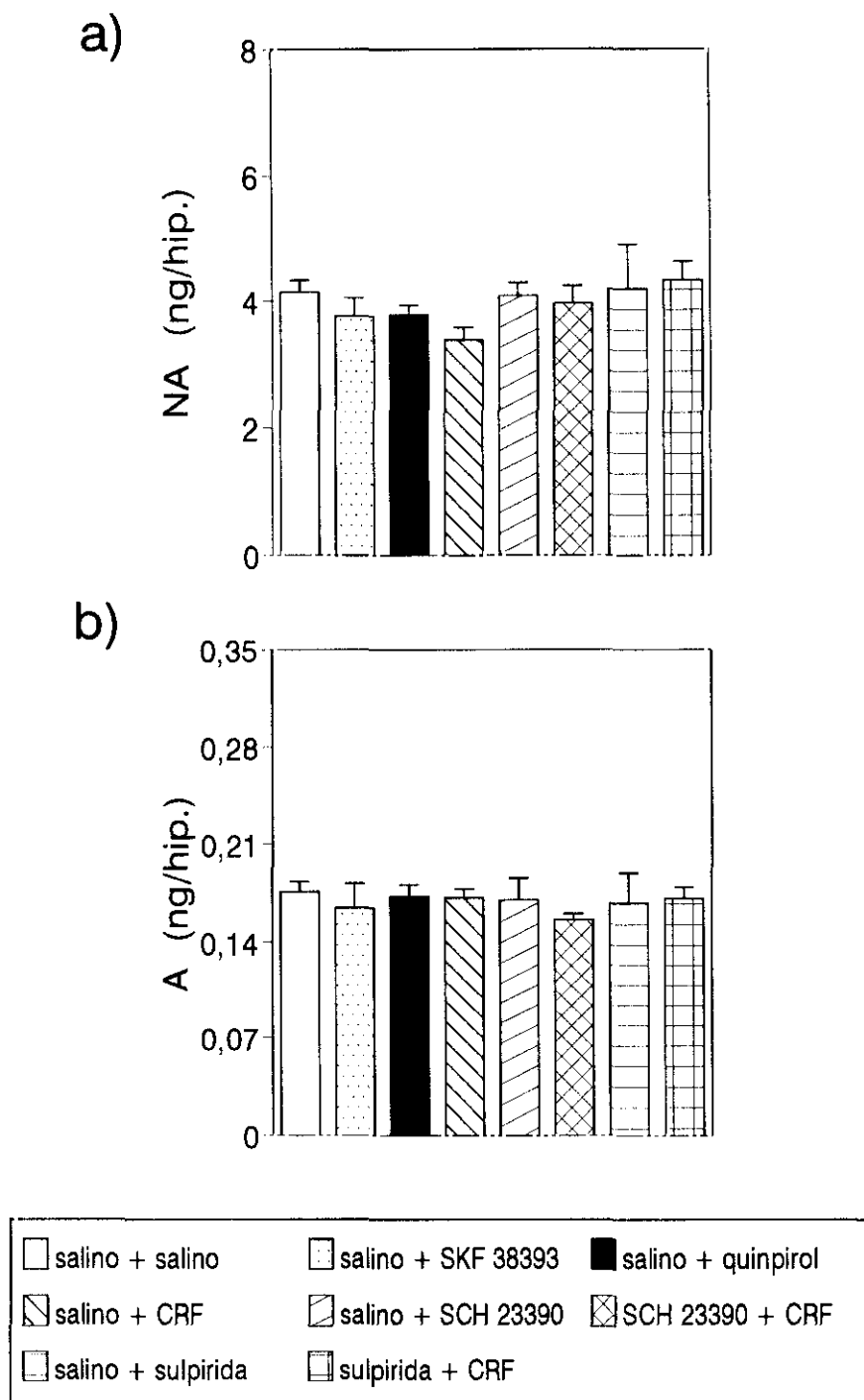


Figura 57. Contenido hipotalámico de a) noradrenalina y b) adrenalina en *C. auratus* a las 2 h de la administración ICV de agonistas y antagonistas dopaminérgicos (10 μ g) de forma aislada o en combinación con CRF (1 μ g). Agonista D₁, SKF 38393; agonista D₂, quinpirol; antagonista D₁, SCH 23390 y antagonista D₂, sulpirida. Los datos se representan como \bar{x} +e.e.m. (n=9/grupo).

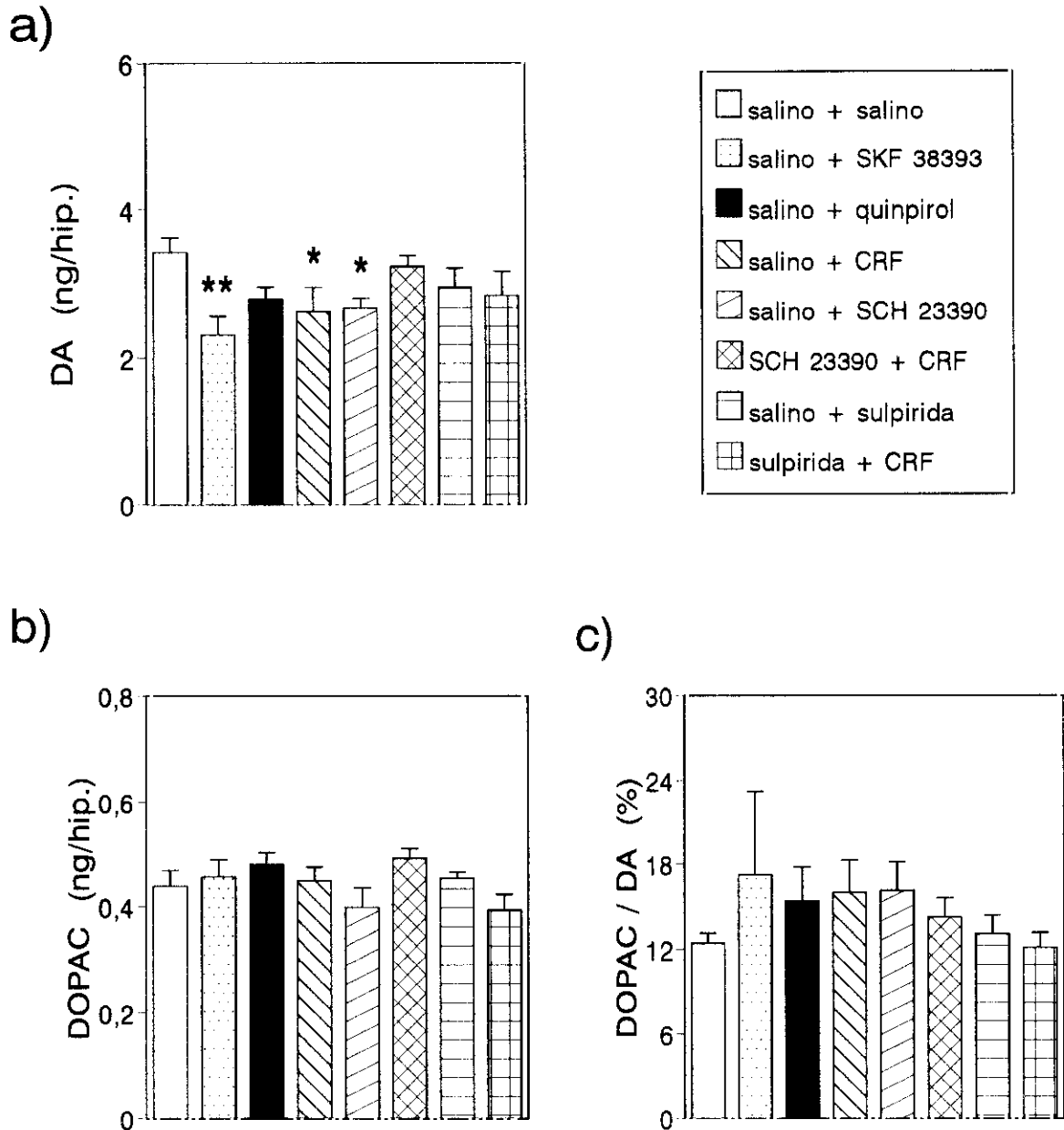


Figura 58. Contenido hipotalámico de a) dopamina, b) DOPAC y c) relación DOPAC/DA hipotalámica en *C. auratus* a las 2 h de la administración ICV de agonistas y antagonistas dopaminérgicos (10 μ g) de forma aislada o en combinación con CRF (1 μ g). Agonista D₁, SKF 38393; agonista D₂, quinpirol; antagonista D₁, SCH 23390 y antagonista D₂, sulpirida. Los datos se representan como \bar{x} +e.e.m. (n=9/grupo). * p<0,05; ** p<0,01 respecto al grupo control (doble inyección de solución salina).

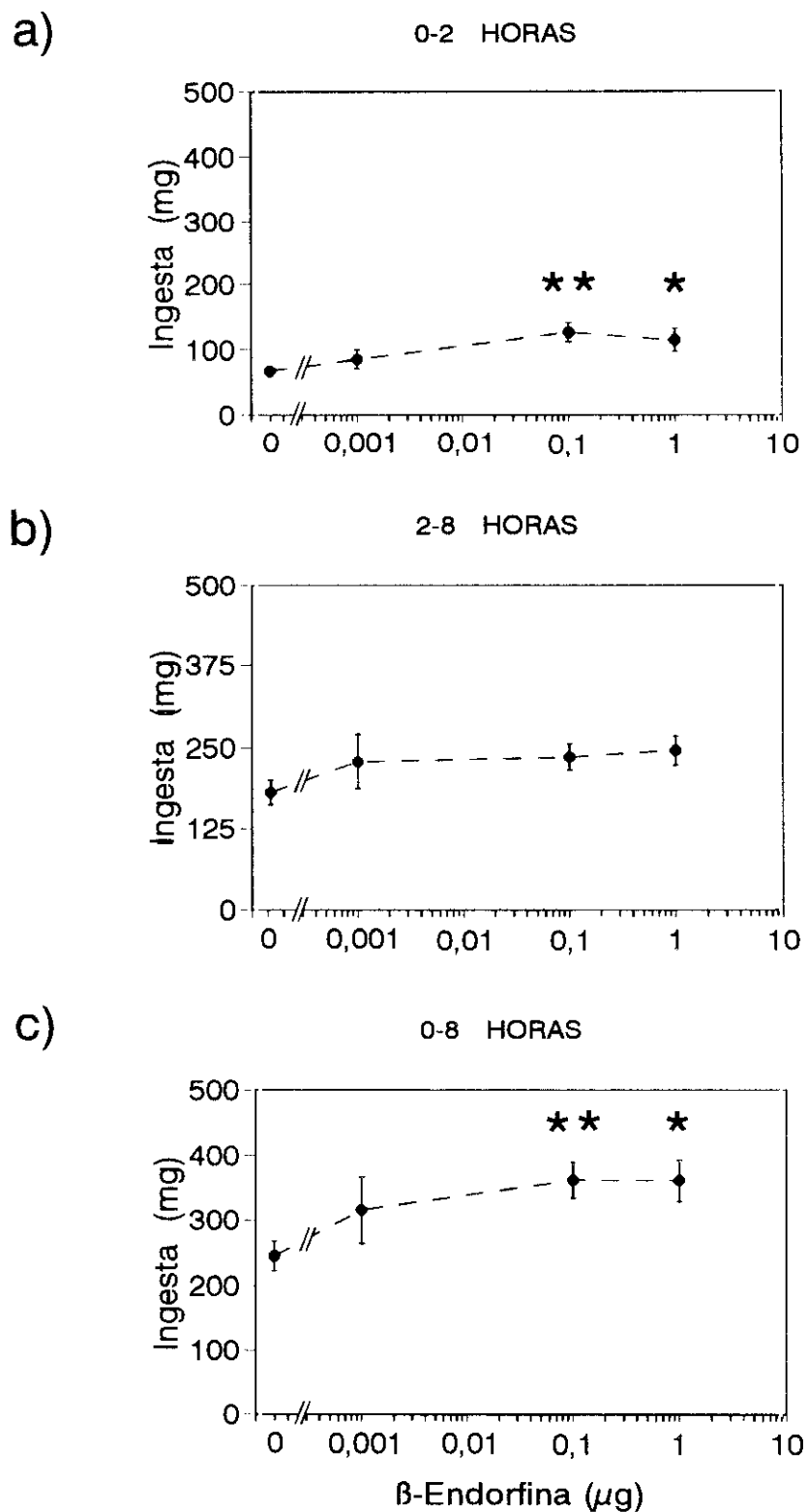


Figura 59. Efecto de la administración ICV de β -Endorfina sobre la ingesta en *C. auratus* durante los intervalos a) 0-2, b) 2-8 y c) 0-8 h. Controles (n=18), β -E: 0,001 (n=9), 0,1 (n=9) y 1 (n=10) μ g. El eje "x" representa dosis absolutas de β -E (μ g) en las tres gráficas. Los datos se representan como $\bar{x} \pm e.e.m.$ * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto al grupo control.

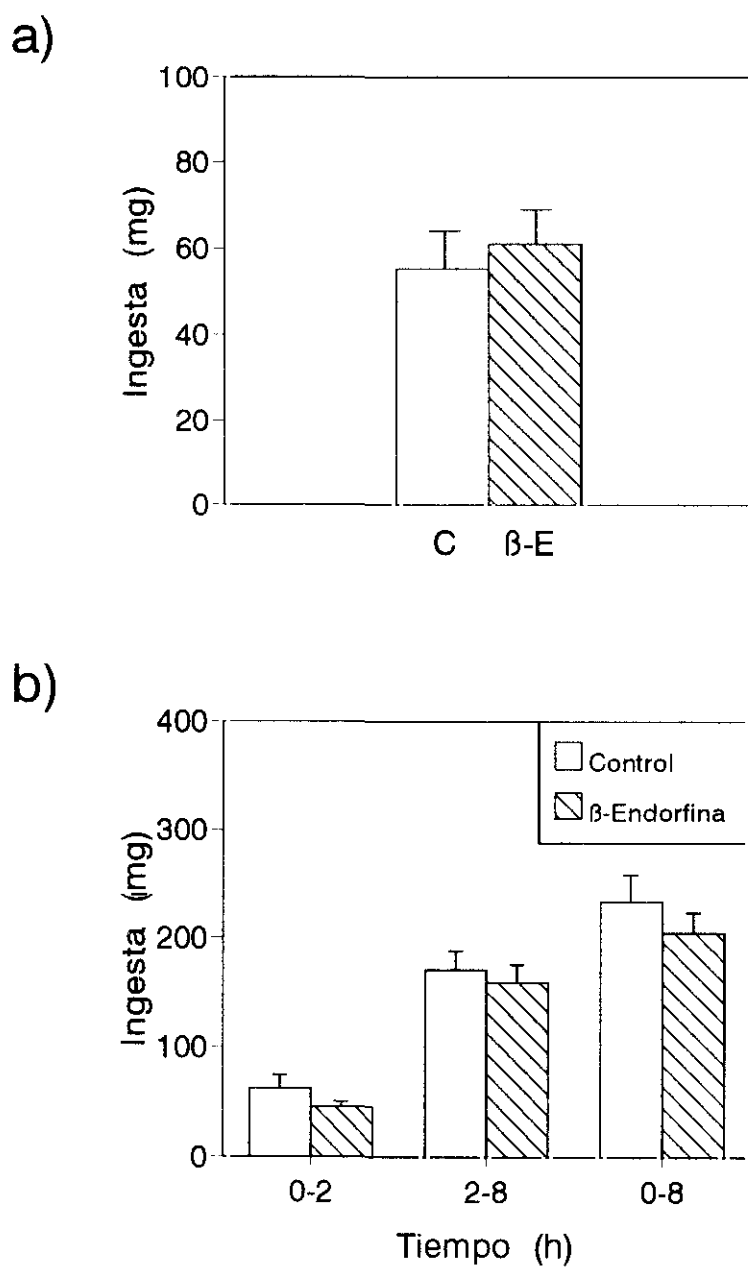


Figura 60. a) Efecto de la administración ICV de β -E ($1 \mu\text{g}$) sobre la ingesta en *C. auratus* durante el intervalo 0-1 h ($n=8/\text{grupo}$). b) Efecto de la administración IP de β -E ($0,1 \mu\text{g/g}$ peso corporal) sobre la ingesta en *C. auratus* durante los intervalos 0-2, 2-8 y 0-8 h, ($n=11/\text{grupo}$). Los datos se representan como $\bar{x} + \text{e.e.m.}$

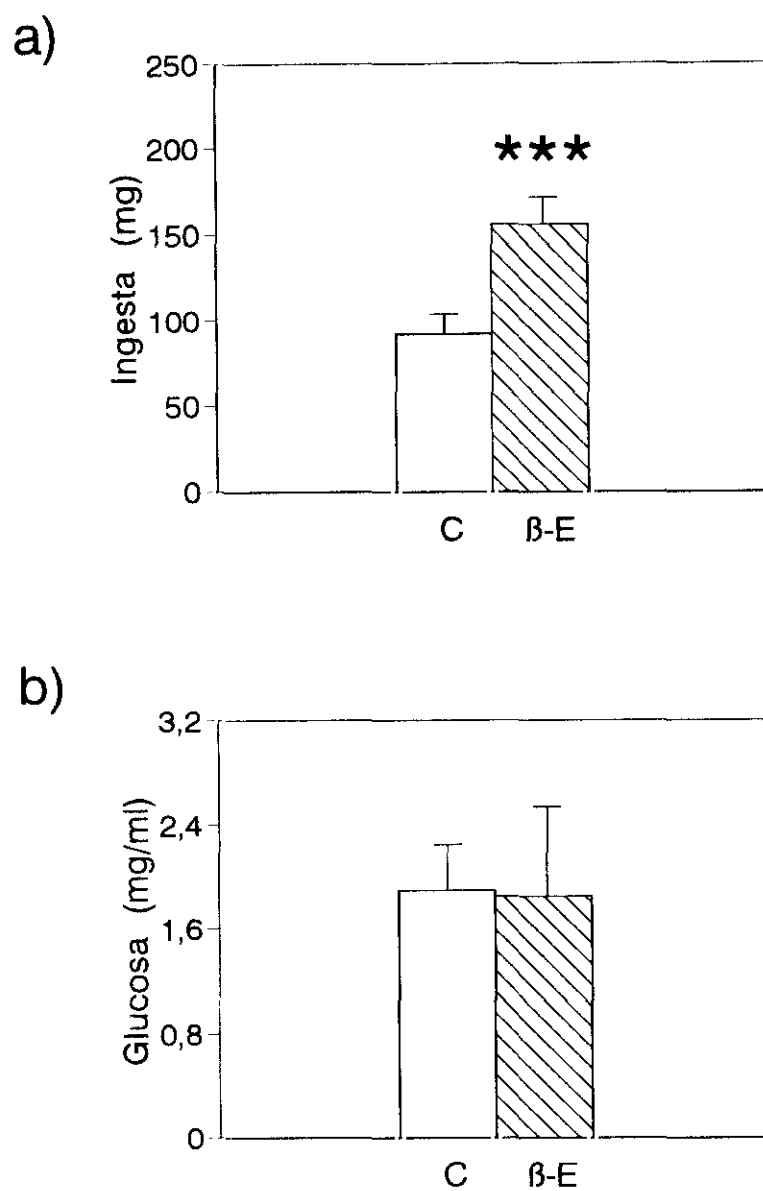


Figura 61. Efecto de la administración ICV de β -E ($1 \mu\text{g}$) sobre a) la ingesta y b) los niveles plasmáticos de glucosa en *C. auratus* a las 2 h. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=11/\text{grupo}$). *** $p < 0,005$.

de las fracciones libre y unida de las hormonas tiroideas en el tejido tiroideo (Fig. 62). El contenido hipotalámico de catecolaminas (NA, A y DA) tampoco se ve alterado por el tratamiento ICV con β -E (Fig. 63).

5.3. Control por los distintos tipos de receptores opioidérgicos.

La naloxona, antagonista general de los péptidos opioides, provoca un descenso de la ingesta cuando se administra ICV en combinación con solución salina ($p < 0,05$) y bloquea parcialmente el efecto estimulador de la β -E sobre la ingesta (ANOVA, $p < 0,005$) (Fig. 64a).

a) δ -opioidérgico. _____

En la Fig. 64b se puede observar que los antagonistas δ , ni el δ_1 (BNTX) ni el δ_2 (naltriben) son capaces de bloquear la estimulación de la ingesta provocada por la β -E (ANOVA, $p < 0,0005$). Ninguno de los dos antagonistas δ utilizados, BNTX y naltriben, producen modificaciones del comportamiento alimentario cuando se administran en combinación únicamente con solución salina. El agonista δ -opioidérgico general DPEN estimula la ingesta significativamente ($p < 0,05$) a las 2 h del tratamiento.

b) κ -opioidérgico. _____

La administración ICV de U-50488 (agonista κ) produce un incremento significativo de la ingesta ($p < 0,05$), sin observarse modificaciones de la misma tras el tratamiento con el antagonista κ *nor*-binaltorfimina, que no es capaz de bloquear la acción estimuladora de la β -E sobre la alimentación (Fig. 65a) (ANOVA, $p < 0,0001$).

c) μ -opioidérgico. _____

La Fig. 65b muestra los resultados obtenidos en cuanto a la ingesta tras la administración ICV de agonistas y antagonistas μ -opioidérgicos de forma aislada o en combinación con β -E (ANOVA, $p < 0,0001$). El tratamiento con naloxonazina (antagonista μ_1) antagoniza el efecto estimulador de la β -E sobre la ingesta, mientras que dicho bloqueo no se observa con la β -funaltrexamina (antagonista $\mu_1 + \mu_2$). Dichos antagonistas, sólo, no afectan de forma significativa a la ingestión de alimento, observándose un incremento de la misma cuando se administraba el agonista general μ DAMGO.

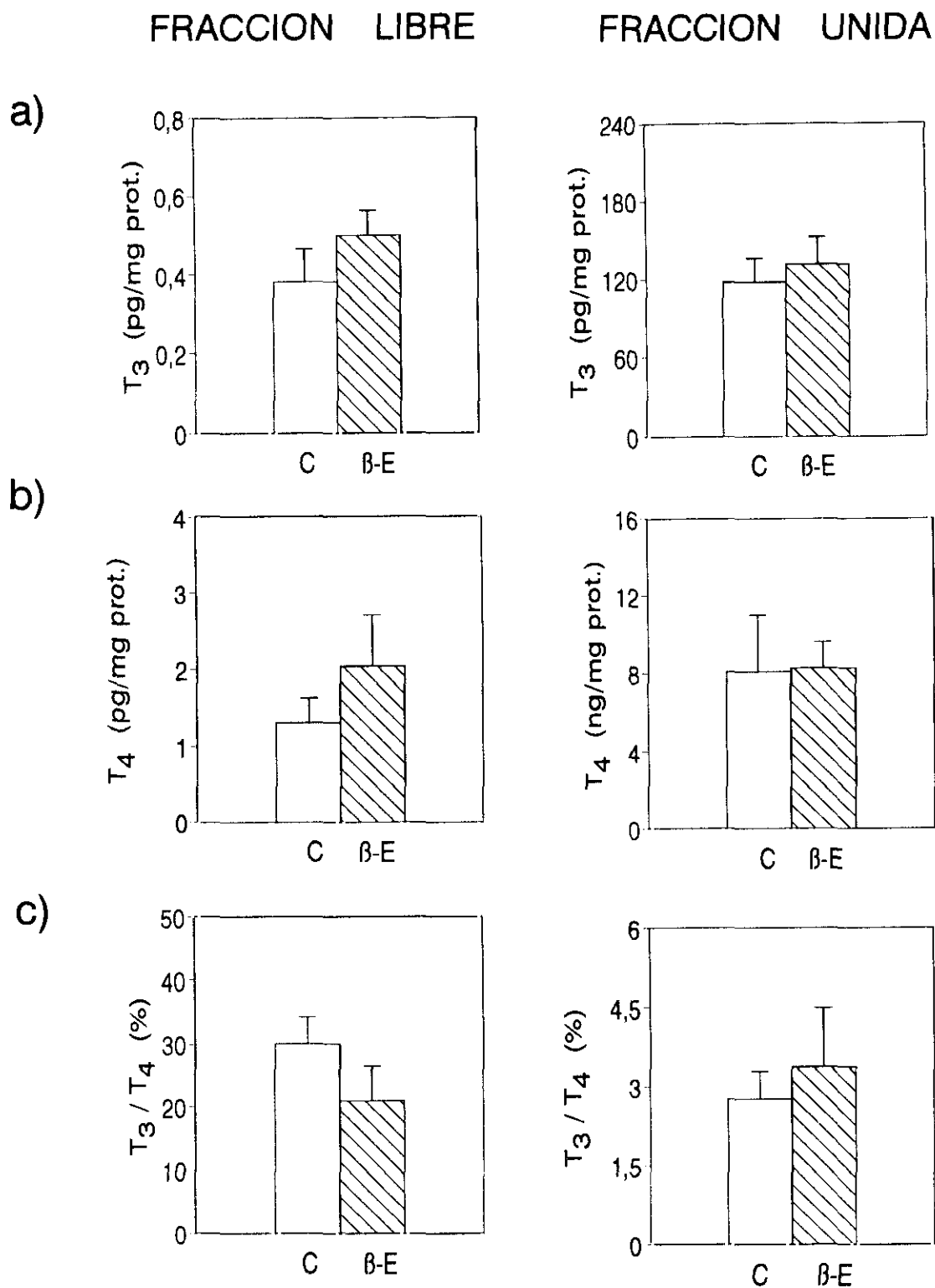


Figura 62. Efecto de la administración ICV de β -E ($1 \mu\text{g}$) sobre las fracciones libre y unida de **a)** T₃, **b)** T₄ y **c)** las correspondientes relaciones T₃/T₄ tiroideas en *C. auratus* a las 2 h. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=11/\text{grupo}$).

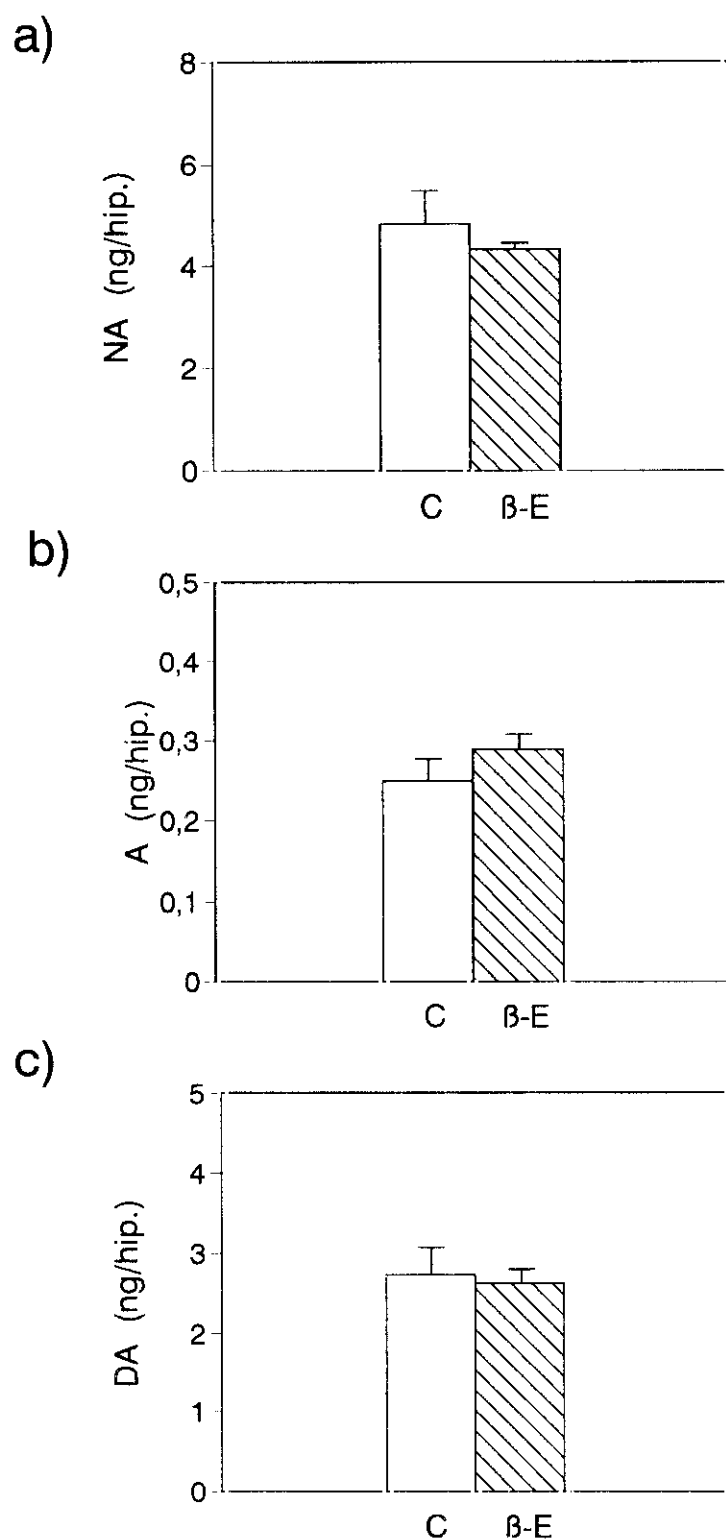


Figura 63. Efecto de la administración ICV de β -E (1 μ g) sobre el contenido hipotalámico de **a)** noradrenalina, **b)** adrenalina y **c)** dopamina en *C. auratus* a las 2 h. Los datos se representan como \bar{x} +e.e.m. (n=11/grupo).

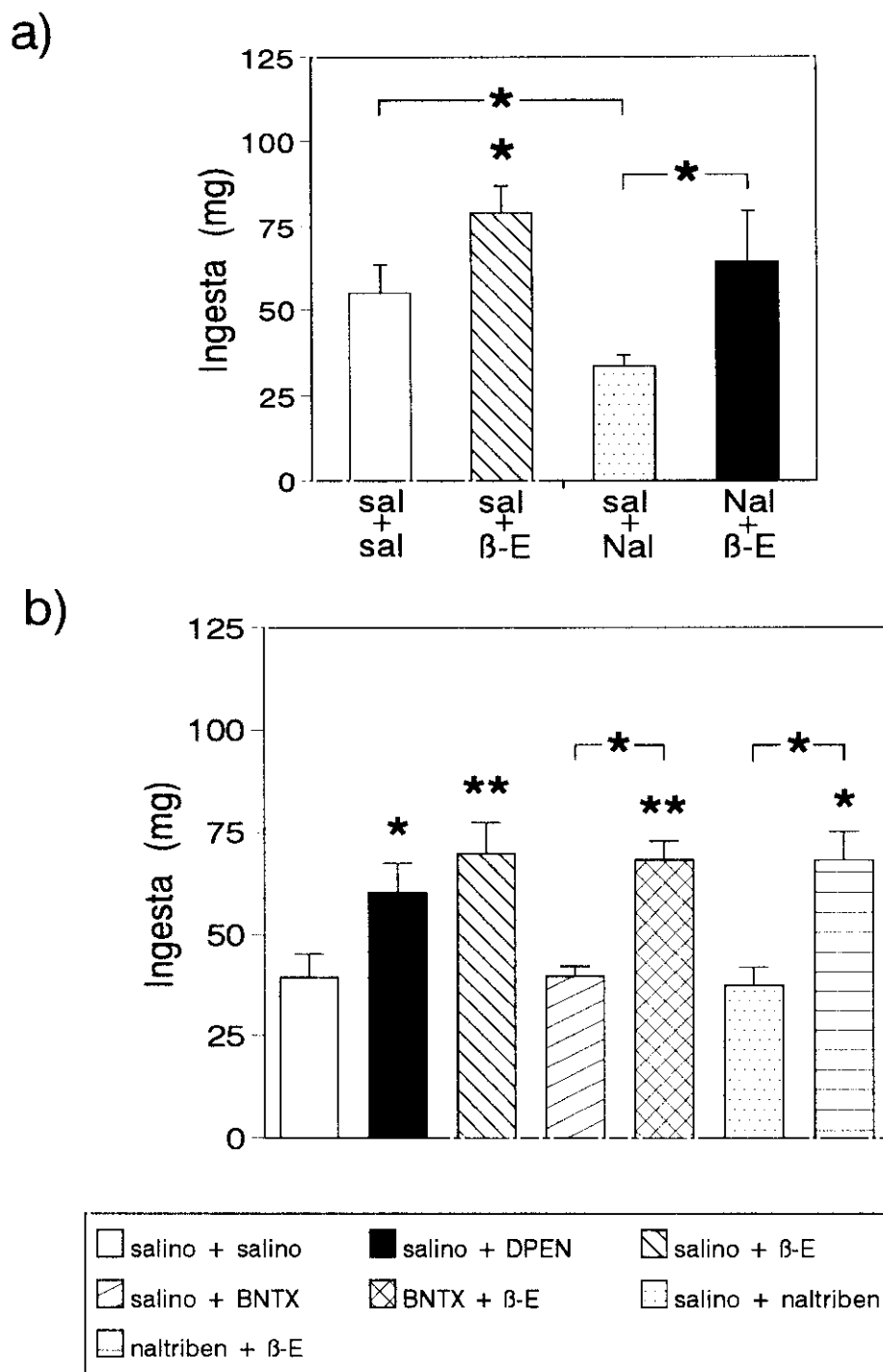


Figura 64. Ingesta en *C. auratus* a las 2 h de la administración ICV de a) el antagonista general naloxona, 10 μ g (n=10/grupo) y b) el agonista (DPEN, 1 μ g) y los antagonistas δ -opiodérgicos (δ_1 , BNTX; δ_2 , naltriben; 5 μ g) (n=6-8/grupo) de forma aislada o en combinación con β -Endorfina. Los datos se representan como \bar{x} +e.e.m. * p<0,05; ** p<0,01 respecto al grupo control (doble inyección de solución salina).

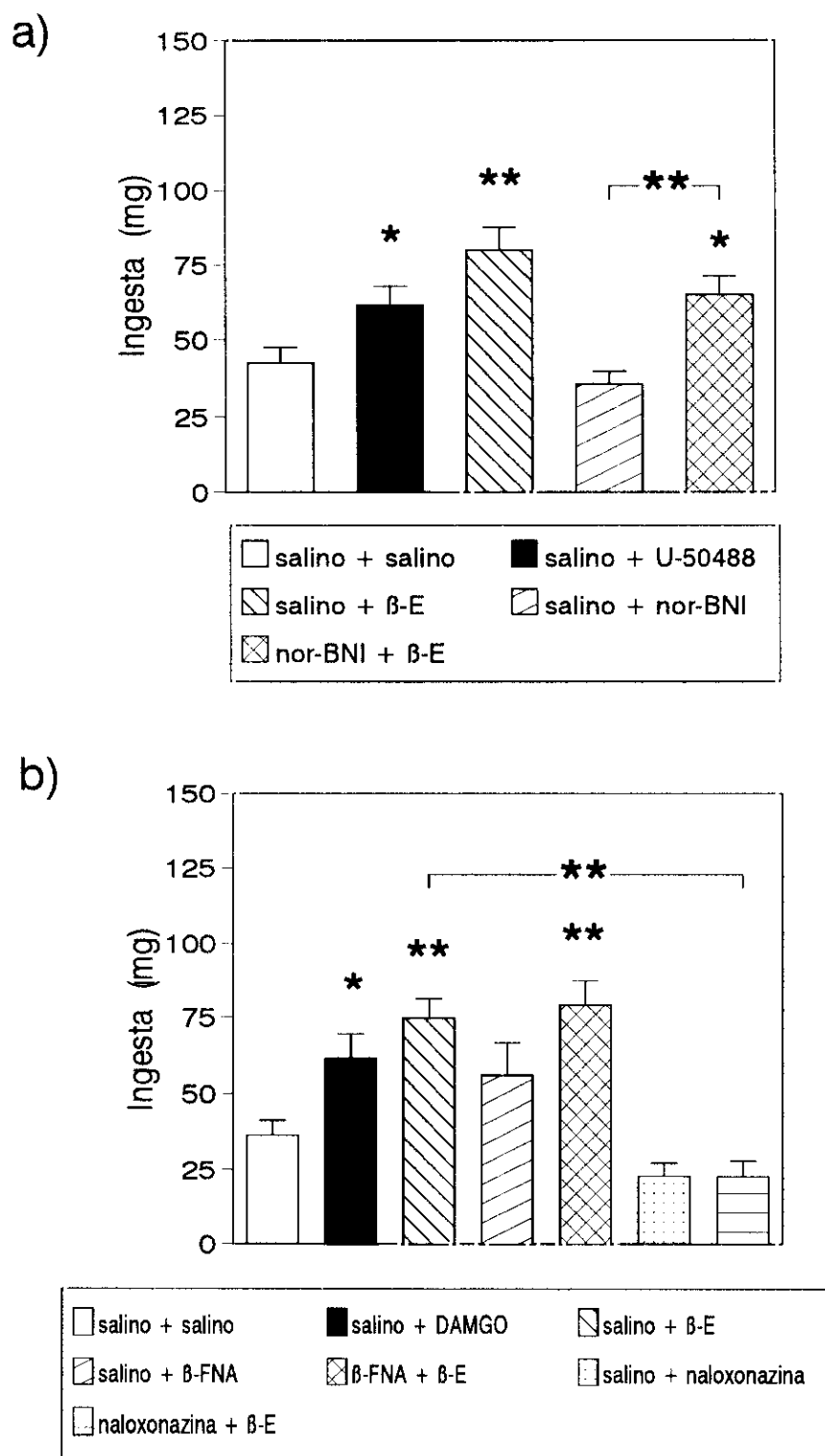


Figura 65. Ingesta en *C. auratus* a las 2 h de la administración ICV de a) el agonista (U-50488, 1 μ g) y el antagonista κ -opiodérgico (*nor*-BNI, 5 μ g) ($n=7-8$ /grupo) y b) el agonista (DAMGO, 1 μ g) y los antagonistas μ -opiodérgicos (μ , β -FNA; μ_1 , naloxonazina; 5 μ g) ($n=6$ /grupo) de forma aislada o en combinación con β -Endorfina. Los datos se representan como $\bar{x} \pm e.e.m.$ * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto al grupo control (doble inyección de solución salina).

6. REGULACIÓN DE LA INGESTA POR LA GALANINA.

6.1. Administración ICV e IP de galanina. Efecto sobre la ingesta.

La Fig. 66 muestra los resultados de la administración ICV de distintas dosis de galanina sobre la ingesta. Un incremento estadísticamente significativo se observa a las 2 h (Fig. 66a) con las dosis de 1 y 3,33 μg ($p < 0,01$; $p < 0,05$, respectivamente), manteniéndose dicha estimulación a las 8 h con la dosis más alta (Fig. 66c). En el intervalo 2-8 h no se observan diferencias significativas en los niveles de ingestión de alimento entre los animales controles y los tratados con las diferentes dosis de galanina (Fig. 66b). La dosis eficaz de 1 μg a las 2 h no produce ningún efecto cuando se cuantifica la ingesta 1 h después del tratamiento (Fig. 67a).

No se observaron diferencias significativas de la ingesta ni a las 2, ni a las 8 h después del tratamiento IP con galanina (Fig. 67b).

6.2. Efecto de la galanina sobre la ingesta, glucosa, hormonas tiroideas y catecolaminas hipotalámicas.

La galanina (1 μg) estimula, como hemos visto en el apartado anterior, el apetito a las 2 h de su administración ICV (Fig. 68a), sin cambios significativos en los niveles plasmáticos de glucosa (Fig. 68b), en las fracciones libre y unida de las hormonas tiroideas (Fig. 69), ni en el contenido hipotalámico de catecolaminas (NA, A y DA) (Fig. 70).

6.3. Efecto del antagonista galantida.

En la Fig. 71 se puede observar que el tratamiento ICV con el antagonista específico de la galanina, la galantida (5 μg), revierte la acción estimuladora del neuropéptido sobre la ingesta (ANOVA, $p < 0,005$).

La administración ICV de galanina o de galantida por separado o de forma conjunta no modifica significativamente del contenido hipotalámico de catecolaminas (NA, Fig. 72a; A, Fig. 73; DA, Fig. 74a), ni de sus metabolitos (HMPG, Fig. 72b; DOPAC, Fig. 74b), ni de las correspondientes relaciones HMPG/NA (Fig. 72c) y DOPAC/DA (Fig. 74c).

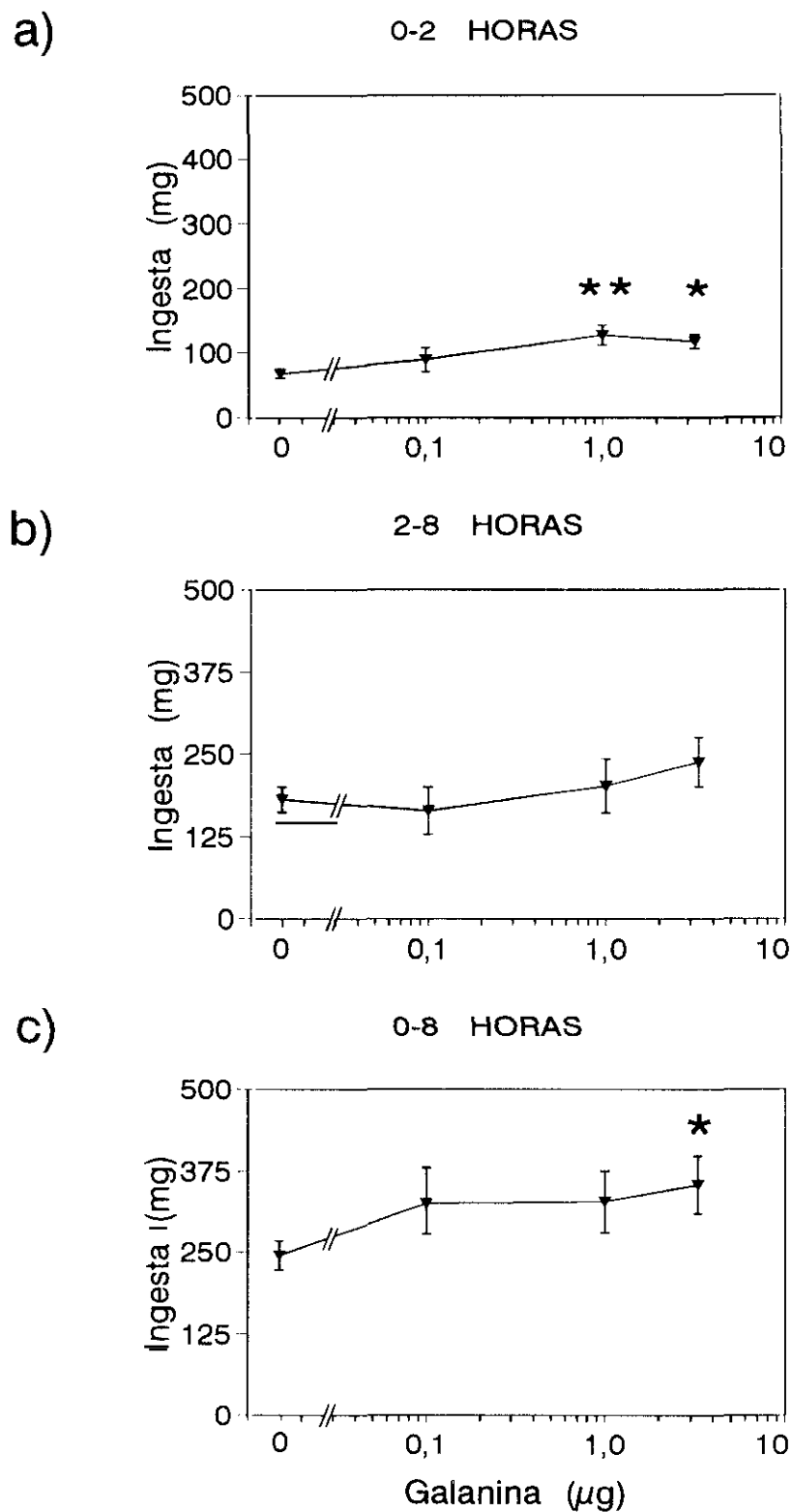


Figura 66. Efecto de la administración ICV de la Galanina sobre la ingesta en *C. auratus* durante los intervalos a) 0-2, b) 2-8 y c) 0-8 h. Controles (n=18), Gal: 0,1 (n=8), 1 (n=10) y 3,33 (n=9) μg . El eje "x" representa dosis absolutas de Gal (μg) en las tres gráficas. Los datos se representan como $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$ * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto a los controles.

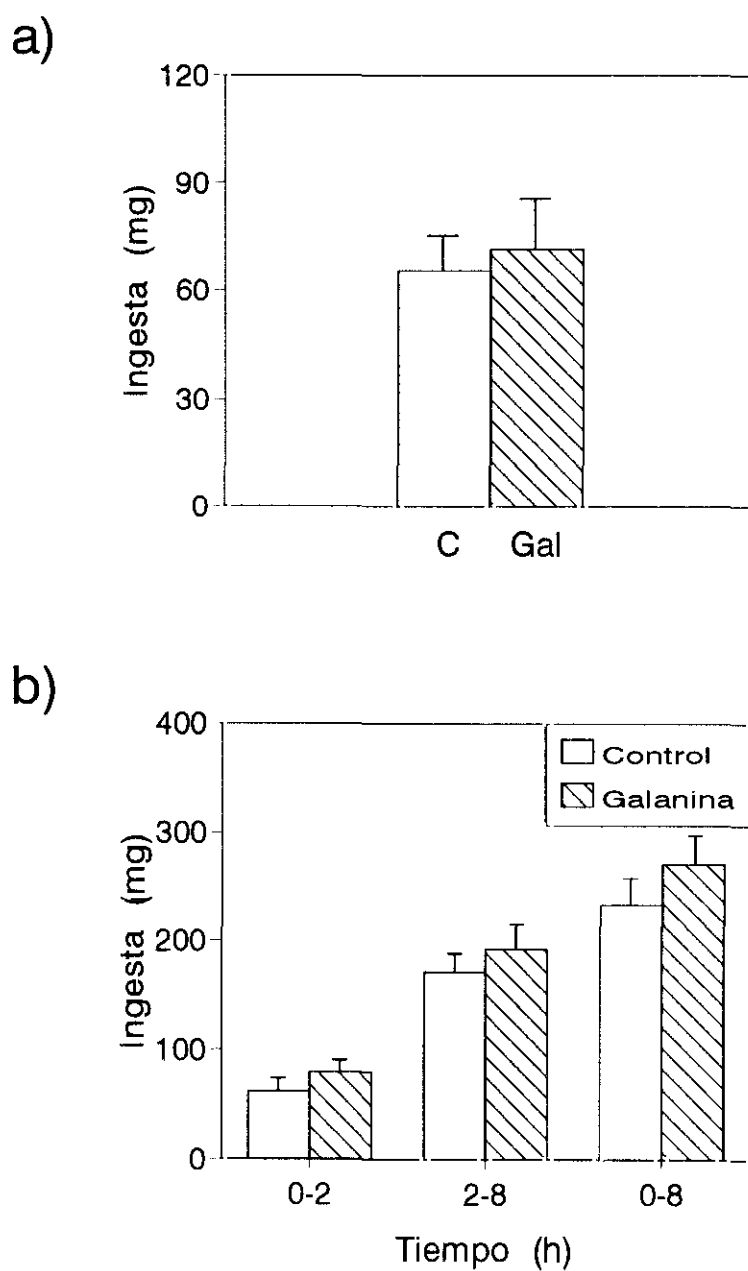


Figura 67. a) Ingesta tras 1 h de la administración ICV de Gal ($1 \mu\text{g}$) en *C. auratus* ($n=8$). b) Efecto de la administración IP de Gal ($0,1 \mu\text{g/g}$ peso corporal) sobre la ingesta en *C. auratus* durante los intervalos 0-2, 2-8 y 0-8 h ($n=11/\text{grupo}$). Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$

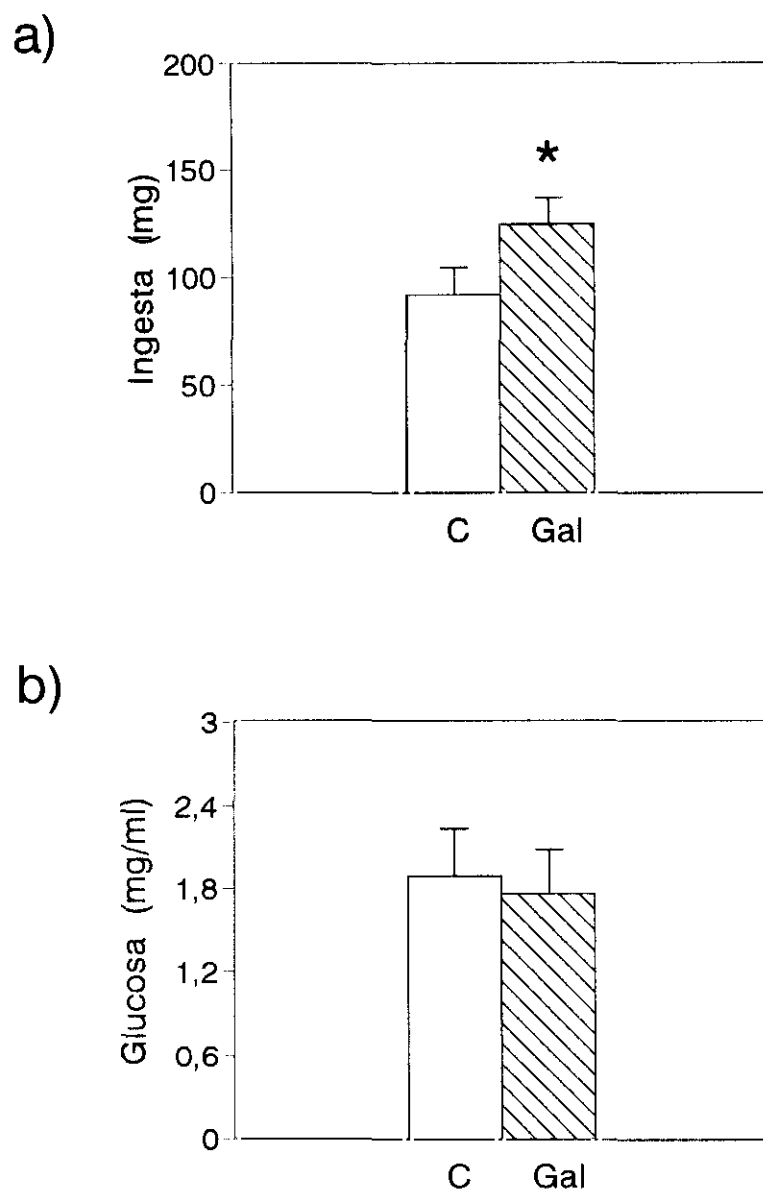


Figura 68. Efecto de la administración ICV de Gal ($1 \mu\text{g}$) sobre a) la ingesta y b) los niveles plasmáticos de glucosa en *C. auratus* a las 2 h. Los datos se representan como $\bar{x} + \text{e.e.m.}$ ($n=11/\text{grupo}$). * $p < 0,05$.

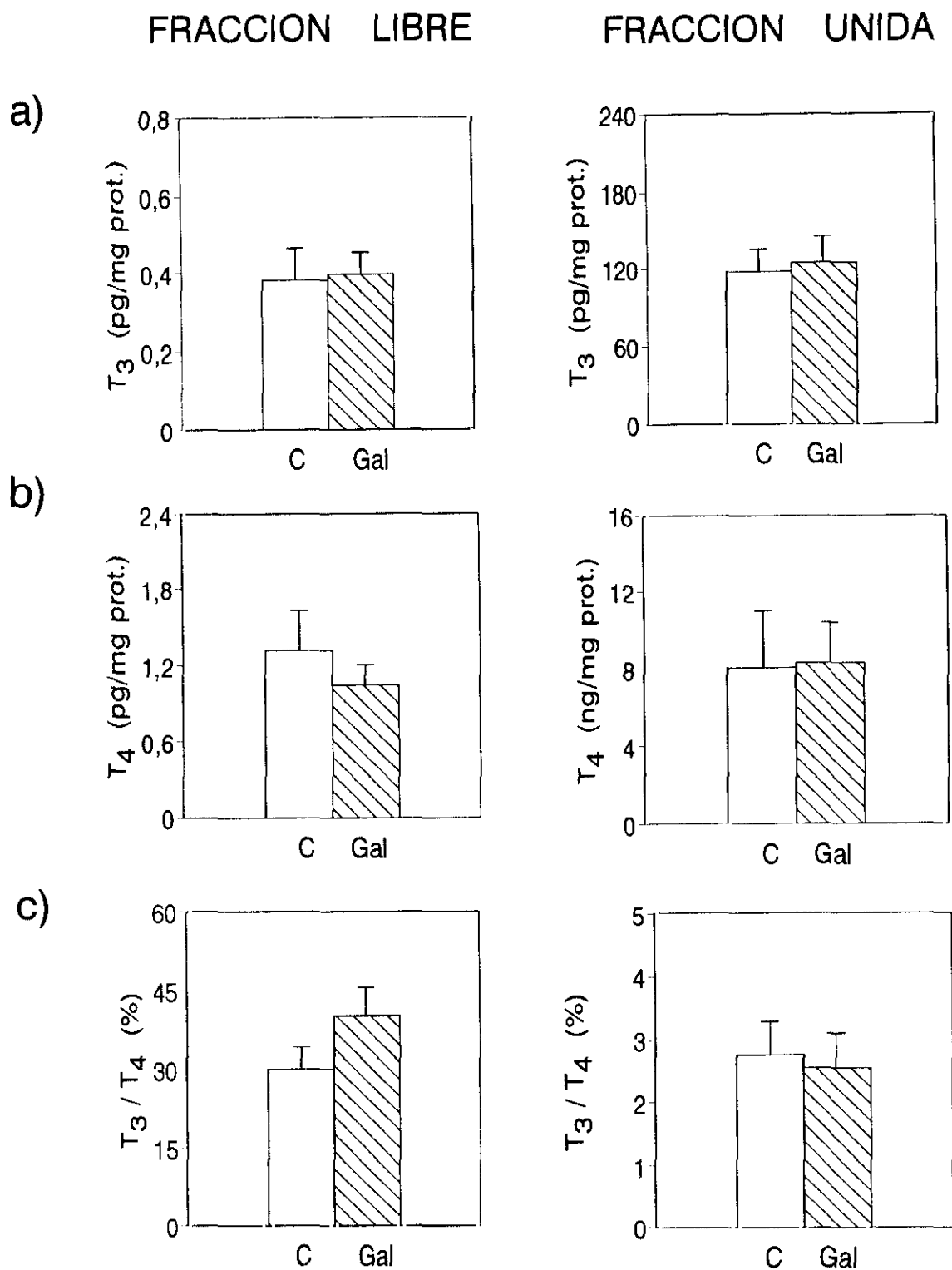


Figura 69. Efecto de la administración ICV de Gal ($1 \mu\text{g}$) sobre las fracciones libre y unida de a) T_3 , b) T_4 y c) las correspondientes relaciones T_3/T_4 tiroideas en *C. auratus* a las 2 h. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=11/\text{grupo}$).

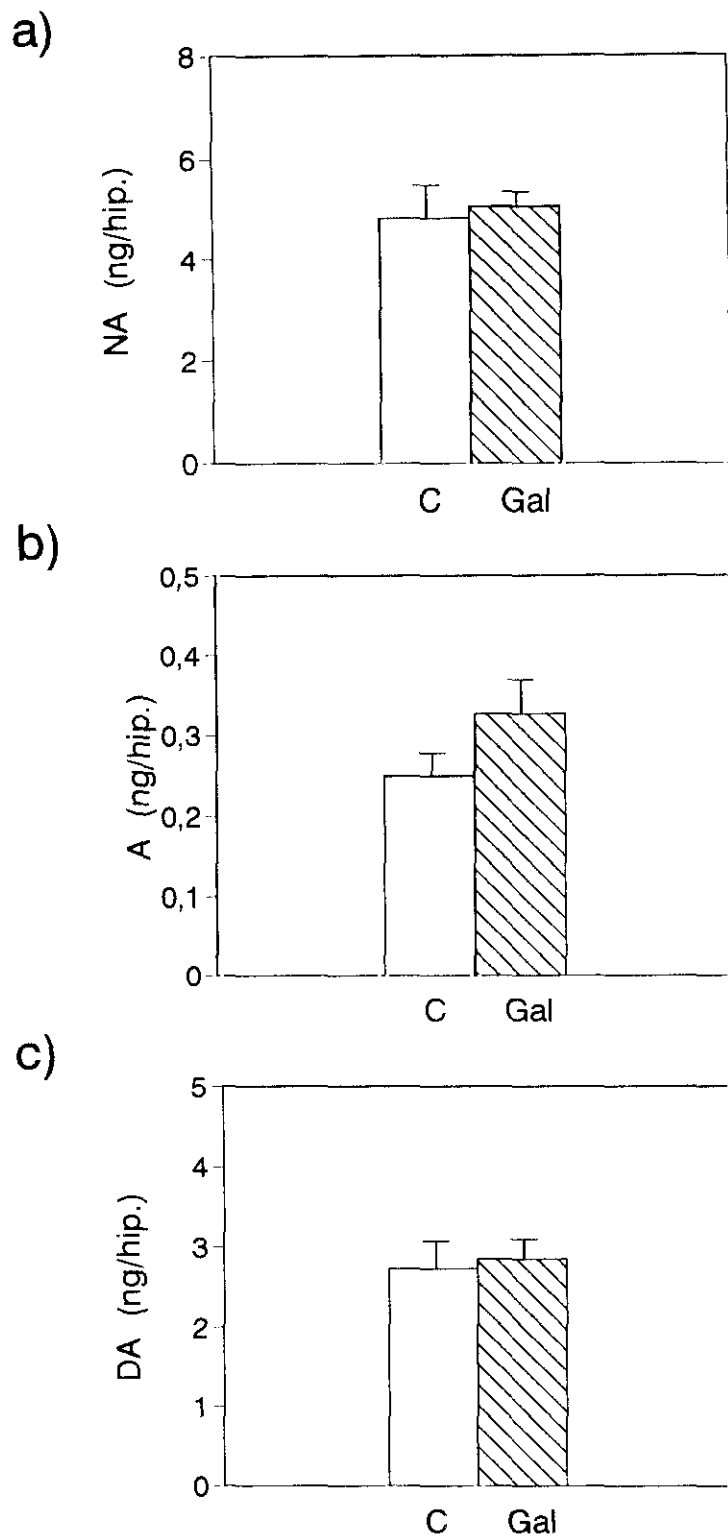


Figura 70. Efecto de la administración ICV de Gal (1 µg) sobre el contenido hipotalámico de **a)** noradrenalina, **b)** adrenalina y **c)** dopamina en *C. auratus* a las 2 h. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ (n=11/grupo).

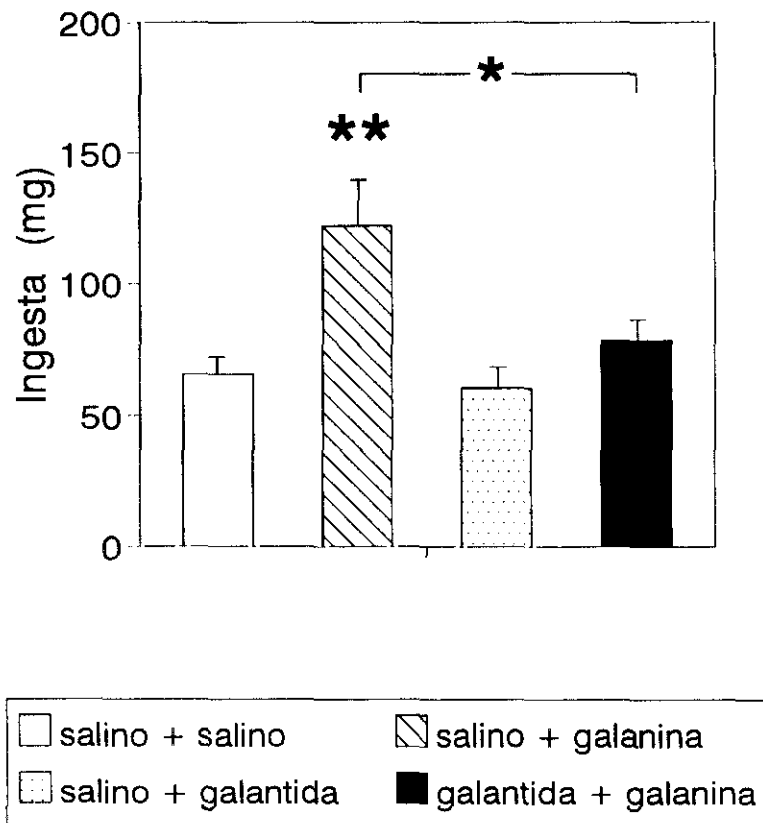


Figura 71. Efecto de la administración ICV de la galanina ($1 \mu\text{g}$) y su antagonista, la galantida ($5 \mu\text{g}$), sobre la ingesta en *C. auratus* a las 2 h. Los datos se representan como $\bar{x} + \text{e.e.m.}$ ($n=9/\text{grupo}$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto al grupo control (doble inyección de solución salina).

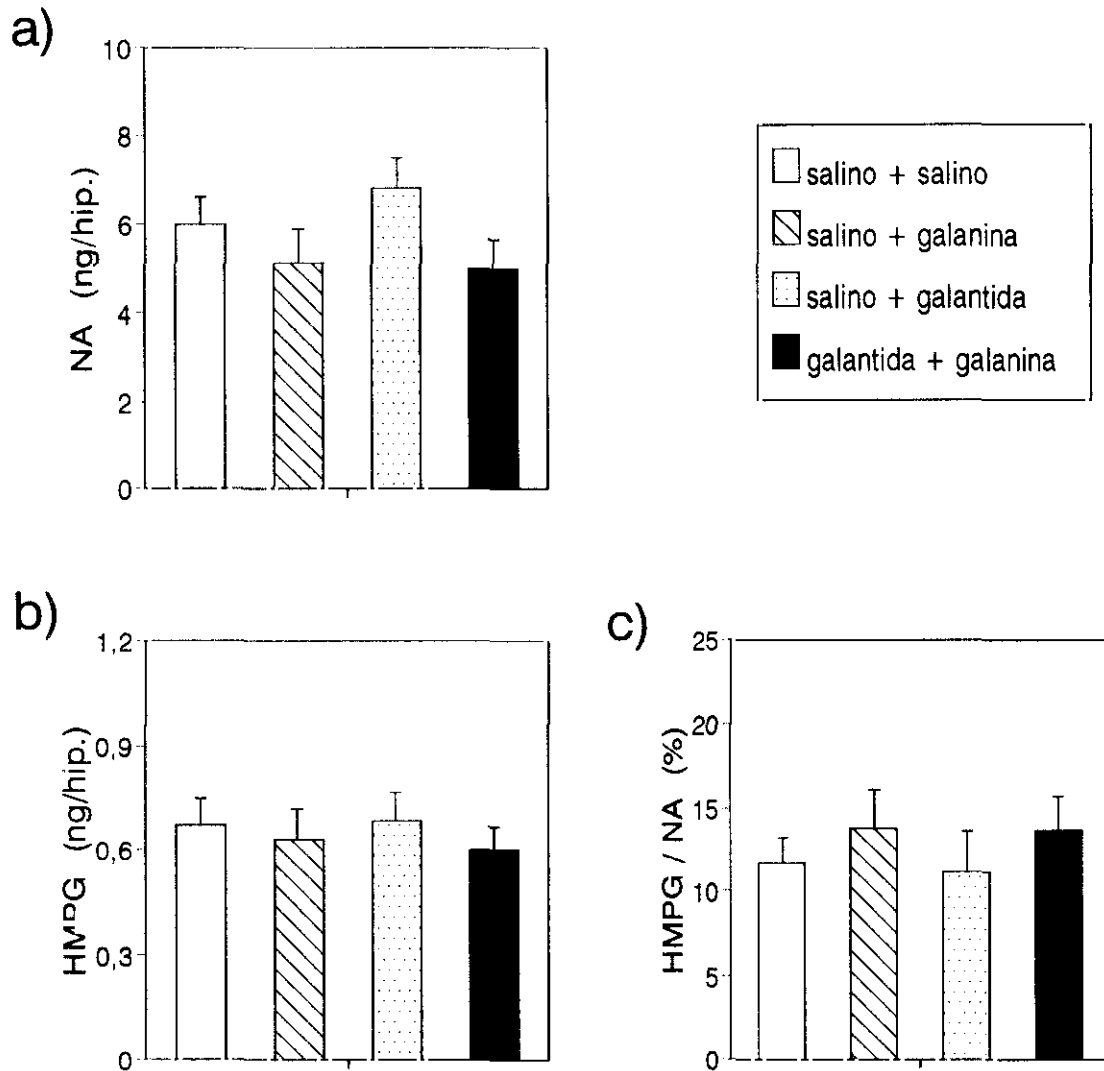


Figura 72. Efecto de la administración ICV de la galanina (1 µg) y su antagonista, la galantida (5 µg), sobre el contenido hipotalámico de a) noradrenalina, b) HMPG y c) relación HMPG/NA en *C. auratus* a las 2 h. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ (n=9/grupo).

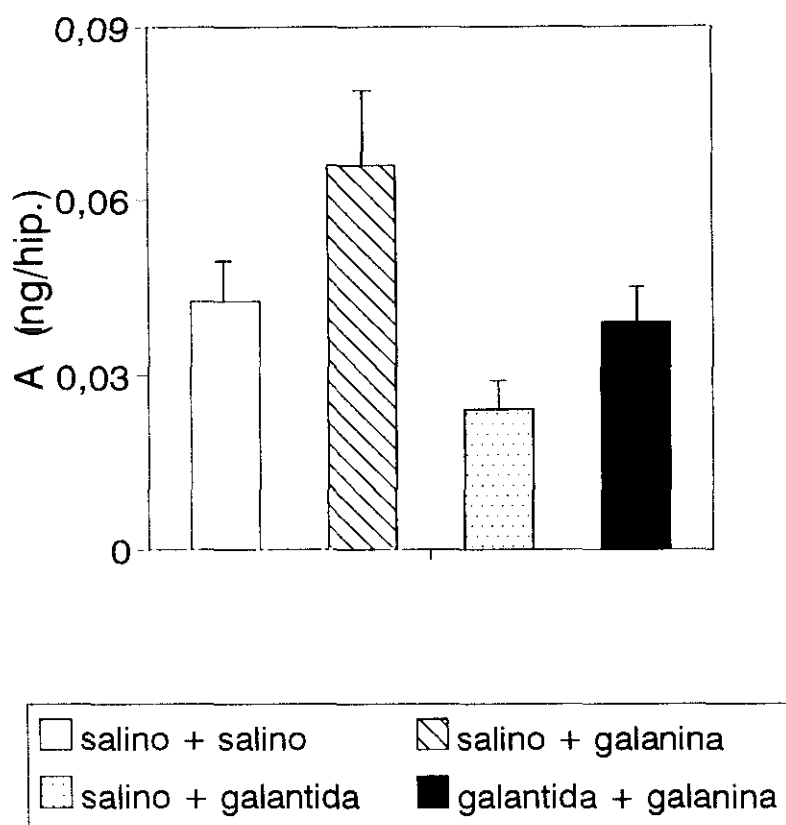


Figura 73. Efecto de la administración ICV de la galanina ($1 \mu\text{g}$) y su antagonista, la galantida ($5 \mu\text{g}$), sobre el contenido hipotalámico de adrenalina en *C. auratus* a las 2 h. Los datos se representan como $\bar{x} + \text{e.e.m.}$ ($n=9/\text{grupo}$).

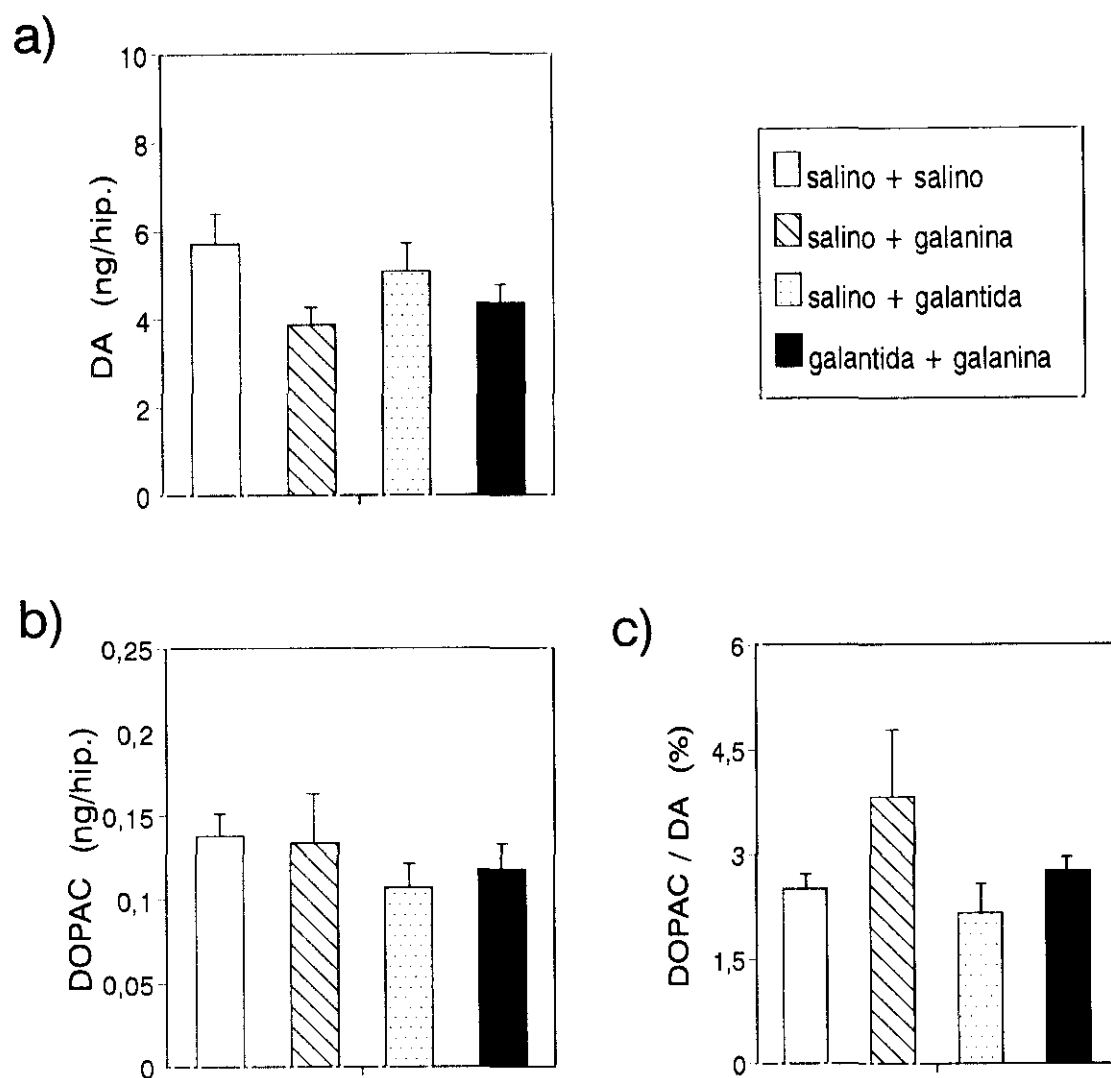


Figura 74. Efecto de la administración ICV de la galanina (1 μg) y su antagonista, la galantida (5 μg), sobre el contenido hipotalámico de a) dopamina, b) DOPAC y c) relación DOPAC/DA en *C. auratus* a las 2 h. Los datos se representan como \bar{x} + e.e.m. (n=9/grupo).

6.4. Control α -adrenérgico.

La Fig. 75 muestra los resultados obtenidos en cuanto a la ingesta tras la administración ICV de agonistas y antagonistas α -adrenérgicos sólo o en combinación con galanina (ANOVA, $p < 0001$). Es de resaltar el incremento producido por el antagonista α_1 (prazosín), de una magnitud similar al observado con la galanina ($p < 0,05$), y el efecto del pretratamiento con el antagonista α_2 (yohimbina) que revierte la estimulación de la ingesta inducida por galanina.

Tanto la galanina como los agonistas y antagonistas adrenérgicos, a las dosis utilizadas, no modifican en general el contenido hipotalámico de catecolaminas (Figs 76, 77, 78b y c), a excepción de un aumento de la dopamina ($p < 0,05$) ocasionado por la administración de yohimbina, efecto que desaparece en el grupo tratado además con galanina (Fig. 78a).

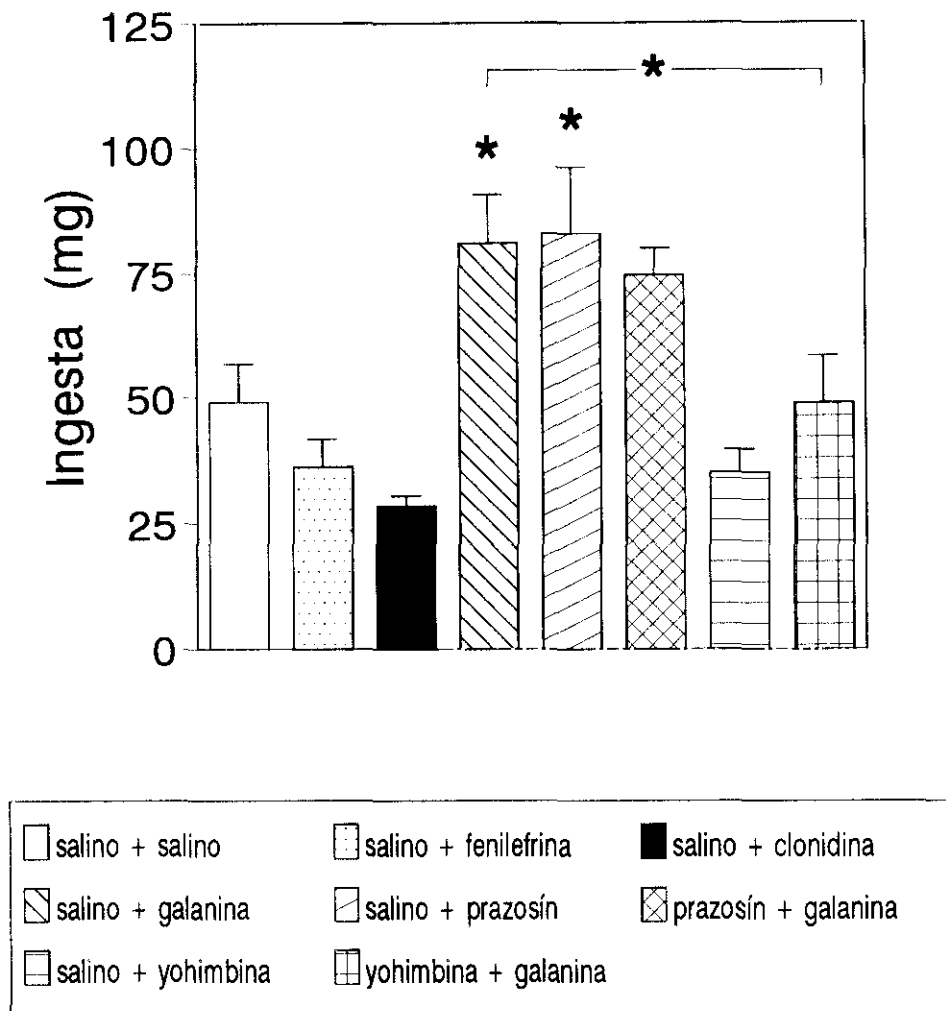


Figura 75. Ingesta en *C. auratus* a las 2 h de la administración ICV de agonistas y antagonistas α -adrenérgicos (10 μ g) de forma aislada o en combinación con galanina (1 μ g). Agonista α_1 , fenilefrina; agonista α_2 , clonidina; antagonista α_1 , prazosín y antagonista α_2 , yohimbina. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=8-9$ /grupo). * $p < 0,05$ respecto al grupo control (doble inyección de solución salina).

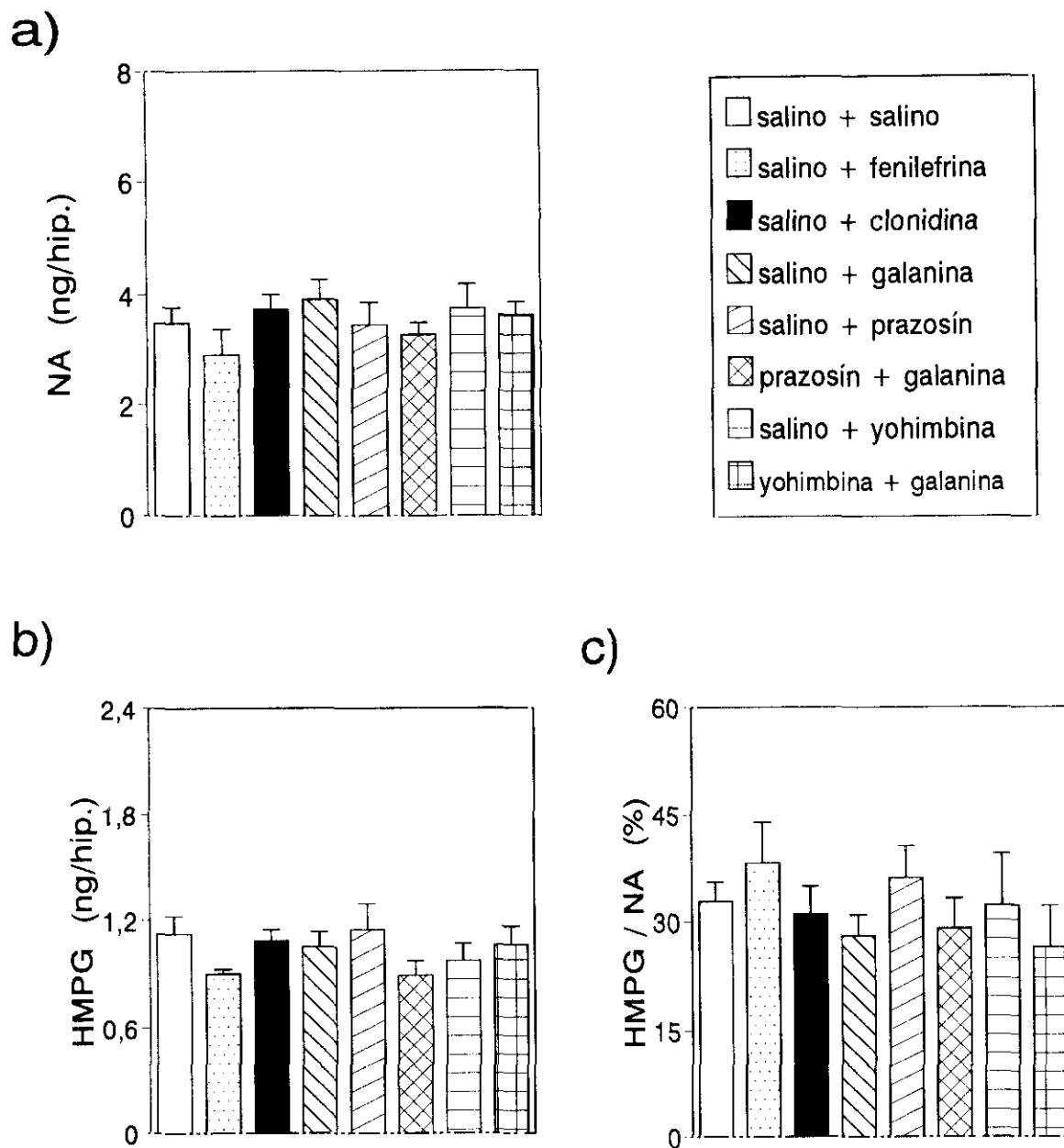


Figura 76. Contenido hipotalámico de a) noradrenalina, b) HMPG y c) relación HMPG/NA en *C. auratus* a las 2 h de la administración ICV de agonistas y antagonistas α -adrenérgicos ($10 \mu\text{g}$) de forma aislada o en combinación con galanina ($1 \mu\text{g}$). Agonista α_1 , fenilefrina; agonista α_2 , clonidina; antagonista α_1 , prazosín y antagonista α_2 , yohimbina. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=8-9/\text{grupo}$).

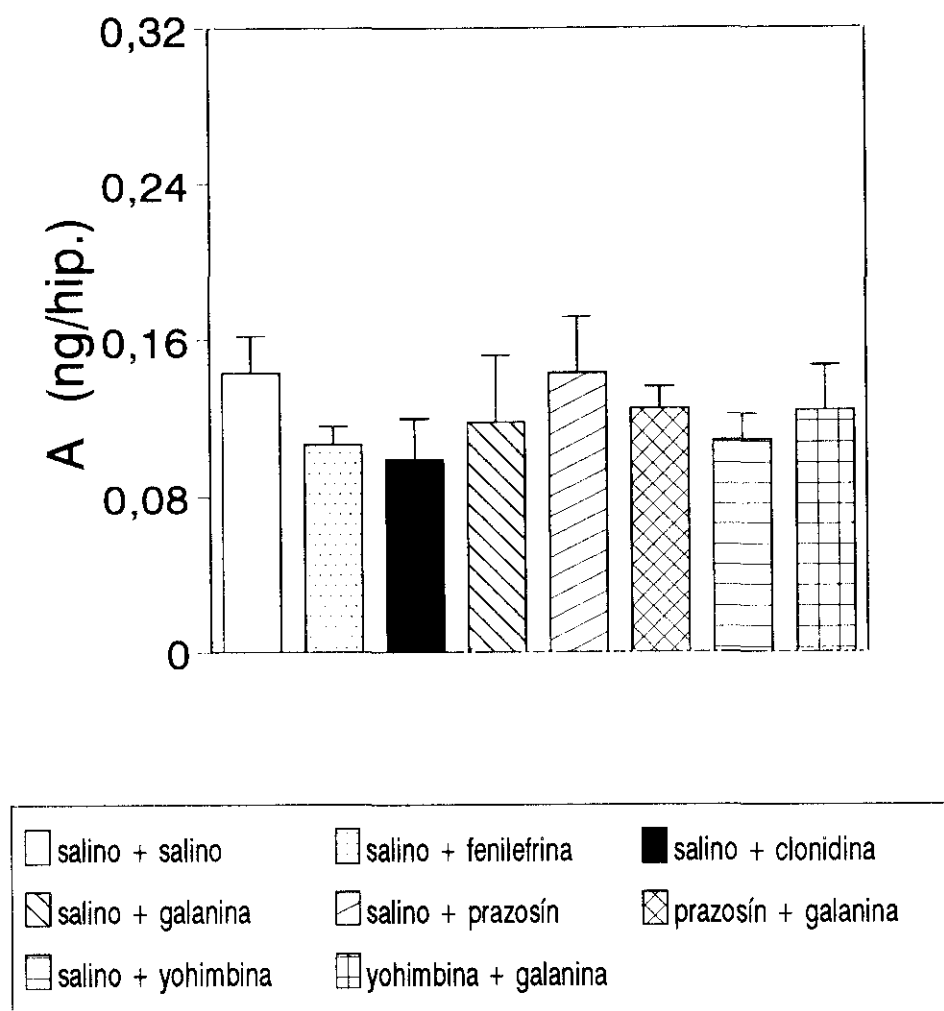


Figura 77. Contenido hipotalámico de adrenalina hipotalámica en *C. auratus* a las 2 h de la administración ICV de agonistas y antagonistas α -adrenérgicos ($10 \mu\text{g}$) de forma aislada o en combinación con galanina ($1 \mu\text{g}$). Agonista α_1 , fenilefrina; agonista α_2 , clonidina; antagonista α_1 , prazosín y antagonista α_2 , yohimbina. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=8-9/\text{grupo}$).

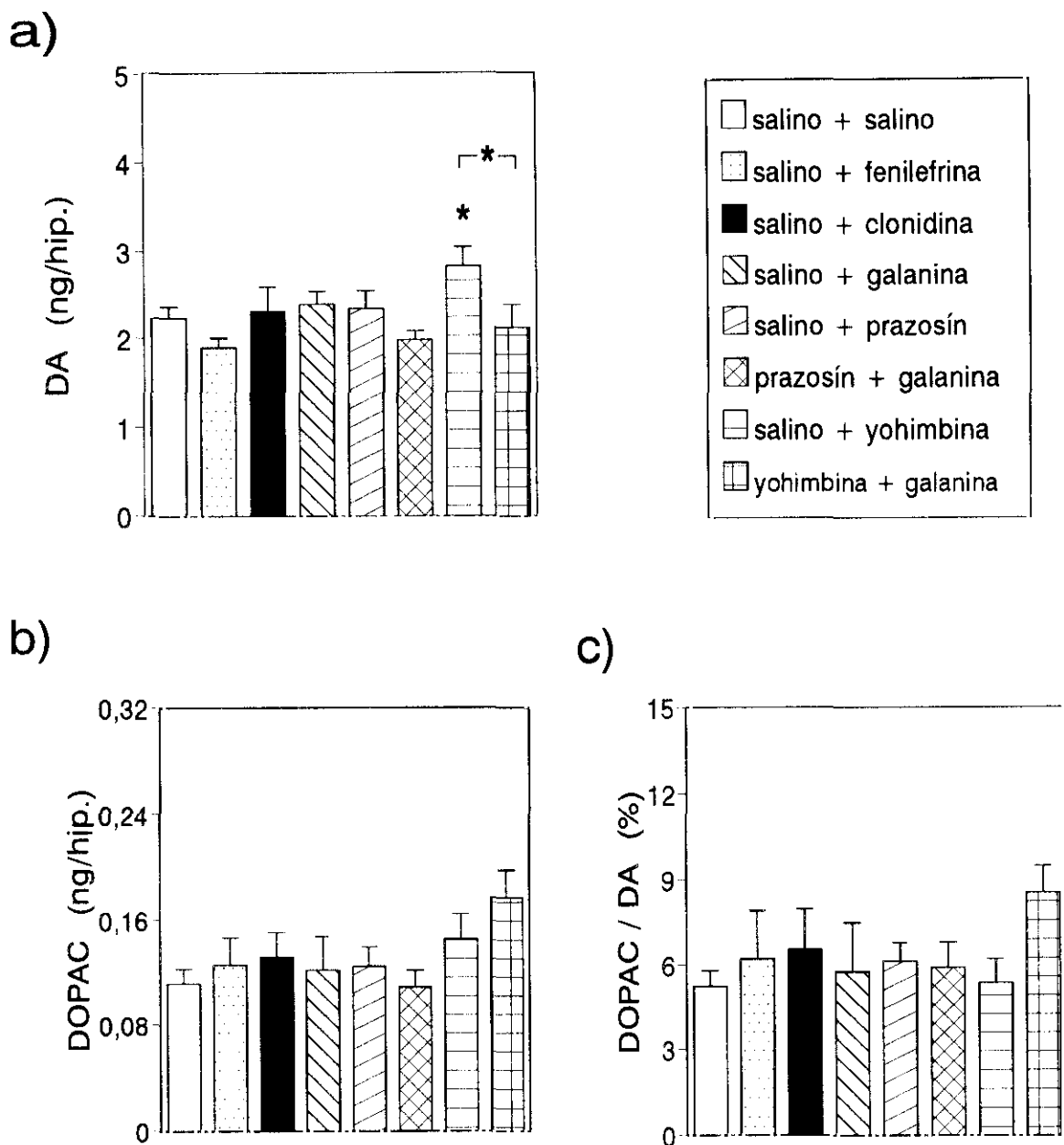


Figura 78. Contenido hipotalámico de a) dopamina, b) DOPAC y c) relación DOPAC/DA en *C. auratus* a las 2 h de la administración ICV de agonistas y antagonistas α -adrenérgicos ($10 \mu\text{g}$) de forma aislada o en combinación con galanina ($1 \mu\text{g}$). Agonista α_1 , fenilefrina; agonista α_2 , clonidina; antagonista α_1 , prazosín y antagonista α_2 , yohimbina. Los datos se representan como $\bar{x} + e.e.m.$ ($n=9/\text{grupo}$). * $p < 0,05$ respecto al grupo control (doble inyección de solución salina).

V. DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN ALIMENTARIO EN *Tinca tinca*.

1.1. Determinación del patrón alimentario.

La conducta alimentaria de un pez dentro de un grupo puede inducir un comportamiento similar en los otros miembros del grupo (Spieler, 1992). Por ejemplo, se ha descrito un comportamiento gregario respecto a la actividad alimentaria en *C. auratus*, de manera que cuando un pez localiza una fuente de alimento, indica su presencia al resto de los peces, estableciéndose grupos de alimentación (Magurran, 1984 y observaciones propias). Nosotros hemos observado un comportamiento similar en *T. tinca*, cuyo gregarismo es aún más acentuado, reflejándose también en su actividad nadadora, que se realiza en grupos dentro de un mismo acuario. Cuando estudiamos el patrón de ingesta de las tencas durante 12 h, observamos que un 70% de la ingestión de alimento se realiza en el período de 4-8 h, siendo únicamente de un 15% en las primeras 4 h. Este hecho puede ser explicado si tenemos en cuenta que el estudio se realizó en acuarios individuales, y por tanto, los peces acostumbrados a un comportamiento en grupo, al estar separados podrían tardar más en localizar la comida, lo que en parte se confirma cuando comparamos la ingesta realizada por a) tencas individuales (Fig. 22a) y b) en grupo, en el estudio de correlación de parámetros metabólicos y hormonales con la ingesta a distintos tiempos (véase apartado 3.2.2. de Resultados), de manera que, aunque la ingestión total de alimento a las 8 h es similar en ambos casos (a: 342 mg, b: 336 mg), durante el período 0-4 h es inferior en las tencas mantenidas aisladas en acuarios individuales (a: 60 mg, b: 98 mg).

Además, Spieler (1992) ha indicado que el ruido, cambios ligeros del nivel del agua, cambios en la iluminación, la presencia de un observador, o incluso perturbaciones menores como la apertura o cierre de una puerta, pueden producir cambios en las tasas de ciertas actividades. Por tanto, considerando que las tencas son animales muy asustadizos y fácilmente estresables, resultaría fácil justificar una ingesta reducida durante las primeras horas del estudio como consecuencia de la manipulación y el cambio a un hábitat nuevo antes de iniciar dicho estudio (efectos que eran presentes en menor proporción en el experimento comentado de las tencas alimentadas en grupo).

Por otra parte, puesto que el período de máxima ingestión de alimento en las tencas (4-8 h) coincide con el inicio y se extiende durante la fase oscura del fotociclo diario, podríamos suponer que la ingesta durante dicha fase oscura fuera mayor que durante la fase luminosa. Esta hipótesis se ha demostrado posteriormente cuando realizamos el análisis del ciclo diario de alimentación en esta especie (Fig. 23a), en el que se pone de manifiesto una ingesta mayor durante la noche en relación con la alimentación durante el día.

Resumiendo, los resultados obtenidos en esta determinación inicial del patrón alimentario de *T. tinca*, nos llevaron a considerar el período de 0-8 h como el óptimo para los estudios de comportamiento alimentario que, necesariamente y a pesar de los problemas que pueden suponer, requerían ser realizados de forma individual.

La discusión referente a los resultados obtenidos sobre los efectos de la anestesia y de las inyecciones ICV de solución salina sobre la ingesta se lleva a cabo conjuntamente con *C. auratus* en el apartado siguiente.

1.2. Determinación de parámetros metabólicos y hormonales.

Los datos referentes a los ciclos diarios de determinados parámetros metabólicos y hormonales ponen de manifiesto por primera vez en *T. tinca* la existencia de cambios a lo largo del fotociclo diario de los niveles de cortisol y glucosa plasmáticos, glucógeno hepático y catecolaminas hipotalámicas. La actividad *N*-acetiltransferasa, utilizada en esta Memoria como parámetro indicador de ritmicidad en las tencas, presenta, como se ha descrito en la mayoría de vertebrados estudiados (Falcón y cols, 1992), el característico perfil rítmico, con niveles elevados durante la fase oscura y valores muy bajos durante el período diurno. En distintas especies de peces se han descrito ritmos circadianos de la actividad locomotora, cortisol, insulina y glucosa circulantes, contenido hepático y muscular de glucógeno, etc., siendo la alimentación el factor determinante de dichos ritmos ("zeitgeber"), aunque dentro de la misma especie no todos los ritmos responden a este estímulo (véase rev. Spieler, 1992). Por ejemplo, en *C. auratus* una única comida es un potente estímulo en lo que se refiere al ritmo de cortisol y actividad locomotora, pero no para la tiroxina (Spieler y Noeske, 1984). En nuestro estudio, a excepción de la NAT y el cortisol, el resto de los parámetros estudiados presentan un perfil similar, con un máximo en el mediodía, que corresponde a las 4 h de la administración diaria de alimento. Con nuestros resultados no podemos asegurar que la alimentación sea el factor determinante de estas oscilaciones día/noche, aunque es bastante probable si comparamos con el perfil de la actividad NAT, determinado por el

fotoperíodo, y que no presenta oscilaciones diurnas dependientes de la alimentación. Para poder discriminar los efectos de la luz y de la alimentación como sincronizadores de dichos ritmos, sería necesario realizar estudios utilizando fotoperíodos de duración variable y manteniendo constante la hora de alimentación, y viceversa, como los realizados por Spieler y Noeske (1984), y Cook y Eales (1987) en teleósteos. No obstante, nuestro objetivo inicial era conocer en una primera aproximación experimental las variaciones de determinados parámetros a lo largo de un ciclo diario de alimentación en las condiciones estándares de laboratorio para la especie *T. tinca*, sin profundizar en el estudio de posibles ritmos circadianos, dada la complejidad que conlleva este tipo de análisis.

Los niveles plasmáticos de cortisol en *T. tinca* presentan un mínimo durante la fotofase y un máximo al inicio de la fase oscura tras la aclimatación a un fotoperíodo natural 15L:9D y a un horario fijo de alimentación (11:00 h por la mañana, en la primera mitad de la fase luminosa). Este perfil coincide con los resultados obtenidos en *Salmo salar* en la misma época del año (abril, fotoperíodo 14L:10D), donde los valores de cortisol más altos se encontraron durante la noche (Thorpe y cols, 1987). Audet y cols, (1986) encontraron un mínimo durante la fase luminosa, pasado el mediodía, en *Gasterosteus aculeatus* mantenidos en un fotoperíodo similar al nuestro (14L:10D), aunque sin llegar a mostrar significación estadística, y que desaparecía con el fotoperíodo inverso. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en estos estudios no se fijó la hora de la alimentación, considerándose únicamente al fotoperíodo como estímulo capaz de sincronizar estos ritmos de cortisol circulante. Sin embargo, el horario de la alimentación debe tenerse en cuenta como posible sincronizador, llegando incluso a ser más importante que el fotoperíodo cuando los animales se alimentan regularmente a la misma hora. Concretamente, en *C. auratus* la acrofase del ritmo de cortisol tiene lugar 4-6 h antes de la hora habitual de la alimentación (Spieler y Noeske, 1984) y en *S. trutta* este máximo previo a la alimentación (pico de prealimentación) ocurre 5-9 h antes de ésta (Pickering y Pottinger, 1983). En nuestro estudio, la máxima amplitud en el ritmo diario de cortisol en las tencas se ha observado durante la fase oscura, 13 h antes del inicio de la alimentación, no pudiéndose considerar este máximo nocturno como el pico de prealimentación descrito en *C. auratus* y *S. trutta*. Parece, por tanto, que las variaciones de cortisol observadas en nuestro estudio responderían tanto al fotoperíodo como al horario de la alimentación, pudiendo interaccionar ambos sincronizadores.

Tanto la dieta como el horario de la alimentación pueden modificar las variaciones cíclicas de glucosa en sangre y glucógeno hepático en los peces (Spieler, 1992).

Concretamente, en nuestro estudio la glucosa plasmática y el contenido de glucógeno hepático presentan básicamente un perfil similar, con un máximo a las 4 h de la alimentación, coincidiendo con el mediodía, seguido de un descenso progresivo, de manera que a las 8 h de recibir el alimento, aún se observan niveles superiores a los encontrados en el primer punto del ciclo (10:00 h). El hecho de que en el estudio de correlación de estos parámetros (glucosa circulante y glucógeno hepático) con la ingestión de alimento a distintos tiempos en *T. tinca*, realizado bajo un fotoperíodo 12L:12D (luz a las 4:00 h) y manteniendo el horario de la alimentación (apartado 2.5.2.2.a), observemos un incremento de ambos parámetros a las 4 y 8 h (menor a las 8 h) de ofrecer el alimento (Fig. 27) sería una prueba a favor de que los máximos diurnos observados en la glucosa circulante y el glucógeno hepático en *T. tinca* vienen determinados principalmente por la alimentación. De hecho, en los teleósteos se ha demostrado una relación entre la alimentación y los niveles de glucosa en sangre (véase rev. Walton y Cowley, 1982). Por ejemplo, se han descrito incrementos de glucosa a las 6 h siguientes de la alimentación en *Limanda limanda* (Fletcher, 1984b), mientras que un estudio reciente no encontró tales incrementos postprandiales de glucosa en la perca (Anderson y Braley, 1993). Esta última respuesta parece deberse a un bajo nivel de carbohidratos en la dieta, como demostraron Furuichi y Yone (1981) en otras especies de peces, donde la glucosa incrementa 1, 2 y 3 h después de una ingesta con un nivel de un 20% (pero no de un 10%) de carbohidratos en la dieta. En todos los casos, de forma general, la glucosa plasmática aumenta rápidamente después de la ingestión de alimento, retornando lentamente a los niveles existentes en pre-alimentación. Por otra parte, en el caso del glucógeno aparece un segundo pico a la medianoche, que sería independiente de la alimentación, actuando, así, tanto el fotoperíodo como la alimentación, como sincronizadores del ritmo de glucógeno hepático.

En el estudio de las oscilaciones diarias de catecolaminas hipotalámicas en tenca, encontramos niveles elevados durante el período de luz, principalmente de adrenalina (A) y dopamina (DA) y menos pronunciado de noradrenalina (NA). Estos máximos diurnos parecen venir determinados principalmente por la alimentación, ya que se observaron únicamente a las 4 h de realizar la ingestión de alimento, siendo bastante homogéneos los valores encontrados en el resto de las horas muestreadas, tanto diurnas como nocturnas. Se ha descrito un ritmo circadiano en las catecolaminas (NA, A y DA) encefálicas en *Anguilla anguilla*, encontrándose unos niveles inferiores, principalmente de NA y DA, durante el período de oscuridad del fotociclo diario, coincidiendo con el período de máxima actividad

nadadora (Bras, 1979). Si bien los niveles de catecolaminas en este estudio son sensiblemente inferiores a los cuantificados por nosotros, lo que puede deberse al hecho de que se determinaron en el encéfalo entero y nosotros medimos en el hipotálamo, no obstante, sin duda, la razón más importante de esta discrepancia se debe al método utilizado, espectrofluorimetría, frente al comúnmente utilizado en la actualidad, HPLC con detección electroquímica, que es mucho más sensible, siendo las medidas presentadas por nosotros en esta Memoria similares a las de otros autores que utilizan el mismo método de determinación de catecolaminas encéfalo (Caroff y cols, 1986; Sloley y cols, 1986, 1991 y 1992; Guerrero y cols, 1990). La posible relación de las catecolaminas hipotálamicas y la alimentación será discutida con más profundidad cuando tratemos los estudios de ayuno moderado y prolongado en *C. auratus*.

Los peces han adoptado diferentes estrategias para responder a períodos de privación de alimento. Dependiendo de la especie, pueden variar las reservas metabólicas utilizadas, en unos casos manteniéndose el glucógeno, mientras se metabolizan lípidos, o proteínas, o ambos tipos de reservas, en otros conservándose los lípidos con utilización de las reservas de glucógeno (véase rev. Baanante y cols, 1991; Sheridan y Mommsen, 1991). Además, dentro de una misma especie, se han desarrollado respuestas diferentes dependiendo de la duración del período de ayuno, por ejemplo, *Oncorhynchus kisutch* presenta una estrategia a corto plazo que implica una movilización parcial de la reserva hepática de glucógeno, y una estrategia a largo plazo, con movilizaciones de lípidos y proteínas (Sheridan y Mommsen, 1991). Un incremento en el flujo metabólico, necesario para mantener la actividad, es posible durante períodos cortos de ayuno, pero esta respuesta durante períodos prolongados tendría como resultado una pérdida excesiva de energía. Una estrategia alternativa, como la que utiliza la perca, sería reducir el metabolismo hasta que aumenta de nuevo la disponibilidad de alimento (Foster y Moon, 1991).

Se ha demostrado en algunas especies que durante períodos cortos de ayuno como una semana, los niveles de glucosa se mantienen relativamente altos, como consecuencia de una movilización del glucógeno hepático (Sheridan y Mommsen, 1991). Sin embargo, las reservas de glucógeno son limitadas y si se prolonga el período de ayuno, cesará la movilización de glucógeno, y disminuirán los niveles de glucosa circulante (Tranulis y cols, 1991), o podrían mantenerse valores normales de glucosa si aumenta la gluconeogénesis (Baanante y cols, 1991; Sheridan y Mommsen, 1991). Los resultados obtenidos tras una

semana de ayuno en *T. tinca*, donde los niveles plasmáticos de glucosa, el contenido hepático de glucógeno, así como el índice hepatosomático (IHS) se vieron fuertemente reducidos, parecen reflejar la estrategia antes mencionada (disminución tanto de glucógeno como de glucosa) que se ha descrito para períodos de ayuno más bien prolongados (3 semanas). De hecho, efectos similares a los descritos en nuestro estudio han sido observados en períodos de ayuno mucho más largos (7 semanas) en la perca (Foster y Moon, 1991), trucha (Navarro y cols, 1992), salmón y bacalao (Sundby y cols, 1991).

Las reducciones de los niveles plasmáticos de glucosa y el contenido hepático de glucógeno tras una semana de ayuno en *T. tinca*, fueron revertidas con la realimentación hacia los valores encontrados en los animales alimentados diariamente. Estas respuestas durante la transición ayuno-alimentación después de períodos prolongados de ayuno han sido observadas en otras especies de teleósteos, donde se ha encontrado una síntesis rápida de glucógeno hepático como respuesta a la realimentación (véase rev. Baanante y cols, 1991). Por otro lado, se ha descrito en los peces que tras diferentes períodos de ayuno la realimentación restablece los niveles de glucosa en sangre, por ejemplo, a los 8 días de realimentación tras 50 días de ayuno (Navarro y cols, 1992), y a las 2 h de realimentación después de 24 h de ayuno (García de Frutos y cols, 1991).

Ciertos estudios realizados en peces ponen de manifiesto que el patrón de alimentación influye de manera importante sobre la actividad del eje tiroideo. Concretamente, la actividad tiroidea de los salmónidos muestra respuestas marcadas, tanto crónicas como agudas, al alimento (véase rev. Eales, 1988).

Los resultados en cuanto a la influencia de la alimentación sobre la actividad tiroidea en *T. tinca* indican que el ayuno (una semana) induce un descenso significativo en el contenido tiroideo de FT₄ y en los niveles plasmáticos de las hormonas tiroideas (HT). Nuestro trabajo constituye la primera aportación sobre el contenido tiroideo de las fracciones libres (F) y unidas (B) de T₃ y T₄ en relación con el comportamiento alimentario en los peces (De Pedro y cols, 1995a y b). La fracción libre representa la cantidad de hormona, procedente de la proteólisis de la Tg, preparada para ser liberada al torrente circulatorio (Haibach, 1971), mientras que la fracción unida representaría la hormona que ha sido sintetizada en el seno de la Tg y que permanece en el lumen folicular antes de ser internalizada y procesada por las células foliculares (Rousset, 1991). Teniendo en cuenta estas consideraciones, la principal consecuencia del ayuno a nivel tiroideo en *T. tinca* es una

reducción en la liberación de T_4 , un efecto que ha sido previamente sugerido en otros teleósteos (Eales, 1988), donde el ayuno provoca una reducción en la respuesta tiroidea a TSH (Leatherland, 1982) y en los niveles plasmáticos de T_4 y su aclaramiento renal (Higgs y Eales, 1977). También, en los homeotermos se ha observado una supresión de las acciones de la TRH y la TSH tras el ayuno (Hugues y cols, 1984; Kinlaw y cols, 1985; Mitchell y Raza, 1986).

En la mayoría de los vertebrados estudiados, se puede admitir que el ayuno produce una reducción de los niveles plasmáticos de HT y, en general también, de la conversión periférica de T_4 a T_3 (véase rev. Eales, 1988). Nuestros datos tras una semana de ayuno confirman esta reducción de las HT plasmáticas en los teleósteos. En cambio, no observamos modificaciones significativas de la proporción T_3/T_4 plasmática, como índice aproximado de la monodesyodación periférica, por lo que las reducciones plasmáticas de HT podrían deberse más bien a una reducción en la secreción tiroidea de T_4 que en la conversión periférica de T_4 a T_3 , como ha sido sugerido por Kinlaw y cols (1985) en la rata. También debemos considerar la posibilidad de que otros ejes endocrinos que pueden interaccionar con el tiroideo se vean modificados por el ayuno. En este sentido, se ha observado que la restricción de alimento incrementa los niveles de corticosteroides (Murphy y Wideman, 1992), que a su vez podrían inducir una reducción de los niveles plasmáticos de HT (Vijayan y Leatherland, 1989; Brown y cols, 1991), así como alteraciones de la desyodación periférica (Vijayan y cols, 1988).

Estudios sobre los efectos de la realimentación en los peces, ponen de manifiesto que ésta revierte los efectos inducidos por el ayuno. Concretamente, en los salmónidos se han demostrado elevaciones tanto de T_3 como de T_4 plasmáticas, 4 h después de la realimentación tras 3 (Himick y Eales, 1990) y 6 días de ayuno (Flood y Eales, 1983). De forma similar, la realimentación en *T. tinca* revierte los efectos del ayuno (7 días) sobre la actividad tiroidea (reducción de FT_4 tiroidea y HT plasmáticas), aunque conviene indicar que en este estudio la realimentación fue durante 2 días consecutivos, ya que, el primer día de presentación de la comida tras el ayuno las tencas emplearon más tiempo en ingerir el alimento ofrecido, por lo que prolongamos el período de realimentación para asegurarnos una ingesta total del alimento a las 4 h de suministrarlo. El efecto de la realimentación observado en *T. tinca* tras una semana de ayuno es también apoyado por la observación de un aumento de los niveles plasmáticos de HT en las tencas, a las 4 y 8 h (sólo significativo a las 8 h) de recibir la ración diaria de comida respecto a los peces que se sacrificaban antes de recibirla (Fig. 28).

Por último, comentar que esta acción estimuladora de la realimentación también ha sido demostrada en otros vertebrados, donde una única comida revierte el efecto supresor del ayuno sobre las acciones de la TRH y la TSH (Hugues y cols, 1984; Mitchell y Raza, 1986).

Las diferencias observadas en los niveles plasmáticos de T_3 entre las tencas del experimento en ayuno (Fig. 32) y del experimento en que se evalúa la correlación de la ingesta y parámetros hormonales a distintos tiempos (Fig. 28) pueden ser debidas a variaciones estacionales descritas en la actividad tiroidea (véase rev. Brown, 1988; Grau, 1988). De hecho, numerosos trabajos realizados en los peces han demostrado que, en general, los niveles plasmáticos de HT son más elevados en primavera y verano (Chakraborti y Bhattacharya, 1984; Leatherland, 1987; Stryjek-Kaminska y cols, 1988; Sower y Fawcett, 1991). Una posible diferencia estacional justificaría los niveles elevados de T_3 en el experimento de ayuno realizado en primavera (fotoperíodo 15L:9D) respecto al experimento de correlación de ingesta y HT realizado en animales aclimatados a un fotoperíodo 12L:12D, que representaría un fotoperíodo típico de finales de invierno. Puesto que la temperatura en ambos experimentos era similar y constante, $21 \pm 2^\circ\text{C}$, las posibles diferencias estacionales observadas en *T. tinca* se deberían principalmente al fotoperíodo y no a la temperatura, confirmando que la función tiroidea en ectotermos no parece estar directamente relacionada con la temperatura (véase rev. Brown, 1988).

En nuestro estudio, hemos observado que el ayuno provoca un descenso paralelo de los niveles plasmáticos de HT y glucosa tanto en *T. tinca* como en *C. auratus* (De Pedro y cols, 1995a), que es revertido tras dos días de realimentación en las tencas. Esto podría indicar una interacción de ambas respuestas, como de hecho ha sido sugerido por Himick y Eales (1990) en *Oncorhynchus mykiss*, donde parece que la elevación postprandrial de los niveles plasmáticos de T_4 se debería a una mayor secreción tiroidea de esta hormona inducida por la elevación de los niveles de glucosa en sangre, como también se ha sugerido en ciclóstomos (Plisetskaya y cols, 1983). Además, estudios realizados en *O. mykiss*, utilizando dietas isocalóricas con distinto contenido en carbohidratos, proteínas y lípidos han puesto de manifiesto que únicamente las dietas ricas en carbohidratos, que producen una elevación de los niveles plasmáticos de glucosa, son capaces de inducir una elevación también de la T_4 plasmática (Himick y cols, 1991). El incremento de los niveles plasmáticos de dicha hormona como respuesta a la alimentación podría desempeñar un papel en la regulación del metabolismo de carbohidratos a corto plazo, contrarrestando la hiperglucemia, en los peces. No obstante, de momento se desconoce el mecanismo por el cual la glucosa estimula la

liberación de T_4 tiroidea, pudiendo ser por una estimulación directa del tejido tiroideo o a través del eje hipotálamo-hipofisario.

La naturaleza del tejido tiroideo en la mayoría de los telósteos, en forma de folículos tiroideos dispersos, imposibilita su extracción, por lo que el número de trabajos en los que se determinan las HT en el tiroides es escaso en los peces, siendo nuestros estudios de los pocos que llevan a cabo este análisis. El hecho de que nosotros cuantifiquemos HT, concretamente T_3 , en el tiroides, inicialmente contrasta con estudios anteriores en peces, donde se ha sugerido una secreción tiroidea única de T_4 (Grau y cols, 1986; Kühn y cols, 1986). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en dichos estudios las HT no son cuantificadas directamente en el tiroides, sino en medio de cultivo o plasma evaluando las HT secretadas, y no siendo, por tanto, comparable a nuestras determinaciones de la fracción libre y unida de las HT en el seno del tiroides. Por otro lado, en un estudio reciente se ha llevado a cabo un análisis de la cantidad total de HT en el tiroides del perciforme *Oreochromis niloticus* (Byamungu y cols, 1992), encontrando valores similares a los obtenidos en nuestro estudio, tanto de T_4 como T_3 , aunque lógicamente la cantidad de T_3 es significativamente menor que la de T_4 , apoyando la conocida síntesis y secreción preferencial de T_4 por el tiroides en todos los vertebrados estudiados.

La obtención de conclusiones firmes acerca de la actividad tiroidea es un poco arriesgada con los datos disponibles. No obstante, consideramos que las observaciones realizadas resultan interesantes, aun pudiendo considerarse en cierta medida especulativas. En este sentido, la determinación de la actividad 5'D, la rT_3 o la tasa de recambio de las HT, la peroxidasa tiroidea y la concentración de TSH serían de bastante ayuda en la interpretación de los resultados.

El ayuno durante 7 días provoca un aumento en los niveles de NA y DA hipotalámicas en la tenca, situación inversa a la encontrada en la carpa (véase apartado siguiente, pág. 214). A priori y sin datos del metabolismo catecolaminérgico, resulta difícil explicar estos resultados. No obstante, hemos de considerar por un lado, las diferencias de especie que condicionan distintos patrones alimentarios, y por otro, el carácter fácilmente estresable de las tencas y la situación de estrés que supone el ayuno, lo que condicionaría una respuesta distinta. De hecho, en las tencas el ayuno altera de tal manera la conducta en esta especie, que los animales no son capaces de responder, como ya hemos comentado anteriormente, ante el estímulo que supone la presentación nuevamente de comida, hasta

pasados dos días, mientras que en las carpas a las 4 h de la primera comida tras el ayuno se revierten ya ciertos efectos inducidos por el mismo sobre las catecolaminas hipotalámicas.

2. REGULACIÓN DE LA INGESTA POR EL CRF.

2.1. Efecto del CRF sobre la ingesta.

En la optimización del test de ingesta en *C. auratus* realizado durante 8 h, observamos que la cantidad de alimento ingerido durante las dos primeras horas (127 mg, 45% del total) es similar al consumido durante las siguientes 6 horas (160 mg, 55% del total), lo que indica que ante la presencia de comida, las carpas inician rápidamente la ingesta, y a medida que los animales se van saciando, disminuye la tasa de ingesta/h, que se refleja en una pendiente menor de la recta que relaciona ingesta frente a tiempo en el último período de alimentación estudiado (Fig. 34a). Consideramos, por tanto, como óptimo para los estudios sobre el comportamiento alimentario en *C. auratus* el período correspondiente a las 2 primeras horas.

En los estudios realizados sobre los efectos de los neuropéptidos, y en especial con el CRF, un péptido conocido por mediar las repuestas ante el estrés (véase rev. Dunn y Berridge, 1990), resultan interesantes los llamados "controles intactos", animales que no han sido tratados ni con la droga en cuestión ni con solución salina, para poder descartar los posibles efectos debido al estrés asociado a la manipulación del animal durante la experimentación. Para ello, tanto en *C. auratus* como en *T. tinca* estudiamos el efecto de la anestesia y de la inyección ICV de solución salina sobre la ingesta, respecto a individuos "intactos", demostrando en ambas especies que ninguna de las dos "manipulaciones" realizadas provocan alteraciones significativas de la ingestión de alimento, no siendo estrictamente necesario, por tanto, incluir unos "controles intactos" en cada experimento.

En el presente estudio, hemos encontrado que el CRF (1 y 2 μ g) administrado ICV ejerce un efecto inhibitorio de la ingesta a las 2 h del tratamiento en *C. auratus* (De Pedro y cols, 1993). Estos resultados confirman por primera vez en peces, trabajos previos en los mamíferos, en los que el CRF reduce la conducta alimentaria inducida por privación de alimento a tiempos cortos, concretamente en la rata (Britton y cols, 1982; Morley y

Levine, 1982; Gosnell y cols, 1983; Arase y cols, 1988; Ahlers y Salander, 1993), ratón (Rosenthal y Morley, 1989; Drescher y cols, 1994), conejo (Opp y cols, 1989), cerdo (Parrot, 1990) y mono (Glowa y Gold, 1991; Glowa y cols, 1991), y entre los poiquilotermos, en larvas de anfibios anuros (Corpas y cols, 1991).

El efecto supresor del CRF sobre la ingesta a las 2 h es contrarrestado durante las 6 h siguientes, de manera, que a las 8 h del tratamiento, la ingestión de alimento en la carpa dorada no se modifica respecto a los controles. La mayoría de los estudios, realizados en los mamíferos, en relación con los efectos del CRF sobre el comportamiento alimentario, evalúan la ingesta durante las 2 primeras horas después del tratamiento, mostrando una acción inhibitoria del CRF durante este tiempo (Gosnell y cols, 1983; Krahn y cols, 1986; Arase y cols, 1988; Parrot, 1990). Sin embargo, no se ha encontrado un efecto anorético del CRF cuando la ingesta se determinaba a las 4 (Gosnell y cols, 1983; Arase y cols, 1988) u 8 (Oohara y cols, 1993) horas del tratamiento en las ratas. Estos resultados sugieren que el CRF inhibe la ingesta sólo a tiempos cortos, desapareciendo esta acción unas horas después. Por tanto, el incremento de la ingesta observado en *C. auratus* durante el intervalo 2-8 h podría tratarse de un efecto rebote de compensación de la reducción inicial.

Cuando administramos intracerebroventricularmente CRF en las tencas y evaluamos la ingestión de alimento a las 8 h del tratamiento, observamos también un efecto inhibitorio de dicho péptido sobre la ingesta, resultado similar a los descritos en las larvas de *R. perezii*, donde el efecto del CRF sobre la alimentación puede persistir incluso más de 12 h. Esta diferente respuesta encontrada respecto a la acción del CRF únicamente a tiempos cortos, demostrada en *C. auratus* y mamíferos, puede ser debida a diferencias dependientes de la especie, como han sugerido Glowa y cols (1992) para las especies de mamíferos estudiadas, siendo también interesante considerar la edad de los animales y el patrón temporal de alimentación utilizado. En este sentido, el tiempo que transcurre desde la presentación del alimento hasta la iniciación del comportamiento alimentario es mayor en las tencas que en las carpas doradas, como ya hemos comentado previamente en esta Memoria.

La ausencia de modificaciones significativas en la alimentación cuando cuantificamos la ingesta 1 h después de la administración ICV del CRF (una situación similar se produce cuando inyectamos β -endorfina o galanina), resulta difícil de explicar si consideramos que dicho péptido actúa a nivel central, en cuyo caso se trataría de acciones rápidas que tienen lugar desde tiempos aún inferiores, como se ha descrito previamente para otros péptidos, por ejemplo, la bombesina y colecistoquinina en *C. auratus* (Himick y Peter,

1994a y b). Una posibilidad sería que aunque la administración es ICV, el efecto tuviera lugar periférico, por lo que necesariamente transcurriría más tiempo hasta la observación del efecto. Esta hipótesis está totalmente descartada desde el momento en que la administración IP de cualquiera de los tres péptidos no modifica la ingesta ni a las 2 ni a las 8 h después del tratamiento. Otra posibilidad sería que, aún existiendo un efecto de los péptidos a tiempos inferiores a las 2 h, el método de evaluación de la ingesta no fuera suficientemente sensible como para determinar diferencias significativas de la ingesta al cabo de 1 hora. Sin embargo, nuestro método parece más exacto que el utilizado por Himick y Peter (1994a), en el que el experimentador cuenta el número de gránulos que ingiere cada pez, extrapolando el dato a gramos de alimento ingerido a partir de la media de peso de un gránulo, detectando diferencias significativas a los 30 min de las inyecciones de bombesina. Nuestro método resulta más fiable y preciso en la medida en que se evalúa directamente la ingesta individual, restando a la cantidad inicial de alimento ofrecido la cantidad remanente después del test de ingesta. Por último, la regulación de la ingesta por estos neuropéptidos puede ser indirecta a través de otros sistemas monoaminérgicos, hormonales o incluso peptidérgicos, lo que retrasaría los efectos respecto a una acción directa de los péptidos. Con el fin de dilucidar esta posibilidad, iniciamos el estudio de las posibles interacciones con el sistema tiroideo y catecolaminérgico, que discutiremos más adelante en cada uno de los apartados correspondientes a cada neuropéptido.

El hecho de que el CRF a la dosis más alta utilizada en este estudio (3,3 μ g) no modifique la ingesta significativamente a las 2 h, pero actúe como un estimulador del apetito en las últimas 6 h en la carpa dorada, pone de manifiesto una respuesta bifásica del CRF sobre la alimentación, dependiente de la dosis. Se ha descrito, también, una respuesta bifásica para otros neuropéptidos reguladores de la ingesta, como por ejemplo, el factor liberador de la GH (GRF) en las ratas (Tanaka y cols, 1991). En la bibliografía no hay estudios sobre la regulación de la alimentación por el CRF en los peces, y las dosis seleccionadas en nuestro trabajo van desde dosis inferiores a las utilizadas en anfibios (Jacobs y Kühn, 1989; Gancedo y cols, 1992) hasta dosis similares a las utilizadas normalmente en los experimentos realizados en los mamíferos (véase rev. Glowa y cols, 1992). Esta aproximación experimental en cuanto al intervalo de dosis utilizadas, nos permite demostrar efectos opuestos del CRF, dependientes de la dosis, en los peces. En los mamíferos se ha sugerido que las respuestas comportamentales y fisiológicas a la administración ICV de CRF pueden ser clasificadas en efectos de dosis bajas y efectos de dosis altas, representando dos grados

distintos de estrés (véase rev. Dunn y Berridge, 1990). Los efectos de dosis bajas podrían corresponder a una activación moderada de los sistemas noradrenérgicos que inducirían un estado de ansiedad medio, mientras que las dosis altas de CRF podrían activar directamente las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus*, obteniéndose una combinación de efectos, los debidos al propio CRF y los asociados a la alteración en las catecolaminas. Dunn y Berridge (1990) plantean la posibilidad de la existencia de dos tipos distintos de receptores de CRF, que mediarían los efectos de dosis bajas o altas.

Estudios previos en mamíferos han indicado que la administración ICV del CRF puede activar el sistema noradrenérgico (Valentino y cols, 1991 y 1993; Page y cols, 1993) y, en general, este efecto sólo ocurre a dosis relativamente altas de CRF, más altas que las mínimas requeridas para inducir numerosos efectos comportamentales (véase rev. Dunn y Berridge, 1990). Esta activación incrementaría la liberación de noradrenalina en el SNC (Emoto y cols, 1993; Lavicky y Dunn, 1993; Lee y cols, 1994), de la que se sabe que actúa como un factor estimulador del apetito (véase rev. Leibowitz, 1986; Wellman, 1993). Así, el efecto estimulador del CRF sobre la ingesta observado con la dosis de 3,3 μg podría reflejar tal activación noradrenérgica también en los peces. Esto reflejaría, una vez más, que el control final de la alimentación viene determinado por el balance de las concentraciones de péptidos y monoaminas que están interactuando en el SNC, como ha sido previamente sugerido en los mamíferos (Morley, 1987).

La administración IP de CRF no modifica la ingesta en la carpa dorada, de manera similar a los resultados obtenidos en los mamíferos (Parrot, 1990), donde el CRF regula la alimentación cuando es administrado centralmente, sin observarse ningún efecto cuando este neuropéptido se administra periféricamente. Nuestros resultados apoyan, así, que el CRF actúa centralmente como un regulador de la alimentación en vertebrados. Algunos neuropéptidos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y pasar del líquido cefalorraquídeo a la circulación sanguínea (Banks y cols, 1992). Además, Himick y Peter (1994a y b) en sus estudios sobre el control de la alimentación por bombesina y colecistoquinina en *C. auratus*, sugieren que cuando se inyecta ICV altas dosis de neuropéptidos en los peces, una cierta cantidad de estos neuropéptidos podría perderse hacia la periferia. No obstante, las dosis de estos péptidos que pasarían a la periferia serían muy bajas, circulando, así, a una concentración muy inferior a la dosis inyectada IP, que no ejerce ningún efecto sobre la alimentación, tanto en el caso del CRF, como de la β -endorfina y la galanina. Hay que tener en cuenta, por tanto, que el hecho de que una sustancia sea activa

después de su administración central, pero no periférica, no es una prueba definitiva de que su acción sea efectivamente central, aunque es lo más probable y dicha consideración está ampliamente aceptada en este tipo de estudios (McKay y cols, 1981; Kyrkouli y cols, 1986; Parrot, 1990; Glowa y cols, 1992).

Como hemos visto en la Introducción, a partir de estudios pioneros anatómicos y de lesiones o estimulaciones eléctricas de áreas específicas del encéfalo en los peces, se ha propuesto que áreas dentro del lóbulo inferior del hipotálamo, y en particular el núcleo *recessus lateralis* (NRL), parecen estar involucradas en la regulación de la actividad alimentaria en los peces (véase rev. Peter, 1979, Demski, 1983). Puesto que los cuerpos celulares de estos núcleos hipotalámicos quedan expuestos al líquido cefalorraquídeo del sistema ventricular (Bradford y Northcutt, 1983), pueden representar un posible sitio de acción donde se median los efectos sobre la ingesta del CRF o cualquier otro neuropéptido que administremos ICV.

Se ha descrito que los niveles plasmáticos de glucosa están estrechamente correlacionados de forma positiva con la alimentación en los peces (véase rev. Walton y Cowley, 1982; Foster y Moon, 1991; Sheridan y Mommsen, 1991), de forma que cabría esperar una alteración en los niveles de glucosa como consecuencia de la reducción de la ingesta inducida por el CRF. Nosotros, en cambio, no hemos encontrado una modificación de la glucosa plasmática en ejemplares de *C. auratus* ni de *T. tinca* que mostraban una reducción de la ingesta por el tratamiento con CRF (De Pedro y cols, 1995a y b). Esta falta de efecto del CRF sobre la glucosa circulante también se ha descrito en la rata (Arase y cols, 1988) y podría ser interpretada como un solapamiento entre la reducción de glucosa inducida por la disminución de la ingesta después del tratamiento con CRF y los efectos estresantes conocidos de este péptido, entre otros, el incremento de los niveles de glucosa plasmática (Brown y cols, 1982b). Sin embargo, cuando analizamos esta posibilidad en *C. auratus*, encontramos que el CRF por sí mismo, no modifica los niveles plasmáticos de glucosa en comparación con el grupo inyectado con solución salina y que permanecía también sin comida durante el experimento (Fig. 41). Por otro lado, la realimentación incrementa los niveles de glucosa en sangre respecto a los animales mantenidos en ayuno durante dos días (Fig. 41), como ya vimos en las tencas tras una semana de ayuno (Fig. 29), coincidiendo los valores alcanzados con los valores encontrados en los animales inyectados con solución salina

o CRF y que recibían alimento, independientemente de la tasa diferente de ingesta que mostraban como consecuencia del tratamiento con CRF (Figs 37b y 39b). Nuestros resultados indican que la realimentación parece ser la señal que dispara el incremento de los niveles de glucosa en plasma, confirmando estudios previos en salmónidos, donde la alimentación produce un aumento rápido de la glucosa plasmática (Walton y Cowley, 1982). Por otra parte, en la rata al igual que en nuestro estudio, la diferente ración de alimento no parece estar relacionada con variaciones de la glucosa plasmática (Chen y cols, 1993b). Por tanto, englobando todos nuestros datos y los de la bibliografía disponible al respecto, se puede concluir que ni las diferencias en la cantidad de alimento ingerido, ni el CRF directamente por sí mismo, modifican los niveles de glucosa en ciprínidos.

2.2. Interacciones CRF-alimentación-hormonas tiroideas.

Existen datos que relacionan al CRF con la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. En este sentido, se ha demostrado que tiene una acción sobre el eje tiroideo en embriones de pollo (Meeuwis y cols, 1989), y en larvas (Denver y Licht, 1989; Gancedo y cols, 1992) y adultos (Denver, 1988; Kühn, 1990) de anfibios. Este efecto del CRF podría estar mediado y/o ser potenciado por una elevación de los corticosteroides, que incrementan la actividad hepática 5'-monodesyodasa y los niveles plasmáticos de T_3 en embriones de pollo (Decuypere y cols, 1983). Sin embargo, parece que estos efectos de los corticosteroides sobre el eje tiroideo pueden variar dependiente de la edad del animal y/o de la especie estudiada, ya que, frente a la capacidad tirotrópica propuesta, se ha encontrado también que la ACTH y los corticosteroides reducen las HT plasmáticas en pollos adultos (Mitchell y cols, 1986) y en varias especies de teleósteos (Redding y cols, 1986; Leatherland, 1988; Kühn, 1990).

Como ya mencionamos anteriormente, los ejemplares de *C. auratus* y *T. tinca* que mostraron una ingesta reducida por el CRF, tenían un menor contenido tiroideo de T_3 . Considerando que la alimentación altera la actividad tiroidea en los peces (véase rev. Eales, 1988), resultaría posible que ambas respuestas estuvieran relacionadas, de manera que la reducción de T_3 tiroidea observada tras el tratamiento con CRF podría ser debida a la reducción de la ingesta producida por este mismo péptido. Sin embargo, nuestros resultados en *C. auratus* (experimento 2.5.3.3.b, Fig. 42) demuestran que el CRF es el factor responsable de la reducción de la fracción libre de T_3 (FT_3), mientras que la realimentación no modifica el contenido tiroideo de esta hormona. Estos efectos del CRF podrían deberse

a una acción directa del péptido sobre el eje tiroideo, aunque no podemos descartar que dichos efectos sean mediados vía ACTH/glucocorticoides.

La tendencia observada en las dos especies estudiadas es que el CRF afecta tanto a la síntesis como a la liberación tiroidea de T_3 . Con los datos que tenemos no resulta fácil explicar el elevado contenido tiroideo de BT_3 en *T. tinca* cuando lo comparamos con los valores de BT_4 , si tenemos en cuenta la bien conocida preferencia del tiroides por la producción de T_4 . Por otro lado, en los experimentos realizados en invierno (Diciembre) se observaron niveles inferiores de FT_4 tiroidea, lo que podría explicarse por variaciones estacionales de la actividad tiroidea (véase rev. Brown, 1988). De hecho, en nuestro laboratorio se han descrito en *R. perezii* durante el invierno los niveles más bajos de FT_4 tiroidea de todo el ciclo anual (Gancedo y cols, 1995a). Por último, también observamos diferencias en los niveles de FT_3 tiroidea, siendo mayores tanto en individuos de *C. auratus* y *T. tinca* de los experimentos englobados en el apartado 2.5.3.3.a (Figs 38 y 40). Estas diferencias podrían explicarse en base a posibles fluctuaciones diarias del contenido de HT en peces (véase rev. Brown, 1988). En ambos experimentos los animales se aclimataron a un fotoperíodo 12L:12D, sacrificándose al principio de la fase oscura de dicho fotociclo, mientras que en el resto de los experimentos la toma de muestras se realizaba aproximadamente hacia la mitad de la fase luminosa del fotociclo correspondiente. En este sentido, recientemente, en nuestro laboratorio hemos encontrado cambios día/noche en el contenido tiroideo y plasmático de HT en anfibios, concretamente se produce un aumento de la FT_3 tiroidea al principio de la fase oscura en *R. perezii* (Gancedo y cols, 1995b), lo que apoyaría la hipótesis planteada.

Las fluctuaciones en la relación FT_3/FT_4 tiroidea podrían indicar cambios en la desyodación y/o degradación intratiroidea. Así, la reducción de FT_3 asociada al aumento de FT_4 observadas tras el tratamiento con CRF podría justificarse por una reducción en la actividad 5'-monodesyodasa (FT_3/FT_4 reducida). Esta posibilidad es apoyada por ciertos estudios que sugieren que la conversión intratiroidea de T_4 a T_3 y rT_3 , así como su secreción preferencial, puede ser modulada por el comportamiento alimentario (Abdel-Fattah y cols, 1991) o por modificaciones de la TRH y la TSH (Peeters y cols, 1992).

La realimentación tras 2 días de ayuno induce un aumento significativo del contenido tiroideo de FT_4 . Por otro lado, se ha observado un incremento similar de dicha hormona después de la administración del CRF en los animales en ayuno. En cambio, estas diferencias en la FT_4 tras el tratamiento con CRF no se encontraron en el experimento

2.5.3.3.a, donde los animales después de las inyecciones recibían alimento (Fig. 38). Esta discrepancia podría ser debida a un efecto estimulador de la alimentación sobre la FT₄ tiroidea en la carpa dorada, como hemos demostrado en los experimentos de ayuno en *T. tinca*, y como ha sido descrito para las HT plasmáticas en la trucha (Flood y Eales, 1983; Himick y Eales, 1990). Así, por una lado, la ingesta podría determinar incrementos de la T₄ tiroidea en los animales control respecto a los peces tratados con CRF, cuya ingesta era reducida, y por otro, el CRF, por sí mismo, podría provocar también un aumento en la T₄, de manera que ambos incrementos, inducidos en los dos grupos por medios diferentes, enmascararían las diferencias producidas por el CRF o la alimentación.

Los resultados presentes indican que la realimentación incrementa los niveles plasmáticos de HT después de 48 h de privación de alimento en *C. auratus*, de acuerdo con los datos obtenidos en ejemplares de *T. tinca* mantenidos durante 7 días de ayuno y 2 de realimentación, y los existentes en salmónidos (Flood y Eales, 1983; Himick y Eales, 1990; Himick y cols, 1991), y confirman la elevación aguda de las HT plasmáticas tras la alimentación de animales mantenidos en ayuno moderado o prolongado. Si tenemos en cuenta que la realimentación induce una elevación de las HT plasmáticas, sin modificación de la 5'D, junto a una elevada relación FT₃/FT₄, podríamos pensar que una gran parte de la T₃ circulante proviene del tiroides, concordando con un ligero descenso de la FT₃ acumulada en el tiroides. Ante el descenso de la actividad tiroidea producido por el ayuno, la realimentación induce posiblemente una síntesis (BT₃/BT₄ elevada) y secreción preferente de T₃ (ligero descenso de la FT₃ que se acumula en el tiroides y que pasaría a la circulación, observándose unos niveles plasmáticos elevados y una FT₃/FT₄ reducida). Además, el hecho de observar un incremento en las HT plasmáticas sin posiblemente una modificación de la 5'D sugiere que gran parte de la T₃ circulante proviene del tiroides (secreción elevada). Esta respuesta de la realimentación compensaría el déficit, inducido por el ayuno, de la hormona considerada biológicamente activa, T₃ plasmática.

A nivel del sistema catecolaminérgico hipotalámico, la realimentación tras dos días de ayuno induce un incremento significativo de la NA y DA en *C. auratus*. Este resultado nos llevó al planteamiento del posible efecto, por un lado únicamente del ayuno, y por otro, de la realimentación posterior al período de ayuno sobre la actividad catecolaminérgica hipotalámica. Puesto que los niveles de catecolaminas exclusivamente no nos permiten concluir acerca de su actividad, ya que por ejemplo, una reducción en los

niveles de una catecolamina puede ser interpretada de dos formas totalmente diferentes: 1) que el neurotransmisor está siendo más utilizado, ó 2) que la síntesis del neurotransmisor ha sido reducida por una reducción generalizada de la utilización del sistema (Winberg y Nilsson, 1993), nos planteamos un experimento de ayuno y realimentación en *C. auratus* similar al descrito para las tencas, estudiando el metabolismo adrenérgico y dopaminérgico.

El ayuno durante 7 días provoca un descenso en el contenido hipotalámico de NA y DA, que es revertido parcialmente en el caso de la NA a las 4 h de la realimentación consistente en una única comida. La principal diferencia respecto al ayuno de dos días reside en que la realimentación consigue incrementar los niveles de NA y DA cuando comparamos con los animales mantenidos en ayuno. Esta discrepancia puede explicarse teniendo en cuenta que la recogida de muestras se realizó a las 8 h de la realimentación en el experimento de 2 días de ayuno y a las 4 h en el de 7 días de ayuno, pudiendo ser este último tiempo insuficiente para observar los efectos de la realimentación. En cuanto al metabolismo de estas catecolaminas, considerando el cociente [metabolito de degradación]/[neurotransmisor] como posible estimación de la tasa o índice de recambio, es decir, un índice de la utilización del neurotransmisor, podemos sugerir que el ayuno produce un incremento en la actividad adrenérgica (relación HMPG/NA elevada). El metabolismo de DA, en cambio, no fue modificado, sugiriendo que la reducción de DA podría deberse más bien a una reducción en la síntesis de dicha catecolamina que a un aumento en su utilización. Por tanto, las reducciones observadas en la NA y DA tras el ayuno responderían a mecanismos diferentes, de manera que la respuesta ante el ayuno en *C. auratus* podría inducir una activación del sistema adrenérgico y una reducción del dopaminérgico, lo cual tendría su lógica si pensamos que ambas catecolaminas pueden ejercer un control de la alimentación diferente, la NA estimulando la ingesta vía receptores α_2 y la DA inhibiéndola en mamíferos (véase rev. Morley, 1987; Wilber, 1989; Morley y Silver, 1991). No obstante, para poder demostrar esta hipótesis sería necesario evaluar además la liberación de las catecolaminas.

Considerando la hipótesis anterior de una reducción en la síntesis de DA hipotalámica inducida por el ayuno en las carpas, cabría esperar que la alimentación provocara un aumento en la síntesis de dicha catecolamina (efecto observado en el análisis del ciclo diario de DA en las tencas). Pruebas a favor de esta posibilidad se han obtenido en mamíferos, donde la ingesta de proteínas, modifica la disponibilidad del aminoácido tirosina (precursor inicial de la DA) en el SNC, afectando por tanto a la síntesis de DA, de manera

que una comida podría determinar una estimulación de la síntesis y liberación de esta catecolamina en las neuronas encefálicas, posiblemente en las hipotalámicas (Fernstrom y Fernstrom, 1994). Spieler (1992) sugiere una hipótesis similar en los peces acerca de la relación ingesta-tirosina-catecolaminas encefálicas. Se ha descrito también en los mamíferos un aumento de la liberación de DA en el SNC asociado con la alimentación, aunque existen datos contradictorios, en unos estudios el DOPAC y la tasa de recambio correspondiente incrementan con la alimentación (Thibault, 1992; Westerink y cols, 1994) mientras que en otros aumenta con situaciones de ayuno (Page y cols, 1993) o con procesos de reducción de la ingesta (Orosco y Nicolaidis, 1994). Un estudio reciente en insectos ha indicado que la DA aumenta tras 10 días de ayuno, aunque no se puede determinar si es un efecto directo del ayuno o del estrés provocado en este estudio al mantener los insectos aislados (Barreteau y cols, 1993). En el salmónido *Salmo gairdneri* aunque no se encontraron modificaciones en el contenido encefálico de monoaminas en relación con la dieta (Sloley y cols, 1986), este resultado no está totalmente en desacuerdo con los estudios de Fernstrom y Fernstrom (1994) en mamíferos, ya que en el estudio de *Salmo* se utilizan dietas que diferían en los contenidos de carbohidratos y lípidos, no descartándose, por tanto, que el distinto contenido de proteínas en la dieta afecte a la síntesis de aminas biogénas (Sloley y cols, 1986).

En los mamíferos en general, se ha descrito una estimulación de la liberación de NA asociada con la alimentación, bien durante todo el período de alimentación (Paez y cols, 1993) o antes de que ésta tenga lugar (pico de prealimentación) (Leibowitz, 1992; Mitome y cols, 1994). La situación inversa, una reducción de la ingesta origina una reducción en la NA extracelular en el NPV (Davies y cols, 1993). En los peces, la alimentación está acompañada de un aumento de la NA hipotalámica, que en base a los datos referentes al metabolismo de esta catecolamina en el experimento de ayuno y realimentación realizado en *C. auratus*, podría representar un acúmulo de NA como consecuencia de una reducción en la utilización del neurotransmisor. Sin embargo, no podemos descartar que también en los peces se produzca un incremento en la liberación de NA asociado con la alimentación, de forma similar a como sucede en los mamíferos.

2.3. Especificidad del efecto anorético del CRF.

La administración ICV del antagonista de receptores de CRF, α -Helical CRF_[9-41], revierte parcialmente la reducción de la ingesta inducida por el CRF en *C. auratus*, confirmando resultados similares obtenidos en la rata (Krahn y cols, 1986; Heinrichs y Koob,

1992). En estos estudios se ha demostrado que el α -H CRF_[9-41] atenúa el efecto anorético producido tanto por el CRF exógeno, como por el estrés, en las ratas privadas de alimento, sugiriéndose que el CRF endógeno desempeñaría un papel en la coordinación de las respuestas comportamentales al estrés. En este caso uno podría esperar que el antagonismo del CRF endógeno elevará la ingesta, efecto que no ha sido demostrado ni en las ratas (Krahn y cols, 1986; Heinrichs y Koob, 1992; Heinrichs y cols, 1993; Racotta y cols, 1994) ni en el presente estudio, donde el antagonista no modifica significativamente el comportamiento alimentario. En este sentido, se ha sugerido que el papel fisiológico del CRF en la regulación de la ingesta tendría lugar únicamente en determinadas circunstancias, por ejemplo, cuando los individuos son expuestos a situaciones estresantes (Heinrichs y Koob, 1992), no estando probablemente involucrado en la regulación de la alimentación en condiciones basales (Racotta y cols, 1994), en cuyo caso los niveles de CRF podrían ser mínimos y entonces el bloqueo por el antagonista no produciría efectos significativos (Glowa y cols, 1992). Similarmente, el CRF no contribuye a la regulación de la temperatura corporal, cardiovascular (Morimoto y cols, 1993) ni gastrointestinal (Mönnikes y cols, 1992) en las ratas en condiciones normales, pero desempeña un importante papel en el control de estas actividades bajo condiciones de estrés.

Como ya comentamos en el apartado de Introducción, el CRF estimula la liberación de ACTH y β -endorfina de la hipófisis. Se ha sugerido en mamíferos que los efectos inhibitorios del CRF sobre la alimentación podrían estar mediados vía la glándula adrenal (Gosnell y cols, 1983), principal órgano diana de la ACTH hipofisaria. Además, se ha demostrado que el corticosteroide sintético dexametasona suprime la alimentación inducida por el estrés (Lowry y Yim, 1980), y que los glucocorticoides inhiben la ingesta de grasas (York, 1992). Así, la reducción de la ingesta inducida por el CRF podría ser secundaria al incremento de los niveles plasmáticos de corticosteroides, o de la ACTH hipofisaria, incluso de la β -endorfina circulante.

Se ha demostrado en la rata que la hipofisectomía no anula la acción inhibitoria del CRF sobre la ingesta, y por tanto, la liberación hipofisaria de ACTH y péptidos derivados de la POMC no estaría implicada en dicha acción (Morley y Levine, 1982). En los peces, no hemos realizado hipofisectomía y, por tanto, no podemos confirmar estas conclusiones, aunque, la β -endorfina no parece estar implicada en los efectos del CRF sobre

la ingesta, ya que periféricamente no ejerce ningún efecto en la alimentación, y centralmente la estimula en *C. auratus* (De Pedro y cols, 1995c).

La reducción de la ingestión de alimento en *C. auratus* inducida por el CRF administrado ICV fue acompañada por un aumento de los niveles plasmáticos de cortisol, y ambas respuestas eran revertidas por el antagonista α -H CRF_[9-41]. Así, nos planteamos un posible papel de los corticosteroides como mediadores de la respuesta alimentaria inducida por el CRF en los peces. Puesto que era imposible realizar una adrenalectomía quirúrgica dada la disposición interrenal del tejido adrenal (Norris, 1985), intentamos llevar a cabo una adrenalectomía farmacológica utilizando para ello metirapona, un inhibidor específico de la síntesis de corticosteroides a nivel de la 11 β -hidroxilasa (Norris, 1985; Thomas y Keenan, 1986). El primer problema con el que nos encontramos fue que dicho fármaco administrado IP reduce, por sí mismo, el comportamiento alimentario, de manera similar a como ocurre con el CRF, lo que complica las posibles interpretaciones de los resultados obtenidos en el grupo que recibía conjuntamente ambos compuestos. Esta reducción de la ingesta por la metirapona podría ser debida a una mayor liberación de CRF endógeno, ya que con el fármaco estaría suprimida la retroalimentación negativa que ejerce el cortisol sobre el hipotálamo, de forma análoga a la retroalimentación negativa a nivel hipofisario demostrada en anguilas (Olivereau y Olivereau, 1991b). No obstante, esta posibilidad resulta cuestionable ya que a la dosis de metirapona utilizada en nuestro estudio (y a una inferior y superior, cuyos datos no hemos presentado por ser similares), a pesar de atenuar parcialmente la estimulación de los niveles plasmáticos de cortisol por el CRF, no se observó una inhibición de la síntesis de cortisol en condiciones basales.

El hecho de que las dos rutas distintas de administración (ICV e IP) del CRF incrementen el cortisol plasmático, pero el efecto anorético de dicho péptido se observe únicamente tras la administración ICV en *C. auratus*, apoya claramente una mediación central del efecto del CRF (Glowa y cols, 1992), independiente de la activación del eje hipófisis-adrenal en los peces. El incremento de cortisol circulante observado tras la administración IP de cortisol en *C. auratus*, sin reducciones de la ingesta, confirma los datos anteriormente expuestos.

2.4. Control catecolaminérgico del efecto anorético del CRF.

En los mamíferos se han descrito modificaciones en los niveles de neurotransmisores en el SNC asociadas a los cambios de apetito producidos por el CRF

(véase rev. Glowa y cols, 1992). En nuestro estudio encontramos que el CRF ICV produce, concomitantemente con su efecto anorético, una reducción del contenido hipotalámico de NA y DA, efectos que son antagonizados por el α -H CRF_[9-41] en *C. auratus*. Esto nos llevó a plantearnos si las modificaciones en el sistema catecolaminérgico serían responsables de la acción supresora del CRF sobre el comportamiento alimentario, sin excluir la posibilidad inversa de que la reducción de la ingesta inducida por el CRF fuera la responsable de la disminución hipotalámica de NA y DA. De hecho, los estudios de ayuno y realimentación ya comentados, indican una asociación de estas catecolaminas con el estado nutricional del animal, disminuyendo con el ayuno y observándose un aumento con la ingestión de alimento. No obstante, a la vista de los resultados obtenidos con otros neuropéptidos que provocan modificaciones de la ingesta (véase los apartados correspondientes a la β -endorfina y la galanina) sin observarse cambios de las catecolaminas mencionadas, creemos que la distinta tasa de ingesta (por ejemplo, una reducción tras el tratamiento con CRF) no se correlaciona con modificaciones en el contenido hipotalámico de NA y DA. Por otro lado, el hecho de que el tratamiento únicamente con CRF (Fig. 44) no provocará modificaciones de las catecolaminas a las 8 h de las inyecciones, no está en desacuerdo con los datos e hipótesis presentadas a continuación, donde el CRF produce una reducción de la NA y DA hipotalámicas a las 2 h del tratamiento, si tenemos en cuenta el tiempo transcurrido desde la administración ICV de CRF y la toma de muestras. Así, la falta de efecto a las 8 h podría reflejar la acción del neuropéptido a tiempos cortos, como ha sido descrito al estudiar su papel en la regulación de la ingesta en los peces (De Pedro y cols, 1993).

En relación con las posibles interacciones del sistema catecolaminérgico con el CRF en su respuesta alimentaria, existen pruebas estructurales a favor en los mamíferos, donde se han descrito conexiones sinápticas entre las neuronas sintetizadoras de CRF, presentes en el núcleo paraventricular, y fibras adrenérgicas (Liposits y cols, 1986) y dopaminérgicas (Liposits y Paull, 1989), habiéndose demostrado una interacción en la regulación de otras funciones, como una activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por la estimulación de receptores α_1 -adrenérgicos identificados en regiones inmunorreactivas al CRF (véase rev. Whitnall, 1993; Ur y Grossman, 1994). Por tanto, a partir de esta información nos propusimos estudiar la implicación del sistema α -adrenérgico y dopaminérgico en la reducción de la ingesta por el CRF en *C. auratus*. El hecho de no estudiar inicialmente el sistema β -adrenérgico responde, por un lado, a que no observamos modificaciones de la A hipotalámica asociada al efecto anorético del CRF en *C. auratus*, y

por otro, a que los receptores β (β_1 y β_2) no están implicados en el efecto anorético de la NA en las ratas (Racotta y Soto-Mora, 1993). Esto es apoyado por varios puntos ya mencionados en la Introducción, como que la A se encuentra en concentraciones muy bajas en el encéfalo de los teleósteos y no tiene una función conocida, no existiendo datos respecto a los receptores β .

Se sabe que los receptores adrenérgicos α_1 y α_2 tienen funciones antagónicas en la regulación de la alimentación en los mamíferos (véase rev. Wellman y cols, 1993). Así, mientras que la activación de los receptores α_2 dentro del NPV estimula la ingesta (Leibowitz, 1986; Capuano y cols, 1992a), la activación de los α_1 suprime el comportamiento alimentario (Morien y cols, 1993; Racotta y Soto-Mora, 1993). Nuestros resultados muestran que la administración ICV de yohimbina (antagonista α_2) reduce significativamente la ingesta, mientras que aunque el prazosín (antagonista α_1) incrementa la ingesta, ésta no resultó estadísticamente significativa. No obstante, en el estudio de la interacción receptores adrenérgicos-galanina (Fig. 75) en *C. auratus*, encontramos una estimulación significativa de la alimentación por el prazosín, lo que nos permite afirmar que dicho fármaco ICV actúa como activador de la ingestión de alimento. La falta de significación estadística en el experimento con el CRF puede justificarse bien en base a la propia variabilidad de la respuesta de los animales a estos antagonistas, o también al hecho de utilizar como estadístico un ANOVA en el que se incluyen todos los grupos, amortiguándose ciertas diferencias entre pares de grupos. Por tanto, y puesto que las tendencias en ambos experimentos son las mismas, el antagonista α_1 estimula la ingesta y el α_2 la reduce, podemos sugerir una posible activación adrenérgica de los receptores α_2 y α_1 , respectivamente, por la noradrenalina endógena. No obstante, no podemos descartar efectos inespecíficos de estos antagonistas sobre la alimentación en *C. auratus* y que no han sido aún probados en la bibliografía disponible.

En base a los resultados obtenidos con los antagonistas adrenérgicos en los peces, cabría esperar que los agonistas tuvieran también funciones antagónicas y opuestas a las de sus respectivos antagonistas. De hecho, en los mamíferos (véase rev. Wellman y cols, 1993) los agonistas de tipo α_1 reducen la ingesta (Morien y cols, 1993), mientras que los de tipo α_2 la estimulan (Capuano y cols, 1992a). En cambio, en nuestro estudio ambos antagonistas parecen no modificar la ingesta, con una tendencia a la reducción. Resulta difícil explicar estos resultados, especialmente en lo referente a la clonidina (agonista α_2 -adrenérgico), de la que habría cabido esperar la respuesta totalmente contraria, es decir, una estimulación del

comportamiento alimentario, que bien puede interpretarse por una cuestión de dosis o de no ser claramente específico en los teleósteos.

En definitiva, los datos más interesantes y que responden al objetivo inicial vienen dados por el pretratamiento con los antagonistas antes de inyectar ICV el CRF. Los resultados al respecto, demuestran que el prazosín, pero no la yohimbina, bloquea el efecto anorético del CRF en *C. auratus*, sugiriendo que dicho efecto en los peces está mediado vía receptores α_1 - "like" adrenérgicos.

Cuando analizamos los datos referentes a las catecolaminas y sus metabolitos en el hipotálamo, observamos que el CRF reduce los niveles de NA, junto a un ligero aumento de la relación HMPG/NA, indicando según la hipótesis propuesta para los estudios de ayuno una activación del sistema noradrenérgico en peces, que en este caso actuaría principalmente a través de los receptores α_1 , conocidos como inhibidores de la ingesta en mamíferos (Morien y cols, 1993; Racotta y Soto-Mora, 1993; Wellman y cols, 1993), y que mediarían la respuesta anorética del CRF. Aunque la NA es un ligando endógeno que se une predominantemente a adrenoceptores de tipo α_2 , también presenta una cierta actividad α_1 , pudiendo estimular o reducir la ingesta en función del balance relativo de la actividad de estos dos tipos de receptores, que varía bajo determinadas condiciones (véase rev. Wellman y cols, 1993). Así, el CRF podría actuar facilitando y/o potenciando los efectos de la NA a través de los receptores postsinápticos α_1 , mediante un incremento en la actividad de estos receptores respecto a los α_2 , aunque, por el momento, desconocemos el mecanismo(s) responsable(s) de esta acción del CRF en *C. auratus*.

Ambos antagonistas adrenérgicos revierten la reducción de NA inducida por el CRF en nuestro estudio, aunque sólo el prazosín bloquea la reducción de la ingesta provocada por dicho péptido. Así, parece que aparte de los efectos sobre la alimentación, los antagonistas pueden interactuar con el CRF en su acción sobre el sistema noradrenérgico. Estas interacciones pueden ocurrir, como se ha descrito para otros antagonistas, a distintos niveles (Sloley y cols, 1991): 1) en la síntesis, transporte o actividad tirosina hidroxilasa u otras enzimas responsables de la síntesis de las catecolaminas; 2) en la recaptura y el almacenaje; y 3) a nivel de los receptores presinápticos que ejercen una retroalimentación negativa sobre la síntesis y liberación del neurotransmisor en cuestión (Paez y Leibowitz, 1993).

Existe una gran controversia acerca del efecto de la DA sobre la alimentación en los mamíferos, habiéndose sugerido que dicho efecto puede ser dependiente de la dosis (las dosis bajas estimularían la ingesta, mientras que las altas la reducirían) y de la región del encéfalo que se estudie (acción anorética en el área perifornical del hipotálamo e hipotálamo lateral, y estimuladora en el hipotálamo lateral, estriado ventrolateral y núcleo *accumbens*) (véase rev. Morley, 1987; Bakshi y Kelley, 1991a y b; Blundell, 1991; Morley y Silver, 1991). Esto hace que en ocasiones encontremos en la bibliografía el mismo efecto tras el tratamiento tanto con agonistas como con antagonistas dopaminérgicos (Terry y Katz, 1994), incluso efectos diferentes con el mismo tipo de antagonistas, por ejemplo, una estimulación (Clifton y cols, 1991) y una reducción (Dong y Weingarten, 1993) de la ingesta tras el tratamiento con antagonistas D₂.

Concretamente, en nuestro estudio observamos que los agonistas dopaminérgicos utilizados (D₁, SKF 38393; D₂, quinpirol) tienen el mismo efecto sobre la ingesta, reduciéndola, efecto que ha sido demostrado previamente con agonistas dopaminérgicos generales (Capuano y cols, 1992b) y recientemente, al menos, para el SKF 38393 en las ratas (Terry y Katz, 1994). Por otro lado, los antagonistas presentan efectos opuestos a los agonistas en *C. auratus*, coincidiendo con los resultados de Clifton y cols (1991) en ratas, donde diferentes antagonistas de tipo D₂ estimulan la ingesta, y el SCH 23390 (antagonista D₁) no presenta ningún efecto significativo sobre la alimentación. En relación con este efecto similar que desarrollan los agonistas D₁ y D₂ por un lado, y los antagonistas de ambos tipos de receptores dopaminérgicos por otro, en *C. auratus*, pensamos que o bien los dos tipos de receptores funcionan en el mismo sentido como se ha observado en los mamíferos, donde la DA reduce la ingesta o la estimula según la dosis utilizada y/o el área encefálica estudiada, pero no según el tipo de receptor que medie la respuesta, o que como ha sido sugerido por Winberg y Nilsson (1993) la divergencia presente en los distintos subtipos de receptores monoaminérgicos en los mamíferos no sea tan pronunciada en otros vertebrados, pudiendo existir un único receptor dopaminérgico en los peces. No obstante, recientemente se han descrito ambos tipos de receptores dopaminérgicos (D₁ y D₂) al menos en un pez, concretamente en la hipófisis y en el encéfalo de *Anguilla anguilla* (Cardinaud y cols, 1994).

El pretratamiento con los antagonistas dopaminérgicos SCH 23390 y sulpirida antes de la administración ICV de CRF ha puesto de manifiesto una implicación del sistema dopaminérgico en la respuesta anorética de este neuropéptido en *C. auratus*, ya que ambos

antagonistas revierten dicha acción del CRF, sugiriendo que receptores dopaminérgicos-"like" podrían mediar esta acción en los peces.

Respecto al significado de la reducción de DA por CRF, asociada a un ligero incremento de su metabolismo (DOPAC/DA elevada), estos datos podrían indicar, como ya comentamos en el caso de la NA, una activación del sistema dopaminérgico, que mediaría la reducción de la ingesta observada tras el tratamiento con CRF. Esto coincidiría con el papel inhibitorio que se le ha otorgado a la DA en la regulación de la alimentación en los mamíferos, a pesar de la controversia existente (véase rev. Leibowitz, 1986; Wilber, 1989; Hoebel y Hernández, 1993). No obstante, ya que a pesar del incremento de la relación DOPAC/DA no pudimos observar una elevación directa de los niveles del metabolito, no podemos descartar que el CRF y la DA interaccionen en la regulación de la ingesta en los peces a través de otros mecanismos distintos al propuesto en esta Memoria.

El agonista y antagonista D_1 inducen un efecto similar al descrito para el CRF sobre la DA hipotalámica y su metabolismo. No tenemos datos suficientes para determinar como actúan estos fármacos a nivel del sistema dopaminérgico, aunque una reducción de la DA ha sido también descrita tras el tratamiento con el fármaco domperidona (antagonista D_2) en *C. auratus* (Sloley y cols, 1991), sugiriendo estos autores distintas posibilidades sobre el nivel al que puede actuar la droga, que comentamos anteriormente al tratar los antagonistas adrenérgicos.

Aunque no existen estudios que describan receptores de CRF en el SNC de los peces, sin embargo, se ha demostrado una producción de factores CRF-"like" y la presencia de cuerpos celulares inmunorreactivos al CRF en el núcleo preóptico del encéfalo de los teleósteos (Yulis y cols, 1986; Tran y cols, 1990). Concretamente, en *C. auratus*, se ha identificado actividad CRF en el núcleo *tuberis lateralis* y preóptico (Yulis y cols, 1986; Fryer y Ledereis, 1986). Además, es ampliamente conocido que el CRF estimula la secreción de ACTH de las células corticotrópicas de la adenohipófisis en todos los grupos de vertebrados, incluyendo los peces (Norris, 1985), lo que junto a la alta conservación de la secuencia de aminoácidos de este péptido entre las diferentes especies estudiadas (Gillies y cols, 1989; Lederis y cols, 1990), sugiere que el CRF podría tener un papel fisiológico a lo largo del proceso evolutivo. Aunque, el péptido CRF comercial es sólo disponible de especies de mamíferos (rata, oveja o humano), nuestros resultados indican una acción central del CRF (de origen mamífero) sobre la regulación de la alimentación de los peces, y en este sentido,

este control de la alimentación por factores CRF-"like" podría ser un ejemplo de un proceso fisiológico altamente conservado a lo largo de la evolución de los vertebrados.

3. REGULACIÓN DE LA INGESTA POR β -ENDORFINA.

3.1. Efecto de la β -endorfina sobre la ingesta.

Nuestros resultados muestran que la administración ICV de β -endorfina (0,1 y 1 μ g) incrementa la ingesta a tiempos cortos en *C. auratus* (De Pedro y cols, 1995c), confirmando estudios previos realizados en mamíferos, donde la β -endorfina produce un efecto estimulador sobre el comportamiento alimentario cuando se administra centralmente (Grandison y Guidotti, 1977; McLay y cols, 1981; Leibowitz y Hor, 1982; Baile y cols, 1986; Morley, 1987; Robert y cols, 1989).

El hecho de que el efecto estimulador de la β -endorfina sobre la alimentación fuera observado durante las 2 primeras horas después del tratamiento, pero no durante el siguiente intervalo estudiado (2-8 h), sugiere que este péptido opioide actúa a tiempos cortos en la carpa dorada. Se ha observado un resultado similar con otros neuropéptidos, como el CRF y la bombesina, implicados en la regulación de la alimentación en *C. auratus*. El CRF, como ya hemos descrito en el apartado anterior, reduce la ingestión de alimento a las 2 h, sin un efecto anorético durante las 6 h siguientes (De Pedro y cols, 1993); y tanto la bombesina como la colecistoquinina producen alteraciones del comportamiento alimentario desde los primeros 15 min de recibir la comida, que equivalen a 30 min después de las inyecciones (Himick y Peter, 1994a y b). Los opioides también pueden modificar la ingesta desde tiempos muy cortos (15 ó 30 min) después del tratamiento en vertebrados homeotermos (McLay y cols, 1982; Denbow y McCormack, 1990; Nencini y Graziani, 1990; Beckowska y cols, 1992 y 1993). No obstante, estas alteraciones tempranas de la ingesta producidas por los opioides pueden ser conservadas durante algunas horas más, como ocurre en los datos expuestos en la presente Memoria. Así, el incremento de la ingesta acumulativa por la β -endorfina observado a las 8 h, reflejaría la acción estimuladora de dicho péptido a tiempos cortos (2 h), y que es mantenida, al menos, 8 h después del tratamiento.

La administración periférica de β -endorfina, en contraste con la central, no modifica la ingestión de alimento, lo que sugiere que este opioide regula la ingesta vía

mecanismos centrales en *C. auratus*, de acuerdo con los estudios descritos en homeotermos (véase rev. Levine y cols, 1985; Baile y cols, 1986; Morley, 1987). Así, estos resultados proveen nuevas evidencias para un posible papel central de la β -endorfina en la regulación de la alimentación en vertebrados, concretamente en los peces. No obstante, nuestros resultados no descartan otra hipótesis, como que la β -endorfina fuera metabolizada más rápidamente en la periferia, por ejemplo en la sangre, que en el líquido cefalorraquídeo, como se ha descrito recientemente para el neuropéptido Tyr-MIF-1 (Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂), que presenta una alta estabilidad en el líquido cefalorraquídeo, consistente con su papel en el SNC (Kastin y cols, 1994a). En este caso concreto, a los 3 min de la incubación del péptido Tyr-MIF-1 en el plasma, se ha degradado una gran cantidad de dicho péptido (Kastin y cols, 1994b), permaneciendo, en cambio, fundamentalmente intacto cuando se incubaba durante 8 días en el líquido cefalorraquídeo, lo que sugiere que los efectos centrales de dicho péptido serían más una cuestión de permanecer intacto durante más tiempo en el SNC (Kastin y cols, 1994a). Cultivos *in vitro* de la β -endorfina, o el péptido en cuestión que se este estudiando, en plasma y líquido cefalorraquídeo de *C. auratus* aportarían datos sobre el metabolismo de este opioide en los peces, importantes para abordar esta hipótesis.

Actualmente, se desconoce el mecanismo de acción de los opioides (β -endorfina) en la regulación de la ingesta en *C. auratus* y las estructuras encefálicas específicas implicadas en dicha regulación. Basados en los estudios que ponen de manifiesto al lóbulo inferior como centro de la alimentación en los peces (véase rev. Peter, 1979; Cuenca y García Gallego, 1987), y en los estudios autorradiográficos que indican la presencia de sitios de unión de péptidos opioides en el hipotálamo de los peces (Pert y cols, 1974; Bird y cols, 1988; Nicholson y cols, 1994), se puede sugerir, que un posible sitio de acción para la mediación del efecto central estimulador de la β -endorfina sobre la ingesta en *C. auratus* podría ser el hipotálamo.

3.2. Interacciones β -endorfina-hormonas tiroideas-catecolaminas.

Como ya tratamos en el apartado anterior, los niveles plasmáticos de glucosa se incrementan en los peces alimentados respecto a los que no reciben alimento, pero no se ven modificados por la distinta cantidad de comida ingerida. Así, de la misma manera que en los peces inyectados con CRF, cuya ingesta era reducida, no se observaron reducciones en los niveles plasmáticos de glucosa, la estimulación de la ingesta por la β -endorfina o galanina

tampoco es acompañada por incrementos de la glucosa en sangre. Por tanto, una posible modificación de la glucosa plasmática en los peces sería debida a la acción de estos péptidos independientemente de sus efectos sobre la ingesta. Concretamente, en nuestro estudio la β -endorfina no parece ejercer ninguna acción en los niveles plasmáticos de glucosa, lo que coincide con los estudios de Khawaja y Green (1991), donde la β -endorfina administrada IP no modifica la glucosa en sangre en ratones normales ni en los genéticamente obesos. No obstante, los efectos de la β -endorfina, y en general de los opioides, sobre el metabolismo de la glucosa dependen de la especie estudiada, la dosis utilizada y la ruta de administración, de manera que, por ejemplo, la β -endorfina IP reduce los niveles plasmáticos de glucosa en los perros, mientras que la administración ICV de una dosis baja no los modifica, y la de una dosis alta los eleva (Molina y Abumrad, 1994).

Se sabe que los péptidos opioides modulan la secreción de tirotropina (TSH) en mamíferos, aunque el papel que desempeñan no está totalmente clarificado, ya que se ha descrito que estimulan la secreción de TSH en los humanos (Samuels y cols, 1994), mientras que estudios de inmunoneutralización de los opioides en las ratas han sugerido que dichos péptidos inhiben la secreción de TRH, TSH y los niveles plasmáticos de las hormonas tiroideas (Mitsuma y cols, 1993). En *C. auratus*, el contenido tiroideo de T_3 y T_4 no se vio afectado tras la administración ICV de la β -endorfina. Al no existir otros estudios similares que evalúen las HT en el tiroides, y a la vista de los efectos diferentes según la especie estudiada en mamíferos, resulta difícil poder concluir con nuestros datos iniciales si los opioides desempeñan un papel en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo de los peces. Por otro lado, aunque se ha descrito una correlación entre la actividad tiroidea y la cantidad de alimento en los peces (Eales, 1988; Eales y Shostak, 1985b), el distinto grado de ingestión de alimento no modifica el contenido tiroideo de HT en *C. auratus* en el presente estudio. No obstante, hay que tener en cuenta que los animales eran inicialmente saciados, y posteriormente se establecían las diferencias de ingesta entre los controles y los tratados con β -endorfina, pudiendo ser la presentación inicial de comida, que conduce al estado de saciedad, la señal que modificaría la actividad tiroidea en los animales, y no las diferencias en la cantidad de alimento ingerido posteriormente.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la existencia de interacciones entre el sistema opioide y catecolaminérgico, que varían dependiendo del área del encéfalo y del

tipo de receptor opioide. Así, en la rata, los receptores κ modulan la liberación de DA, inhibiéndola en el mesencéfalo ventral (Smith y cols, 1992; Ronken y cols, 1993); los δ estimulan el metabolismo de la DA en el núcleo *accumbens* y en la eminencia media (Manzanares y cols, 1993), y los μ inhiben la liberación de NA en el *locus coeruleus* (Ronken y cols, 1993; Raymon y Leslie, 1994). El hecho de que no encontremos modificaciones del contenido hipotalámico de catecolaminas (NA, A y DA) como consecuencia del tratamiento con la β -endorfina en *C. auratus*, puede ser debido a que el análisis de las catecolaminas se realizó no en núcleos concretos, sino en el hipotálamo entero, midiendo el contenido total de cada catecolamina, incluyendo la cantidad de catecolamina no sólo liberada, sino también la sintetizada y la almacenada. Por tanto, nuestro análisis no permite descartar que existan interacciones del sistema opioide y catecolaminérgico en el SNC de los peces, similares a las descritos en los mamíferos.

3.3. Control por los distintos tipos de receptores opioidérgicos.

La naloxona, es un antagonista general no selectivo de los péptidos opioides ampliamente estudiado y que, como hemos visto en la Introducción, reduce la ingesta en una gran variedad de situaciones y especies (véase rev. Levine y cols, 1985; Baile y cols, 1986; Morley, 1987; Zwaan y Mitchell, 1992; Giraud y cols, 1993; Yeomans y cols, 1993). Nuestros resultados confirman dicho efecto supresor de la naloxona sobre la alimentación también en los peces, y apoyan la aceptación general de que los agonistas de opioides estimulan el comportamiento alimentario, mientras que los antagonistas lo reducen (Olson y cols, 1991, 1992 y 1993). El hecho de que la naloxona administrada ICV disminuya la ingesta, podría ser el resultado de la interrupción de la actividad del sistema opioide endógeno (Denbow y McCormack, 1990). No obstante, no podemos descartar que dicha reducción de la ingesta sea consecuencia de un efecto inespecífico de la naloxona, aunque no se puede atribuir a una desregulación motora general ni a una aversión inducida por la droga, al menos, en mamíferos (Cooper y cols, 1985). En numerosos estudios, se han administrado los antagonistas y agonistas opioidérgicos juntos, de manera que cuando el antagonista bloquea el efecto del agonista sobre la ingesta, se concluye que el agonista está actuando vía receptores opioides (Baile y cols, 1986). Por tanto, a la vista del bloqueo parcial que ejerce la naloxona sobre el efecto estimulador de la alimentación inducido por la β -endorfina, sugerimos que este opioide puede estar actuando a través de receptores opioidérgicos, de

acuerdo con los estudios realizados en otros vertebrados (véase rev. Baile y cols, 1986; Morley, 1987; Olson y cols, 1993).

Los agonistas δ - (DPEN), κ - (U-50488) y μ -opioidérgicos (DAMGO) utilizados en este estudio estimulan la ingesta en *C. auratus*, como ha sido descrito en numerosos estudios realizados en los mamíferos (Cooper y cols, 1985; Olson y cols, 1991, 1992 y 1993; Bakshi y Kelley, 1993; Gosnell y Patel, 1993). En cuanto a la administración de los antagonistas sólo, mientras que la naloxona, como hemos visto, reduce la ingesta en una gran variedad de situaciones, los efectos de los antagonistas específicos, como DALCE (δ_1), naltrindol (δ_2), *nor*-binaltorfimina (*nor*-BNI, κ), β -funaltrexamina (β -FNA, μ), naloxonazina (μ_1), etc., varían dependiendo de las condiciones particulares del estudio, reduciendo la ingesta o no teniendo ningún efecto significativo (Carr y cols, 1991; Olson y cols, 1992; Beczkowska y cols, 1992 y 1993; Levine y cols, 1990). Concretamente, bajo nuestras condiciones experimentales y a las dosis utilizadas, ninguno de los antagonistas (BNTX, δ_1 ; naltriben, δ_2 ; *nor*-BNI; β -FNA y naloxonazina) altera significativamente el comportamiento alimentario, mostrando niveles de ingestión similares o inferiores a los observados en los controles, a excepción de la β -FNA, que parece aumentar ligeramente la ingesta. Aunque la β -FNA es un antagonista μ irreversible, también es un agonista κ reversible, de manera que tiene un efecto bifásico, estimulando la ingesta en las primeras horas, para después reducirla (Olson y cols, 1991; Beczkowska y cols, 1993). Además, dicho efecto estimulador por la β -FNA observado a las 3 horas, es revertido por el antagonista *nor*-BNI, indicando que es un efecto mediado por receptores κ (Arjune y cols, 1990). Por tanto, debido al poco tiempo transcurrido entre las inyecciones y la valoración de la ingesta (2 h), los efectos observados tras la administración de β -FNA en nuestro estudio son debidos muy probablemente a su acción como agonista κ .

De los numerosos estudios realizados en mamíferos en busca del tipo de receptor opioidérgico responsable de la regulación de la alimentación por opioides, se ha demostrado que el receptor κ (*nor*-BNI) está implicado en la ingesta nocturna, ingesta de dietas ricas en grasas y en la ingesta estimulada por la 2-deoxy-D-glucosa (2DG) (Arjune y Bodnar, 1990). Similarmente, el receptor μ (β -FNA) está también implicado en la ingesta de dietas ricas en grasas, en la ingesta estimulada por 2DG o ayuno y en la ingesta espontánea, (Arjune y cols, 1990), siendo los dos primeros efectos dependientes del receptor μ_2 , mientras que la ingesta espontánea o estimulada por ayuno depende de los μ_1 (Beczkowska y Bodnar, 1991). A pesar de que los agonistas δ estimulan la ingesta, el pretratamiento con antagonistas del mismo tipo

de receptores no parece afectar ninguna de las situaciones anteriormente descritas, indicando un papel menos importante en la regulación de la alimentación que los receptores μ o κ (Arjune y cols, 1991).

En la presente Memoria, hemos realizado un estudio de los receptores implicados en la regulación de la alimentación por opioides en peces, de manera que los resultados obtenidos de la administración combinada de los antagonistas con la β -endorfina, ponen de manifiesto que ni DALCE, naltriben, *nor*-BNI ni β -FNA, a las dosis y tiempos utilizados, bloquean el efecto estimulador de la β -endorfina sobre la ingesta en *C. auratus*, que es antagonizado, en cambio, por la naloxonazina. A la vista de estos resultados, sugerimos que el incremento de la alimentación tras la administración ICV de β -endorfina es mediado por receptores μ_1 en la carpa dorada. No obstante, no podemos descartar una implicación de los receptores μ_2 , ya que un posible bloqueo por la β -FNA ($\mu_1 + \mu_2$) (aunque en nuestro estudio no fue obtenido por actuar como un agonista κ) podría indicar, tanto, un bloqueo de los receptores μ_1 , demostrado por la naloxonazina, como de los μ_2 , que no puede ser directamente comprobado por no existir en el momento del estudio antagonistas específicos, o un bloqueo de los dos subtipos de receptores μ . El hecho de que la β -endorfina es un ligando con afinidad principalmente por los receptores μ y δ (Akil y cols, 1981), y los datos obtenidos por Brooks y cols (1994) que no han detectado sitios de unión δ en el encéfalo de *C. auratus*, apoyan la posibilidad de descartar los receptores κ y δ como responsables del incremento de la ingesta inducido por la β -endorfina en *C. auratus*.

La regulación de la alimentación por péptidos opioides ha sido estudiada principalmente en especies de mamíferos (véase rev. Baile y cols, 1986; Levine y cols, 1985; Morley, 1987; Olson y cols, 1991, 1992 y 1993), existiendo también estudios al respecto en aves (Denbow y McCormack, 1990; Deviche, 1992) y en determinadas especies de invertebrados, como en el molusco *Limax* (Kavaliers y cols, 1984; Wong y cols, 1991). Actualmente podemos ampliar esta lista, incluyendo el grupo de los peces (De Pedro y cols, 1995), que junto al hecho de un sistema POMC-péptidos derivados (β -endorfina) altamente conservado en gnatóstomos (Dores y cols, 1990; Dores y cols, 1993a y b) refuerza la idea de la conservación de una función (alimentación) mediada por el mismo sistema peptidérgico (opioide) a lo largo de la escala filogenética.

La relevancia fisiológica de nuestros resultados es apoyada por un gran número de evidencias en los peces. Por un lado, mediante técnicas inmunocitoquímicas se han encontrado compuestos endorfina-"like" en diferentes áreas del encéfalo de los peces (Follénus y Dubois 1978a y b; Dubois y cols, 1979; Nozaki y Gorbamn, 1984; Vallarino, 1985), en donde también se ha demostrado la distribución de sitios de unión de opioides (Pert y cols, 1974, Bird y cols, 1988; Nicholson y cols, 1994). Además, se ha caracterizado la secuencia del ARNm de la POMC en salmónidos (Soma y cols, 1984) y se han detectado, aislado y purificado diferentes formas de endorfina en los peces (Kawauchi y cols, 1980; Dores y cols, 1988; Dores y cols, 1993b; Dores y cols, 1994). Por otro lado, además de los efectos sobre el comportamiento alimentario expuestos en esta Memoria, se ha demostrado la influencia de los péptidos opioides en una gran variedad de funciones en *C. auratus*, como la habituación al miedo (Olson y cols, 1978), percepción del dolor (Enrensing y Mitchell, 1982), termorregulación (Kavaliers, 1983), secreción de gonadotropina (Rosenblum y Peter, 1989), comportamiento de las agrupaciones sociales (Kavaliers, 1989), y regulación del sistema inmune de forma general en los peces (Cooper y Faisal, 1990), resaltando la importancia de un sistema opioide capaz de modular diferentes respuestas fisiológicas y comportamentales en los peces.

4. REGULACIÓN DE LA INGESTA POR GALANINA.

4.1. Efecto de la galanina sobre la ingesta.

Los presentes resultados ponen de manifiesto una acción estimuladora de la ingesta por la galanina en *C. auratus* (De Pedro y cols, 1995d), como ha sido previamente demostrado en los mamíferos (Kyrkouli y cols, 1986; Leibowitz y Kim, 1992; Corwin y cols, 1993; Crawley y cols, 1993; Schick y cols, 1993; Tempel y Leibowitz, 1993). La mayoría de estos estudios, incluyendo el nuestro, utilizan el modelo de animales saciados para probar el efecto estimulador de la ingesta por galanina. Sin embargo, estos experimentos no nos permiten decidir si la galanina, u otro estimulador de la alimentación, ejerce sus efectos por activación de las señales de alimentación, o por supresión de las señales de saciedad, o por ambos mecanismos. Schick y colaboradores (1993), demostraron que la galanina incrementa la ingesta tanto en ratas saciadas como en ratas privadas de alimento, en las que las señales de saciedad no son operativas al principio de la alimentación, lo que

sugiere que la galanina actúa estimulando el comportamiento alimentario y no por postponer el tiempo en alcanzar el estado de saciedad.

En *C. auratus*, se ha demostrado que otros neuropéptidos como el CRF (De Pedro y cols, 1993), la bombesina (Himick y Peter, 1994a), la colecistoquinina (Himick y Peter, 1994b) y la β -endorfina (De Pedro y cols, 1995c) ejercen su acción sobre la ingesta a tiempos cortos. Respecto a la galanina, también encontramos un resultado similar, de manera que el incremento de la ingesta inducido por la galanina, a las dosis de 1 y 3,33 μg , fue observado a las 2 h de las inyecciones, pero no durante las 6 h siguientes. Un efecto estimulador de dicho péptido a tiempos cortos (20 ó 30 min posttratamiento) ha sido también observado en las ratas (Kyrkouli y cols, 1986; Leibowitz y Kim, 1992; Crawley y cols, 1993). Concretamente, Schick y colaboradores (1993), cuantificando la ingesta en intervalos de 20 min durante 4 h, demostraron que el incremento de la alimentación por la galanina ocurría, principalmente, en el primer intervalo de 20 min, quedando reflejado en todos los datos siguientes de la ingesta acumulativa. A la vista de todos estos resultados, el aumento de la ingesta acumulativa a las 8 h del tratamiento, inducido por la galanina, en la carpa dorada, es, probablemente, debido al incremento inicial de la ingesta durante las 2 primeras horas.

De acuerdo con estudios previos realizados en las ratas (Kyrkouli y cols, 1986), la galanina fue ineficaz en la estimulación del comportamiento alimentario en *C. auratus* cuando se administra periféricamente, apoyando que la galanina está involucrada en la regulación central de la alimentación, también en los peces. No obstante, no podemos descartar que la galanina fuera metabolizada más rápidamente en la periferia que en el líquido cefalorraquídeo, como ya hemos comentado en el caso de la β -endorfina. De hecho, se ha demostrado en mamíferos que la vida media de la galanina en el hipotálamo es de 100 min (Land y cols, 1991), mientras que en el plasma es de 4,6 min (Harling y Holst, 1992), lo que indicaría, por tanto, que la galanina en sangre es inestable.

Respecto al posible sitio(s) de acción de la galanina, estudios autorradiográficos han descrito sitios de unión a la galanina en el encéfalo de los peces, encontrándose las densidades más altas en el hipotálamo posterior, lo que sugeriría la presencia de receptores de galanina en este área (Moons y cols, 1991). Además, se ha localizado material gal-ir en determinadas regiones hipotalámicas homólogas al NPV de los mamíferos (Merchenthaler y cols, 1993), donde la galanina ejerce la estimulación de la alimentación (véase rev. Morley,

1987; Morley y Silver, 1991). Por tanto, el hipotálamo puede representar, probablemente, un sitio de acción, donde se media la estimulación de la alimentación por galanina en los peces, como ha sido previamente sugerido para otros neuropéptidos implicados en el control del apetito en *C. auratus* (De Pedro y cols, 1993 y 1995c; Himick y Peter, 1994a y b).

4.2. Interacciones galanina-hormonas tiroideas-catecolaminas.

Los resultados de los niveles de glucosa en plasma, el contenido tiroideo de hormonas tiroideas y las catecolaminas hipotalámicas cuando administramos ICV cualquiera de los dos péptidos estimuladores de la ingesta, β -endorfina o galanina, son similares, y por tanto, la discusión que versa sobre dichos datos expuesta en el apartado correspondiente a la β -endorfina podría ser extrapolada igualmente al caso de la galanina, que en este momento estamos tratando. Por tanto, sólo mencionaremos aquí, algunos aspectos específicos de la galanina. En cuanto a la relación de la galanina y la glucosa, se sabe que este péptido actúa como neurotransmisor pancreático inhibiendo la secreción de insulina y estimulando la de glucagón, produciendo consecuentemente hiperglucemia en los ratones y perros (véase rev. Prieto, 1990; Ahrén y Lindskog, 1992), pero no en las ratas y los humanos (véase rev. Vrontakis y cols, 1991). Respecto al papel de la galanina en la regulación de la secreción de la TSH en los mamíferos existen datos contradictorios en la bibliografía (véase rev. Vrontakis y cols, 1991; Merchenthaler y cols, 1993), aunque, en general, parece que los niveles plasmáticos de dicha hormona no se ven afectados significativamente por la galanina administrada tanto central como periféricamente (Giustina y cols, 1992; Giustina y cols, 1994).

4.3. Especificidad del efecto estimulador de la ingesta por galanina.

La galantida (M15) es el primer péptido quimérico constituido por la secuencia 1-12 de la galanina y la sustancia P-(5-11)amida, que funciona como antagonista de los receptores de galanina, bloqueando las acciones de ésta en el SNC (Bartfai y cols, 1991). Cuando administramos ICV este antagonista antes del tratamiento con galanina, observamos un bloqueo del incremento de la ingesta inducido por la galanina en *C. auratus*. La galantida fue eficaz a una dosis aproximadamente equimolar a las dosis activas de galanina, y este resultado es similar a los datos obtenidos en estudios que utilizan otros potentes antagonistas, como el M40 y el C7, que inhiben la estimulación del comportamiento alimentario por la

galanina exógena en las ratas (Leibowitz y Kim, 1992; Crawley y cols, 1993; Schick y cols, 1993). Además, nosotros hemos encontrado que la galantida no modifica, por sí sólo, la ingesta, sugiriendo, como en las ratas (Corwin y cols, 1993; Crawley y cols, 1993), que el antagonista no produce efectos comportamentales inespecíficos, que podrían complicar la interpretación de la capacidad de la galantida para antagonizar el efecto estimulador de la galanina. Sin embargo, Leibowitz y Kim (1992) han indicado que la inyección de M40 en el NPV de las ratas reduce de forma dosis-dependiente la ingestión espontánea de alimento, sugiriendo un bloqueo de las acciones de la galanina endógena. Esta controversia sobre el efecto del antagonista M40 por sí sólo, no es tal, si tenemos en cuenta que puede depender de las condiciones experimentales (hora del día y tipo de nutrientes), ya que, por ejemplo, la inhibición de la galanina endógena ocurre al principio de la fase oscura y ante una dieta de grasas, pero no de proteínas o carbohidratos (Leibowitz y Kim, 1992).

4.4. Control α -adrenérgico.

Aunque no observamos modificaciones significativas del sistema catecolaminérgico y su metabolismo en el hipotálamo de *C. auratus* con el tratamiento con galanina o con su antagonista, la galantida, o la combinación de ambos, nos propusimos estudiar la posible interacción del sistema α -adrenérgico con la galanina en la regulación de la alimentación en los peces, ya que en las ratas ha sido firmemente establecida una implicación de los receptores α_2 en el efecto estimulador de la galanina (véase rev. Morley, 1987; Morley y Silver, 1991; Bray, 1992). En el presente estudio, obtuvimos un resultado similar en *C. auratus*, desde que el antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos (yohimbina), pero no el de receptores α_1 (prazosín), contrarresta totalmente el efecto estimulador de la galanina sobre la ingesta, sugiriendo que dicho efecto en los peces es mediado vía receptores α_2 -adrenérgicos.

El hecho de haberse demostrado en las ratas que los antagonistas α_2 bloquean los efectos estimuladores de la noradrenalina (NA) sobre la ingesta (véase rev. Wellman y cols, 1993), y observarse una fuerte correlación positiva entre dos efectos inducidos por la galanina, el incremento de los niveles de NA extracelular en el NPV y la magnitud de la respuesta alimentaria (Kyrkouli y cols, 1992), sugiere que la liberación de NA está involucrada en la estimulación de la ingesta por la galanina. Una interesante cuestión aún sin resolver es el mecanismo intracelular responsable de la liberación de NA, aunque se han especulado las siguientes posibilidades (Kyrkouli y cols, 1992): a) la galanina puede afectar

la liberación de NA directamente modulando los autorreceptores que controlan su liberación; o b) indirectamente a través de una interneurona que modularía los autorreceptores presinápticos; y c) la galanina puede aumentar los efectos postsinápticos de la NA, inhibiendo su recaptura o la acción de sus enzimas degradativas.

Si en la mediación de la estimulación de la ingesta por galanina a través de los receptores α_2 en los peces estuviera también involucrada una liberación de NA, cabría esperar un aumento del contenido hipotalámico de NA en los animales tratados ICV con galanina, efecto que, sin embargo, no observamos en ninguno de los experimentos realizados. Una posible explicación es que nosotros cuantificamos la cantidad total de NA en el hipotálamo, no pudiendo discernir la cantidad de NA liberada (NA extracelular) del conjunto total de NA medida. Esto podría ser evitado mediante el desarrollo de técnicas de microdiálisis que permitirían determinar más exactamente la NA liberada de forma continua. Otro aspecto a tener en cuenta es que la determinación de catecolaminas en nuestro estudio se realizó a las 2 h de la administración de galanina, mientras que el incremento de NA extracelular en el trabajo de Kyrkouli y cols (1992) ocurre a los primeros 20 y 40 min del tratamiento con galanina, pero no después.

Por otro lado, estudios de la ingesta de dietas de macronutrientes puros en los mamíferos, indican que la galanina puede tener un efecto independiente de la NA (Tempel y cols, 1988; Tempel y Leibowitz, 1990a), sugiriéndose una función dual de la galanina sobre la ingesta, una involucrando a la NA y responsable de la ingesta de carbohidratos, y otra independiente de la liberación de dicha amina endógena y que media la ingesta primordialmente de grasas. Resultaría de gran interés realizar este tipo de estudios basados en modelos de selección de alimento según el tipo de nutrientes (carbohidratos, proteínas o grasas) en los peces, para poder determinar la ingesta del tipo concreto de nutrientes que es afectada por la galanina o el neuropéptido regulador de la alimentación que estemos estudiando. Para ello, serían útiles los modelos computerizados de autodispensación de alimento que recientemente se han puesto a punto para el estudio del comportamiento alimentario en los peces y aplicados al ajuste de dietas (Cuenca y De la Higuera, 1994b; Sánchez-Vázquez y cols, 1994).

Se ha sugerido en mamíferos una posible interacción sinérgica de la galanina y los péptidos opioides en su influencia de la ingesta de nutrientes en el hipotálamo, desde que se ha encontrado una co-localización de galanina y opioides endógenos en el núcleo

paraventricular, y se ha demostrado que modulan conjuntamente otras actividades, como la sensibilidad al dolor (véase rev. Leibowitz, 1992). Aunque en los peces no existen estudios que demuestren de forma directa una localización conjunta de ambos péptidos, se ha observado, por separado, la existencia de galanina y endorfina en los mismos núcleos hipotalámicos (galanina: véase rev. Merchenthaler y cols, 1993; β -endorfina: Nozaki y Gorbman, 1984; Vallarino, 1985), lo que podría ser una primera prueba a favor de una acción también conjunta de ambos péptidos en la estimulación de la alimentación, descrita en esta Memoria, en los peces. La administración conjunta de antagonistas opioidérgicos y galanina por una lado, y galantida (antagonista de la galanina) y β -endorfina u otros agonistas opioidérgicos por otro, aportaría datos importantes para clarificar esta hipótesis.

VI. CONCLUSIONES

- La especie *T. tinca* presenta un comportamiento gregario y altamente estresable, con serias dificultades para estudios de comportamiento, concretamente el comportamiento alimentario. Hemos determinado oscilaciones día/noche de los niveles plasmáticos de cortisol y glucosa y en el contenido hepático de glucógeno e hipotalámico de catecolaminas, sugiriendo que la alimentación parece ser, en la mayoría de los casos, un potente sincronizador responsable de los máximos de glucosa, glucógeno y catecolaminas diurnos.
- La movilización del glucógeno hepático no es suficiente para mantener la glucemia tras una semana de ayuno en *T. tinca*. La respuesta a nivel tiroideo implica una reducción generalizada de la actividad tiroidea, y como resultado principal parece producirse una disminución en la secreción tiroidea de T_4 .
- La administración ICV, pero no la IP, del CRF, la β -endorfina y la galanina modifica la ingesta en los ciprínidos, reduciéndola el CRF en *C. auratus* y *T. tinca*, y estimulándola los otros dos neuro péptidos en *C. auratus*. El efecto de estos péptidos sobre la ingestión de alimento es dependiente de la dosis y el tiempo, ejerciendo su acción reductora o estimuladora del apetito, fundamentalmente, a tiempos cortos. Por tanto, podemos concluir que un sistema peptidérgico CRF-"like", β -endorfina-"like" y galanina-"like" puede desempeñar un papel en la regulación central de la alimentación en los peces.
- La utilización de antagonistas específicos para el CRF, la β -endorfina y la galanina ha puesto de manifiesto que se produce un bloqueo central de las respuestas alimentarias inducidas por estos péptidos, sugiriendo que dichas respuestas son mediadas por receptores para CRF, β -endorfina y galanina en el sistema nervioso central de *C. auratus*. Concretamente, el efecto estimulador de la β -endorfina sobre la ingesta es mediado por el sistema μ -opioidérgico a través de receptores μ_1 . No obstante, no podemos descartar por el momento una implicación de receptores de tipo μ_2 .
- El CRF induce una reducción en la síntesis y liberación de T_3 tiroidea, en *C. auratus* y *T. tinca*, que puede estar relacionado con una reducción de la actividad 5'-monodesyodasa intratiroidea. Este efecto del CRF sobre la actividad tiroidea es independiente de la reducción de la ingesta inducida por dicho péptido. La función tiroidea está influenciada, también en *C. auratus*, por el estado nutricional.

- La respuesta catecolaminérgica ante el ayuno en *C. auratus* consiste en una mayor utilización del neurotransmisor adrenérgico noradrenalina, y una reducción en la síntesis de dopamina, lo que sugiere una activación y reducción, respectivamente, de estos dos sistemas. A pesar de esta influencia de la alimentación sobre las catecolaminas hipotalámicas, el distinto grado de ingesta no parece modificar dichos sistemas catecolaminérgicos.

- El efecto anorético del CRF depende de los receptores α_1 -adrenérgicos y dopaminérgicos en *C. auratus*. Las activaciones de ambos sistemas catecolaminérgicos serían responsables de la acción inhibitoria del apetito por el CRF.

- La estimulación de la ingesta por galanina está mediada por el sistema noradrenérgico, concretamente a través de receptores adrenérgicos de tipo α_2 -"like" en *C. auratus*. No obstante, no podemos descartar una posible implicación de los receptores β -adrenérgicos y/o dopaminérgicos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ABDEL-FATTAH K.I., BODEK, S. y SECHMAN A. (1991). Serum patten of thyroxine (T₄), 3,3',5-triiodothyronine (T₃) and 3,3',5'-thyronine (rT₃) in fed and fasted cocks following TRH stimulation. *J. Vet. Med.* **A38**:401-408.
- AHLERS S.T. y SALANDER M.K. (1993). Effects of repeated administration of corticotropin-releasing factor on schedule-controlled behavior in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **44**:375-380.
- AHRÉN B. y LINDSKOG S. (1992). Galanin and the regulation of islet hormone secretion. *Int. J. Pancreatol.* **11**:147-160.
- AKIL H., WATSON S.J., YOUNG E., LEWIS M.E., KHACHATURIAN H. y WALKER J.M. (1981). Opiate binding properties of naturally occurring N- and C-terminus modified β -endorphin. *Peptides* **2**:289-292.
- ALONSO-GÓMEZ A.L., GANCEDO B., ALONSO-BEDATE M., AGAPITO M.T. y DELGADO M.J. (1992). Characterization of serotonin *N*-acetyltransferase in the lateral eye of the green frog *Rana perezii*: protective action of EGTA. *J. Neurochem.* **58**:587-592.
- ALONSO-SOLÍS R. (1992). Neurotransmisores y neuromoduladores. En: "Fisiología humana" (Ed., Tresguerres, J.A.F.) Interamericana-McGraw-Hill, Madrid. pp. 63-86.
- ANDERSON T.A. y BRALEY H. (1993). Appearance of nutrients in the blood of the golden perch *Macquaria ambigua* following feeding. *Comp. Biochem. Physiol.* **104A**:349-356.
- ARASE K., YORK D.A., SHIMIZU H., SHARGILL, N. y BRAY G.A. (1988). Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am. J. Physiol.* **255**:E255-E259.
- ARJUNE D. y BODNAR R.J. (1990). Suppression of nocturnal, palatable and glucoprivic intake in rats by the κ opioid antagonist, *nor*-binaltorphamine. *Brain Res.* **534**:313-316.
- ARJUNE D., STANDIFER K.M., PASTERNAK G.W. y BODNAR R.J. (1990). Reduction by central β -funaltrexamine of food intake in rats under freely-feeding, deprivation and glucoprivic conditions. *Brain Res.* **535**:101-109.
- ARJUNE D., BOWEN W.D. y BODNAR R.J. (1991). Ingestive behavior following central [D-Ala², Leu⁵, Cys⁶]-Enkephalin (DALCE), a short-acting agonist and long-acting antagonist at the delta opioid receptor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **39**:429-436.
- AUDET C., FITZGERALD G.F. y GUDERLEY H. (1986). Photoperiod effects on plasma cortisol levels in *Gasterosteus aculeatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**:76-81.
- BAANANTE I.V., GARCÍA DE FRUTOS P., BONAMUSA L y FERNÁNDEZ F. (1991). Regulation of fish glycolysis-gluconeogenesis: role of fructose 2,6 P₂ and PKF-2. *Comp. Biochem. Physiol.* **100B**:11-17.

- BABIN P.J. (1992). Binding of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine to trout plasma lipoproteins. *Am. J. Physiol.* **262**:E712-E720.
- BAILE C.A., McLAUGHLIN C.L. y DELLA-FERA M.A. (1986). Role of cholecystokinin and opioid peptides in control of food intake. *Physiol. Rev.* **66**:172-234.
- BAKSHI V.P. y KELLEY A.E. (1991a). Dopaminergic regulation of feeding behavior: I. Differential effects of haloperidol microinfusion into three striatal subregions. *Psychobiology* **19**:223-232.
- BAKSHI V.P. y KELLEY A.E. (1991b). Dopaminergic regulation of feeding behavior: II. Differential effects of amphetamine microinfusion into three striatal subregions. *Psychobiology* **19**:233-242.
- BAKSHI V.P. y KELLEY A.E. (1993). Feeding induced by opioid stimulation of the ventral striatum: role of opiate receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**:1253-1260.
- BALON-PERIN S., KOLANOWSKI J., BERBBINSCHI A., FRANCHIMONT P. y KETELSLEGERS J.M. (1991). The effects of glucose ingestion and fasting on plasma immunoreactive beta-endorphin, adrenocorticotropin hormone and cortisol in obese subjects. *J. Endocrinol. Invest.* **14**:919-925.
- BANERJEE S., BANERJEE P.P., SHEN S-T. y YU J.Y-L. (1994). Studies on purification and characterization of pituitary thyrotropin from black silver carp, *Aristichthys nobilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **107B**:337-346.
- BANKS W.A., AUDUS K.L. y DAVIS T.P. (1992). Permeability of the blood-brain barrier to peptides: an approach to the development of therapeutically useful analogs. *Peptides* **13**:1289-1294.
- BARRETEAU H., GOUDEY-PERRIÈRE F., PERRIÈRE C., JACQUOT C., GAYRAL P., GROSCLAUDE J.M. y BROUSSE-GAURY P. (1993). Influence of fasting and isolation biogenic amine levels in the nervous system of the male cockroach *Bladerus craniifer* Burm. (Dyctioptera, Blaberidae). *Comp. Biochem. Physiol.* **105C**:11-16.
- BARTFAI T., BEDECS K., LAND T., LANGEL Ü., BERTORELLI R., GIROTTI P., CONSOLO S., XU X., WIESENFELD-HALLIN Z., NILSSON S., PIERIBONE V.A. y HÖKFELT T. (1991). M-15: high-affinity chimeric peptide that blocks the neuronal actions of galanin in the hippocampus, locus coeruleus, and spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:10961-10965.
- BARTFAI T., FISONE G. y LANGEL Ü. (1992). Galanin and galanin antagonists: molecular and biochemical perspectives. *TIPS Rev.* **131**:312-317.
- BECZKOWSKA I.W. y BODNAR R.J. (1991). Mediation of insulin hyperphagia by specific central opiate receptor antagonists. *Brain Res.* **547**:315-318.

- BECZKOWSKA I.W., BOWEN W.D. y BODNAR R.J. (1992). Central opioid receptor subtype antagonists differentially alter sucrose and deprivation-induced water intake in rats. *Brain Res.* **589**:291-301.
- BECZKOWSKA I.W., KOCH J.E., BOSTOCK M.E., LEIBOWITZ S.F. y BODNAR R.J. (1993). Central opioid receptor subtype antagonists differentially reduce intake of saccharin and maltose dextrin solutions in rats. *Brain Res.* **618**:261-270.
- BELLAMY D. (1968). Metabolism of the red piranha, *Rooseveltiella nattereri*, in relation to feeding behavior. *Comp. Biochem. Physiol.* **35**:343-347.
- BERNARDIS L.L y BELLINGER L.L. (1987). The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res. Rev.* **12**:321-381.
- BERNARDIS L.L. y BELLINGER L.L. (1993). The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **17**:141-193.
- BIRD D.J., JACKSON M., BAKER B.I. y BUCKINGHAM J.C. (1988). Opioid binding sites in the fish brain: an autoradiographic study. *Gen. Comp. Endocrinol.* **70**:49-62.
- BLUNDELL J. (1991). Pharmacological approaches to appetite suppression. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**:147-157.
- BONNIN A., DE MIGUEL R., FERNÁNDEZ-RUIZ J.J., CEBEIRA M. y RAMOS J.A. (1994). Possible role of the cytochrome P450-linked monooxygenase system in preventing δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced stimulation of tuberoinfundibular dopaminergic activity in female rats. *Biochem. Pharmacol.* **48**: (en prensa).
- BONS N. BOUILLE C., TONON M.C. y GUILLAUME V. (1988). Topographical distribution of CRF immunoreactivity in the pigeon brain. *Peptides* **9**:697-707.
- BRADFORD M.R.Jr. y NORTHCUTT R.G. (1983). Organization of the diencephalon and preteectum of the ray-finned fishes. En: "Fish neurobiology. Higher brain areas and functions" Vol. 2 (Eds: Davis R.E y Northcutt R.G.) The University of Michigan Press, Michigan. pp. 117-163.
- BRAS Y.M.L. (1979). Circadian rhythm in brain catecholamine concentrations in the teleost: *Anguilla anguilla* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **62C**:115-117.
- BRAY G.A. (1992). Peptides affect the intake of specific nutrients and the sympathetic nervous system. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**:265S-271S.
- BRAY G.A. (1993). The nutrient balance approach to obesity. *Nutr. Today* (may/june):13-18.
- BRES O. y EALES J.G. (1988). High-affinity, limited-capacity triiodothyronine-binding sites in nuclei from various tissues of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **69**:71-79.

- BRES O. y EALES J.G. (1990). Saturable triiodothyronine-binding sites in the pituitary nuclei of salmonid teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **77**:23-28.
- BRITTON D., KOOB G., RIVIER J. y VALE W. (1982). Intraventricular corticotropin-releasing factor enhances behavioral effects of novelty. *Life Sci.* **31**:363-367.
- BROOKS A.I., STANDIFER K.M., CHENG J., CISZEWSKA G. y PASTERNAK G.W. (1994). Opioid binding in giant toad and goldfish brain. *Receptor* **4**:55-62.
- BROWN C.L. (1988). Photoperiod effects on thyroid function in fish. En: "Processing of environmental information in vertebrates" (Ed., Stetson M.H.) Springer-Verlag, New York. pp. 1-7.
- BROWN C.R. y CAMERON J.N. (1991). The induction of specific dynamic action in channel catfish by infusion of essential amino acids. *Physiol. Zool.* **64**:276-297.
- BROWN M.R., FISHER L.A., SPIESS J., RIVIER J. y VALE W. (1982a). Comparison of the biologic actions of corticotropin releasing factor and sauvagine. *Reg. Peptides* **4**:107-114.
- BROWN M.R., FISHER L.A., SPIESS J., RIVIER C., RIVIER J. y VALE W. (1982b). Corticotropin-releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinology* **111**:928-931.
- BROWN S.B., MACLATCHY D.L., HARA T.J. y EALES J.G. (1991). Effects of cortisol on aspects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **81**:207-216.
- BROWNSTEIN M.J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:5391-5393.
- BROWNSTEIN M.J. (1994). Neuropeptides. En: "Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects, 5th Ed." (Ed., Siegel G.J. y cols) Raven Press, New York. pp. 341-365.
- BYAMUNGU N., CORNEILLIE S., MOL K., DARRAS V. y KÜHN E.R. (1990). Stimulation of thyroid function by several pituitary hormones results in an increase in plasma thyroxine and reverse triiodothyronine in tilapia (*Tilapia nilotica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **80**:33-40.
- BYAMUNGU N., MOL K. y KÜHN E.R. (1992). Evidence for the kidney as an important source of 5'-monodeiodination activity and stimulation by somatostatin in *Oreochromis niloticus* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **88**:199-208.
- CAPUANO C.A., LEIBOWITZ S.F. y BARR G.A. (1992a). The pharmaco-ontogeny of the paraventricular α_2 -noradrenergic receptor system mediating norepinephrine-induced feeding in the rat. *Dev. Brain Res.* **68**:67-74.

- CAPUANO C.A., LEIBOWITZ S.F. y BARR G.A. (1992b). The pharmacology of the perifornical lateral hypothalamic β_2 -adrenergic and dopaminergic receptor system mediating epinephrine- and dopamine-induced suppression of feeding in the rat. *Dev. Brain Res.* **70**:1-7.
- CARDINAUD B., QUERAT B., DUFOUR S., VINCENT J-D. y VERNIER P. (1994). The molecular diversity of dopamine receptors expressed in the eel brain and pituitary. *17th Conference of European Endocrinologists (Córdoba, Spain)* pp. 258.
- CAROFF J., BARTHÉLÉMY L. y SEBERT P. (1986). Brain and plasma biogenic amines analysis by the EC-HPLC technique: application to fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **84C**:151-153.
- CARR K.D. y PAPADOUKA V. (1994). The role of multiple opioid receptors in the potentiation of reward by food restriction. *Brain Res.* **639**:253-260.
- CARR K.D., ALEMAN D.O., BAK T.H. SIMON E.J. (1991). Effects of parabrachial opioid antagonism on stimulation-induced feeding. *Brain Res.* **545**:283-286.
- CIFONELLI J.A., MONTGOMERY R. y SMITH F. (1956). The reaction between Concanavalin-A and glycogen. *J. Am. Chem. Soc.* **78**:2485-2489.
- CLIFTON P.G., RUSK I.N. y COOPER S.J. (1991). Effects of dopamine D₁ and dopamine D₂ antagonists on the free feeding and drinking patterns of rats. *Behav. Neurosci.* **105**:272-281.
- COOK R.F. y EALES J.G. (1987). Effects of feeding and photoperiod on diel changes in plasma thyroid hormone levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.* **242**:161-169.
- COOPER E.L. y FAISAL M. (1990). Phylogenetic approach to endocrine-immune system interactions. *J. Exp. Zool.* **4**:46-52.
- COOPER S.J., JACKSON A. y KIRKHAM T.C. (1985). Endorphins and food intake: κ opioid receptor agonists and hyperphagia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **23**:889-901.
- CORMONT M., LE MARCHAND-BRUSTEL Y., VAN OBBERGHEN E., SPIEGEL A.M. y SHARP G.W.G. (1991). Identification of G protein α -subunits in RINm5F cells and their selective interaction with galanin receptor. *Diabetes* **40**:1170-1176.
- CORNBROOKS E.B. y PARSONS R.L. (1991). Source of sexually dimorphic galanin-like immunoreactive projections in the teleost fish *Poecilia latipinna*. *J. Comp. Neurol.* **304**:658-665.
- CORPAS I., GANCEDO B., ALONSO-GÓMEZ A.L., DELGADO M.J. y ALONSO-BEDATE M. (1991). Food intake inhibition and metamorphosis stimulation by sheep corticotropin-releasing hormone (CRF) administration in *Rana perezi*. *Belg. J. Zool.* **121**:132-133.

- CORWIN R.L., ROBINSON J.K. y CRAWLEY J.N. (1993). Galanin antagonists block galanin-induced feeding in the hypothalamus and amygdala of the rat. *Eur. J. Neurosci.* **5**:1528-1533.
- COTO-MONTES A., GARCÍA-FERNÁNDEZ J.M., DEL BRÍO M.A. y RIERA P. (1994). The distribution of corticotropin-releasing factor immunoreactive neurons and nerve fibres in the brain of *Gambusia affinis* and *Salmo trutta*. *Histol. Histopath.* **9**:233-241.
- COWEY C.B. y SARGENT J.R. (1979). Nutrition. En: "Fish Physiology" Vol. III (Eds: Hoar W.S., Randall D.J. y Brett J.R.) Academic Press, New York. pp. 1-58.
- CRAWLEY J.N., ROBINSON J.K., LANGEL Ü. y BARTFAI T. (1993). Galanin receptor antagonists M40 and C7 block galanin-induced feeding. *Brain Res.* **600**:268-272.
- CUADRADO M.I., COVEÑAS R. y TRAMU G. (1993). Neuropeptides and monoamines in the carp (*Cyprinus carpio*) pretectum: an immunocytochemical study. *Tissue and Cell* **25**:549-561.
- CUENCA E.M. y GARCÍA GALLEGO M. (1987). Ingesta y conducta alimentaria. En: "Nutrición en acuicultura" Vol. I (Eds: Espinosa de los Monteros J. y Labarta U.) Feuga, Madrid. pp. 1-65.
- CUENCA E.M. y DE LA HIGUERA M. (1994a). Evidence for an endogenous circadian rhythm of feeding in the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Rhythm Res.* **25**:228-235.
- CUENCA E.M. y DE LA HIGUERA M. (1994b). A microcomputer-controlled demand feeder for the study of feeding behavior in fish. *Physiol. Behav.* **55**:1135-1136.
- CHAKRABORTI P. y BHATTACHARYA S. (1984). Plasma thyroxine levels in freshwater perch: influence of season, gonadotropins, and gonadal hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* **53**:179-186.
- CHANG J.P., PETER R.E., NAHORNIAK C.S. y SOKOLOWSKA M. (1984). Effects of catecholaminergic agonists and antagonists on serum gonatropin concentrations and ovulation in goldfish: Evidence for specificity of dopamine inhibition of gonadotropin secretion. *Gen. Comp. Endocrinol.* **55**:351-360.
- CHANG J.P., VAN GOOR F. y ACHARYA S. (1991). Influences of norepinephrine, and adrenergic agonists on gonadotropin secretion from dispersed pituitary cells of goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* **54**:202-210.
- CHEN Y., LABURTHE M. y AMIRANOFF B. (1992). Galanin inhibits adenylate cyclase of rat brain membranes. *Peptides* **13**:339-341.
- CHEN Y., FOURNIER A., COUVINEAU A., LABURTHE M. y AMIRANOFF B. (1993a). Purification of a galanin receptor from pig brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:3845-3849.

- CHEN L.H., HUANG T.L., y SYNDER D.L. (1993b). Effects of moderate dietary restriction and age on blood parameters and metabolic enzymes in Lobund-Wistar rats. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **16**:69-80.
- DALAYEUN J.F., NORÈS J.M. y BERGAL S. (1993). Physiology of β -endorphins. A close-up view and a review of the literature. *Biomed. Pharmacother.* **47**:311-320.
- DANFORTH E.Jr. y BURGER A.G. (1989). The impact of nutrition on thyroid hormone physiology and action. *Annu. Rev. Nutr.* **9**:201-227.
- DARLING D.S., DICKHOFF W.W. y GORBMAN A. (1982). Comparison of thyroid hormone binding to hepatic nuclei of a rat and a teleost (*Oncorhynchus kisutch*). *Endocrinology* **111**:1936-1943.
- DAVIES B.T., WELLMAN P.J. y MORIEN A. (1993). An assessment of the involvement of paraventricular hypothalamic α_2 -adrenoceptors in phenylpropanolamine anorexia. *Physiol. Behav.* **54**:121-128.
- DE LUZE A. y LELOUP J. (1984). Fish growth hormone enhances peripheral conversion of thyroxine to triiodothyronine in the eel (*Anguilla anguilla* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* **56**:308-312.
- DE LUZE A., LELOUP J., PAPKOFF H., KIKUYAMA S. y KAWAUCHI H. (1989). Effects of vertebrate prolactins and growth hormones on thyroxine 5'-monodeiodination in the eel (*Anguilla anguilla*): a potential bioassay for growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **73**:186-193.
- DE PEDRO N., ALONSO-GÓMEZ A.L., GANCEDO B., DELGADO M.J. y ALONSO-BEDATE M. (1993). Role of corticotropin-releasing factor (CRF) as a food intake regulator in goldfish. *Physiol. Behav.* **20**:517-520.
- DE PEDRO N., GANCEDO B., ALONSO-GÓMEZ A.L., DELGADO M.J. y ALONSO-BEDATE M. (1995a). CRF effect on thyroid function is not mediated by feeding behavior in goldfish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (en prensa).
- DE PEDRO N., GANCEDO B., ALONSO-GÓMEZ A.L., DELGADO M.J. y ALONSO-BEDATE M. (1995b). Alterarions in food intake and thyroid hormone by CRF in the teleost fish *Tinca tinca*. *Rev. Esp. Fisiol.* (en revisión).
- DE PEDRO N., DELGADO M.J. y ALONSO-BEDATE M. (1995c). Central administration of β -endorphin increases food intake in goldfish: pretreatment with the opioid antagonist naloxone. *Reg. Peptides* (en prensa).
- DE PEDRO N., CÉSPEDES M.V., DELGADO M.J. y ALONSO-BEDATE M. (1995d). The galanin-induced feeding stimulation is mediated via α_2 -adrenergic receptors in goldfish. *Reg. Peptides* (en revisión).
- DECUYPERE E., SCANES C.G. y KÜHN E.R. (1983). Effects of glucocorticoids on circulating concentrations of thyroxine (T_4) and triiodothyronine (T_3) and on

- peripheral monodeiodination in pre- and post-hatching chickens. *Horm. Metab. Res.* **15**:223-236.
- DEMSKI L.S. (1973). Feeding and aggressive behavior evoked by hypothalamic stimulation in a cichlid fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **44A**:685-692.
- DEMSKI L.S. (1983). Behavioral effects of electrical stimulation of the brain. En: "Fish neurobiology. Higher brain areas and functions" Vol. 2 (Eds: Davis R.E y Northcutt R.G.) The University of Michigan Press, Michigan. pp. 317-359.
- DEMSKI L.S. y KNIGGE K.M. (1971). The telencephalo and hypothalamus of the bluegill *Lepomis macrochirus*: evoked feeding, aggressive and reproductive behaviour with representative frontal sections. *J. Comp. Endocrinol.* **143**:1-16.
- DENBOW D.M. y McCORMACK J.F. (1990). Central versus peripheral opioid regulation of ingestive behavior in the domestic fowl. *Comp. Biochem. Physiol.* **96C**:211-216.
- DENVER R.J. (1988). Several hypothalamic peptides stimulate *in vitro* thyrotropic secretion by pituitaries of anuran amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* **72**:383-393.
- DENVER R.J. y LICHT P. (1989). Neuropeptide stimulation of thyrotropin secretion in the larval bullfrog: Evidence for a common neuroregulator of thyroid and interrenal activity in metamorphosis. *J. Exp. Zool.* **252**:101-104.
- DEVICHE P. (1992). Testosterone and opioids interact to regulate feeding in a male migratory songbird. *Horm. Behav.* **26**:394-405.
- DICKHOFF W.W. y DARLING D.S. (1983). Evolution of thyroid function and its control in lower vertebrates. *Am. Zool.* **23**:697-707.
- DICKHOFF W.W., CRIM J.W. y GORBMAN A. (1978). Lack of effect of synthetic thyrotropin releasing hormone on Pacific hagfish (*Eptatretus stouti*) pituitary-thyroid tissues *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **35**:96-98.
- DONALDSON E.M., FAGERLUNG U.H.M., HIGGS D.A. y McBRIDE J.R. (1979). Hormonal enhancement of growth. En: "Fish Physiology" Vol. III (Eds: Hoar W.S., Randall D.J. y Brett J.R.) Academic Press, New York. pp. 456-578.
- DORES R.M. (1990). The proopiomelanocortin family. En: "Progress in Comparative Endocrinology". Progress in Clinical and Biological Research. Vol. 342 (Eds: Epple A., Scanes C.G. y Stetson M.H.) Wiley-Liss, New York. pp. 22-27.
- DORES R.M., STEVESON T.C. y JOSS J.M.P. (1988a). The isolation of multiple forms of β -endorphin from the intermediate pituitary of the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Peptides* **9**:801-808.
- DORES R.M., SEI C.A., MORRISSEY M.E., CRIM J.W. y KAWAUCHI H. (1988b). Forms of immunoreactive β -endorphin in the intermediate pituitary of the holostean fish, *Amia calva*. *Peptides* **9**:65-70.

- DORES R.M., McDONALD L.K., STEVESON T.C. y SEI C.A. (1990). The molecular evolution of neuropeptides: prospects for the '90s. *Brain Behav. Evol.* **36**:80-99.
- DORES R.M., McDONALD L.K., GOLDSMITH A., DEVICHE P. y RUBIN D.A. (1993a). The phylogeny of enkephalins: speculations on the origins of opioid precursors. *Cell. Physiol. Biochem.* **3**:231-244.
- DORES R.M., KANEKO D.J. y SANDOVAL F. (1993b). An anatomical and biochemical study of the pituitary proopiomelanocortin systems in the polypteriform fish *Calamoichthys calabaricus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **90**:87-99.
- DORES R.M., KELLER H., WHITE Y., MARRA L.E. y YOUSON J.H. (1994). Detection of *N*-acetylated forms of α -MSH and β -endorphin in the intermediate pituitary of the holostean fish, *Lepisosteus spatula*, *Lepisosteus osseus*, and *Amia calva*. *Peptides* **15**:483-487.
- DRESCHER V.S., CHEN H-L. y ROMSOS D.R. (1994). Corticotropin-releasing hormone decreases feeding, oxygen consumption and activity of genetically obese (*ob/ob*) and lean mice. *J. Nutr.* **124**:524-530.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. y SMITH F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**:350-356.
- DUBOIS M.P., BILLARD R., BRETON B. y PETER R.E. (1979). Comparative distribution of somatostatin, LHRH, neurophysin and endorphin in the rainbow trout: an immunocytological study. *Gen. Comp. Endocrinol.* **37**:220-232.
- DUNN A.J. y BERRIDGE C.W. (1990). Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res. Rev.* **15**:71-100.
- DUONG A. y WEINGARTEN H.P. (1993). Dopamine antagonists act on central, but not peripheral, receptors to inhibit sham and real feeding. *Physiol. Behav.* **54**:449-454.
- EALES J.G. (1985). The peripheral metabolism of thyroid hormones and regulation of thyroidal status in poikilotherms. *Can. J. Zool.* **63**:1217-1231.
- EALES J.G. (1988). The influence of nutritional state on thyroid function in various vertebrates. *Am. Zool.* **28**:351-362.
- EALES J.G. (1990). Thyroid function in poikilotherms. En: "Progress in Comparative Endocrinology". Progress in Clinical and Biological Research. Vol. 342 (Eds: Epplé A., Scanes C.G. y Stetson M.H.) Wiley-Liss, New York. pp. 415-420.
- EALES J.G. y SHOSTAK S. (1985a). Free T_4 and T_3 in relation to total hormone, free hormone indices, and protein in plasma of rainbow trout and arctic charr. *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**:291-302.

- EALES J.G. y SHOSTAK S. (1985b). Correlations between food ration, somatic growth and thyroid function in Arctic charr, *Salvelinus fontinalis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **80A**:553-558.
- EALES J.G. y HIMICK B.A. (1988). The effects of TRH on plasma thyroid hormone levels of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **72**:333-339.
- EALES J.G., HUGHES M. y UIN L. (1981). Effect of food intake on diel variation in plasma thyroid hormone levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **45**:167-174.
- EALES J.G., OMELJANIUK R.J. y SHOSTAK S. (1983). Reverse T₃ in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **50**:395-406.
- EMOTO H., YOKOO H., YOSHIBA M. y TANAKA M. (1993). Corticotropin-releasing factor enhances noradrenaline release in the rat hypothalamus assessed by intracerebral microdialysis. *Brain Res.* **601**:286-288.
- ENRENSING R.H. y MITCHELL G.F. (1982). Similar antagonism of morphine analgesia by MIF-1 and naloxone in *Carassius auratus*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **17**:757-761.
- ESA, Inc. (1992). Coulochem II, operating manual. Bedford. pp. 5.1-5.27.
- ESCOBAR F., ESCOBAR H. y MORREALE G. (1992). Fisiología del tiroides. En: "Fisiología humana" (Ed., Tresguerres, J.A.F.) Interamericana-McGraw-Hill, Madrid. pp. 947-970.
- FALCÓN J., THIBAUT C., BEGAY V., ZACHMANN A. y COLLIN J-P. (1992). Regulation of the rhythmic melatonin secretion by fish pineal photoreceptor cells. En: "Rhythms in fishes". NATO ASI Series. Vol. A236 (Ed., Ali M.A.) Plenum Press, New York. pp. 167-198.
- FÄNGE R. y GROVE D. (1979). Digestion. En: "Fish physiology" Vol. III (Eds: Hoar W.S., Randall D.J. y Brett J.R.) Academic Press, New York. pp. 161-259.
- FENDERSON O.C., EVENHART W.H. y MUTH K.M. (1968). Comparative, agonistic and feeding behaviour of hatchery-reared and wild salmon in aquaria. *J. Fish. Res. Board Can.* **25**:1-14.
- FERNÁNDEZ-RUIZ J.J., HERNÁNDEZ M.L., DE MIGUEL R. y RAMOS J.A. (1991). Nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic activities were modified through the ovarian cycle of female rats. *J. Neural Transm.* **85**:223-229.
- FERNSTROM J.D. y FERNSTROM M.H. (1994). Dietary effects on tyrosine availability and catecholamine synthesis in the central nervous system: possible relevance to the control of protein intake. *Proc. Nutr. Soc.* **53**:419-429.

- FLETCHER D.J. (1984a). The physiological control of appetite in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **78A**:617-628.
- FLETCHER D.J. (1984b). Plasma glucose and plasma fatty acid levels of *Limanda limanda* (L.) in relation to season, stress, glucose loads and nutritional state. *J. Fish Biol.* **25**:629-648.
- FLOOD C.G. y EALES J.G. (1983). Effects of starvation and refeeding on plasma T₄ and T₃ levels and T₄ deiodination in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Zool.* **61**:1949-1953.
- FOLCH J., LEES M. y SLOANE-STANLEY G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**:497-509.
- FOLLÉNIUS E. y DUBOIS M.P. (1978a). Distribution of fibers reacting with an α -endorphin antiserum in the neurohypophysis of *Carassius auratus* and *Cyprinus carpio*. *Cell. Tissue Res.* **189**:251-256.
- FOLLÉNIUS E. y DUBOIS M.P. (1978b). Immunocytochemical detection and localization of a peptide reacting with an α -endorphin antiserum in the corticotropin and melanotropic cells of the trout pituitary (*Salmo irideus* Gibb). *Cell. Tissue Res.* **188**:273-283.
- FOSTER G.D. y MOON T.W. (1991). Hypometabolism with fasting in the yellow perch (*Perca flavescens*), a study of enzymes, hepatocyte metabolism, and tissue size. *Physiol. Zool.* **64**:259-275.
- FOWLER C.J. y FRASER G.L. (1994). μ -, δ -, k-opioid receptors and their subtypes. A critical review with emphasis on radioligand binding experiments. *Neurochem. Int.* **24**:401-426.
- FURUICHI M. y YONE Y. (1981). Change of blood sugar and plasma insulin levels of fishes in glucose tolerance test. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **47**:761-764.
- FRYER J.N. y LEDEREIS K. (1986). Control of corticotropin secretion in teleost fishes. *Am. Zool.* **26**:1017-1026.
- GAMBERT S.R., GARTHWAITE T.L., PONTZER C.H. y HAGEN T.C. (1980). Fasting associated with decrease in hypothalamic β -endorphin. *Science* **210**:1271-1272.
- GANCEDO B., CORPAS I., ALONSO-GÓMEZ A.L., DELGADO M.J., MORREALE DE ESCOBAR G. y ALONSO-BEDATE M. (1992). Corticotropin-releasing factor stimulates metamorphosis and increases thyroid hormone concentration in prometamorphic *Rana perezi* larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* **87**:6-13.
- GANCEDO B., ALONSO-GÓMEZ A.L., DE PEDRO N., CORPAS I., DELGADO M.J. y ALONSO-BEDATE M. (1995a). Seasonal changes in thyroid activity in male and female frog, *Rana perezi*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **97**:66-75.

- GANCEDO B., ALONSO-GÓMEZ A.L., DE PEDRO N., DELGADO M.J. y ALONSO-BEDATE M. (1995b). Daily changes in thyroid activity in the frog *Rana perezi*. Variation with season. *Physiol. Zool.* (en revisión).
- GARCÍA DE FRUTOS P., BONAMUSA L. y BAANANTE I.V. (1991). Metabolic changes in fish liver during the starved-to-fed transition. *Comp. Biochem. Physiol.* **98A**:329-331.
- GARCÍA DE MARINA A. y DEL CASTILLO B. (1988). Cromatografía líquida de alta resolución. Editorial Limusa, México.
- GILLIES G., LINTON E. y LOWRY, P. (1989). The physiology of corticotropin-releasing factor. En: "Endocrinology" Vol. 1 (Ed., DeGroot L.J.) Saunders, Philadelphia. pp. 167-175.
- GIRAUDO S.Q., GRACE M.K., WELCH C.C., BILLINGTON C.J. y LEVINE A.S. (1993). Naloxone's anorectic effect is dependent upon the relative palatability of food. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **46**:917-921.
- GIUSTINA A., GIRELLI A., LICINI M., SCHETTINO M. y NEGRO-VILAR A. (1992). Thyrotropin and prolactin secretion are not affected by porcine and rat galanin in normal subjects. *Horm. Metab. Res.* **24**:351-352.
- GIUSTINA A., LICINI M., SCHETTINO M., DOGA M., PIZZOCOLO G. y NEGRO-VILAR A. (1994). Physiological role of galanin in the regulation of anterior pituitary function in humans. *Am. J. Physiol.* **266**:E57-E61.
- GLOWA J.R. y GOLD P.W. (1991). Corticotropin releasing hormone produces profound anorexigenic effects in the rhesus monkey. *Neuropeptides* **18**:55-61.
- GLOWA J.R., BACHER J.D., HERKENHAM M. y GOLD P.W. (1991). Selective anorexigenic effects of corticotropin releasing hormone in the rhesus monkey. *Prog. Neuro-Psycopharmacol. Biol. Psychiat.* **15**:379-91.
- GLOWA J.R., BARRET J.E., RUSSELL J. y GOLD P.W. (1992). Effects of corticotropin releasing hormone on appetitive behaviors. *Peptides* **13**:609-621
- GONZÁLEZ G.C., BELENKY M.A., POLENOV A.L. y LEDEREIS, K. (1992). Comparative localization of corticotropin and corticotropin releasing factor-like peptides in the brain and hypophysis of a primitive vertebrate, the sturgeon *Accipenser ruthenus* L. *J. Neurocytol.* **21**:885-896.
- GORDON J.T., CRUTCHFIELD F.L., JENNINGS A.S. y DRATMAN M.B. (1982). Preparation of lipid-free tissue extracts for chromatographic determination of thyroid hormones and metabolites. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**:407-418.
- GOSNELL B.A. y KRAHN D.D. (1993). The effects of continuous morphine infusion on diet selection and body weight. *Physiol. Behav.* **54**:853-859.

- GOSNELL B.A. y PATEL C.K. (1993). Centrally administered μ - and δ -opioid agonists increase operant responding for saccharin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **45**:979-982.
- GOSNELL B.A., MORLEY J.E. y LEVINE A.S. (1983). Adrenal modulation of the inhibitory effect of corticotropin releasing factor on feeding. *Peptides* **4**:807-812.
- GRANDISON L. y GUIDOTTI A. (1977). Stimulation of food intake by muscimol and beta endorphin. *Neuropharmacology* **16**:533-536.
- GRAU F.G. (1988). Environmental influences on thyroid function in teleost fish. *Am. Zool.* **28**:329-335.
- GRAU F.G., HELMS L.M.H., SHIMODA S.K., FORD C.A., LEGRAND J. y YAMAUCHI K. (1986). The thyroid gland of the Hawaiian parrotfish and its use as an *in vitro* model system. *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**:100-108.
- GRIGORIADIS D.E., HEROUX J.A. y DE SOUZA E.B. (1992). Characterization and regulation of corticotropin-releasing factor receptors in the central nervous, endocrine and immune systems. En: "Corticotropin-releasing factor, Proceedings of Ciba Foundation Symp." Vol. 172 (Eds: Chadwick D.J., Marchs J. y Ackrill K.) Wiley-Sons, Chichester. pp. 85-107.
- GRIM R.J. (1960). Feeding behavior and electrical stimulation of the brain of *Carassius auratus*. *Science* **131**:162.
- GROVE D.J., LOIZIDES L. y NOTT J. (1978). Satiation amount, frequency of feeding and gastric emptying rate in *Salmo gairdneri*. *J. Fish Biol.* **12**:507-516.
- GUERRERO H.Y., CÁCERES G., PAIVA C.L. y MARCANO D. (1990). Hypothalamic and telencephalic catecholamine content in the brain of the teleost fish, *Pygocentrus notatus*, during the annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **80**:257-263.
- GUYTON A.C. (1991). Equilibrio de la alimentación; control de la ingesta; obesidad e inanición; vitaminas y minerales. En: "Tratado de fisiología médica" (Ed., Guyton A.C.) Interamericana McGraw-Hill, New York. pp. 813-824.
- HAIBACH H. (1971). Free iodothyronines in the rat thyroid gland. *Endocrinology* **88**:149-154.
- HAIRSTON N.G.Sr. (1994a). Adaptations to different environments. En: "Vertebrate zoology. An experimental field approach" University Press, Cambridge. pp. 121-144.
- HAIRSTON N.G.Sr. (1994b). Groups of vertebrate species (communities). En: "Vertebrate zoology. An experimental field approach" University Press, Cambridge. pp. 167-176.
- HARLING H. (1993). Galanin: a candidate neurotransmitter in the porcine gastrointestinal tract. *Danish Med. Bull.* **40**:511-518.

- HARLING H. y HOLST J.J. (1992). Circulating galanin: origin, metabolism, and pharmacokinetics in anesthetized pigs. *Am. J. Physiol.* **262**:E52-E57.
- HEALEY E.G. (1957). The nervous system. En: "The physiology of fishes" Vol. II (Ed., Brown M.E.) Academic press, New York. pp. 1-119.
- HEINRICHS S.C. y KOOB G.F. (1992). Corticotropin-releasing factor modulates dietary preference in nutritionally and physically stressed rats. *Psychopharmacology* **109**:177-184.
- HEINRICHS S.C., MENZAGHI F., PICH E.M., HAUGER R.L. y KOOB G.F. (1993). Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res.* **611**:18-24.
- HERNÁNDEZ R., OTERO J., REY P., ROZAS G. y ALDEGUNDE M. (1994). Monoamine neurotransmitters in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary: identification and some methodological aspects. *17th Conference of European Endocrinologists. Córdoba, Spain.* pp. 297.
- HIGGS D.A. y EALES J.G. (1977). Influence of food deprivation on radioiodothyronine and radioiodide kinetics in yearling brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) with a consideration of the extent of L-thyroxine conversion to 3,5,5'-triiodo-L-thyronine. *Gen. Comp. Endocrinol.* **32**:29-40.
- HIGGS D.A., FAGERLUND U.H.M., EALES J.G. y McBRIDE J.R. (1982). Application of thyroid and steroid hormones as anabolic agents in fish culture. *Comp. Biochem. Physiol.* **73B**:143-176.
- HIMICK B.A. y EALES J.G. (1990). The acute effects of food and glucose challenge on plasma thyroxine and triiodothyronine levels in previously starved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **78**:34-41.
- HIMICK B.A. y PETER R.E. (1994a). Bombesin acts to suppress feeding behavior and alter serum growth hormone in goldfish. *Physiol. Behav.* **55**:65-72.
- HIMICK B.A. y PETER R.E. (1994b). CCK/gastrin-like immunoreactivity in brain and gut, and CCK suppression of feeding in goldfish. *Am. J. Physiol.* **267**:R841-R851.
- HIMICK B.A., HIGGS D.A., y EALES J.G. (1991). The acute effects of alteration in the dietary concentrations of carbohydrate, protein, and lipid on plasma T₄, T₃, and glucose levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **82**:451-458.
- HOEBEL B.G. y HERNÁNDEZ L. (1993). Basic neural mechanisms of feeding and weight regulation. En: "Obesity: theory and therapy" (Eds: Stunkard A.J. y Wadden T.A.) Raven Press, New York. pp. 43-62.

- HOLMGREN S., GROVE D.J. y FLETCHER D.J. (1983). Digestion and the control of gastrointestinal motility. En: "Control processes in fish physiology" (Eds: Rankin J.C., Pitcher T.J. y Duggan R.T.) Croom Helm, London. pp. 23-40.
- HOLMQVIST B.I. y EKSTRÖM P. (1991). Galanin-like immunoreactivity in the brain of teleosts: distribution and relation to substance P, vasotocin, and isotocin in the atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Comp. Neurol.* **306**:361-381.
- HUGHES J., SMITH T.W., KOSTERLITZ H.W., FOTHERGILL L.A., MORGAN B.A. y MORRIS H.R. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **258**:577-579.
- HUGUES J., BURGER A.G., PEKARY A.E. y HERSHMAN J.M. (1984). Rapid alterations of serum thyrotropin, triiodothyronine and reverse triiodothyronine levels to short-term starvation and refeeding. *Acta Endocrinol.* **105**:194-199.
- HULTING A-L., LAND T., BERTHOLD M., LANGEL Ü., HÖKFELT T. y BARTFAI T. (1993). Galanin receptors from human pituitary tumors assayed with human galanin as ligand. *Brain Res.* **625**:173-176.
- ISHIWATA N. (1979). Ecological studies on the feeding of fishes. XI External factors affecting satiation amount. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **45**:1275-1276.
- JACOBS G.F.M. y KÜHN E.R. (1989). Thyroid function may be controlled by several hypothalamic factors in frogs and at least by one in the neotenic axolotl. *XIth International Symposium on Comparative Endocrinology. Málaga, Spain.* pp. 174.
- JOHNSON L.R. (1987). *Physiology of the gastrointestinal tract.* Raven Press.
- JOHNSON P.S., WANG J.B., WANG W.F. y UHL G.R. (1994). Expressed mu opiate receptor couples to adenylate cyclase and phosphatidyl inositol turnover. *Neuroreport* **5**:507-509.
- JOHNSON J.I. y BJÖRNSSON B.Th. (1994). Growth hormone increases growth rate, appetite and dominance in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Anim. Behav.* **48**:177-186.
- JÓZSA R. y MESS B. (1993). Galanin-like immunoreactivity in the chicken brain. *Cell Tissue Res.* **273**:391-399.
- KARILA P. (1993). Galanin-like immunoreactivity in extrinsic and intrinsic nerves to the gut of the Atlantic cod, *Gadus morhua*, and the effect of galanin on the smooth muscle of the gut. *Cell Tissue Res.* **271**:537-544.
- KASTIN A.J., BANKS W.A., HAHN K. y ZADINA J.E. (1994a). Extreme stability of Tyr-MIF-1 in CSF. *Neurosci. Lett.* **174**:26-28.

- KASTIN A.J., HAHN K., ERCHEGYI J., ZADINA J.E., HACKLER L., PALMGREN M. y BANKS W.A. (1994b). Differential metabolism of Tyr-MIF-1 and MIF-1 in rat and human plasma. *Biochem. Pharmacol.* **47**:699-709.
- KAVALIERS M. (1983). Pineal mediation of the thermoregulatory and behavioral activating effects of β -endorphin. *Peptides* **3**:679-685.
- KAVALIERS M. (1989). Day-night rhythms of shoaling behavior in goldfish: opioid and pineal involvement. *Physiol. Behav.* **46**:167-172.
- KAVALIERS M., HIRTS M. y TESKEY G.C. (1984). Opioid-induced feeding in the slug, *Limax maximus*. *Physiol Behav.* **33**:765-767.
- KAWAUCHI H., TUBOKAWA M., KANEZAWA A. y KITAGAWA H. (1980). Occurrence of two different endorphins in the salmon pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**:1278-1288.
- KETOLA H.G. (1982). Amino acid nutrition of fishes: requirements and supplementation of diets. *Comp. Biochem. Physiol.* **73B**:17-24.
- KHAWAJA X.Z. y GREEN I. C. (1991). Dual action of beta-endorphin on insulin release in genetically obese and lean mice. *Peptides* **12**:227-233.
- KHAWAJA X.Z., CHATTOPADHYAY A.K. y GREEN I.C. (1991). Increased β -endorphin and dynorphin concentrations in discrete hypothalamic regions of genetically obese (ob/ob) mice. *Brain Res.* **555**:164-168.
- KILIAAN A.J., HOLMGREN S., JÖSSON A-C., DEKKER K. y GROOT J.A. (1993). Neuropeptides in the intestine of two teleost species (*Oreochromis mossambicus*, *Carassius auratus*): localization and electrophysiological effects on the epithelium. *Cell Tissue Res.* **271**:123-134.
- KINLAW W.B., SCHWARTZ H.L. y OPPENHEIMER J.H. (1985). Decreased serum triiodothyronine in starving rats is due primarily to diminished thyroidal secretion of thyroxine. *J. Clin. Investig.* **75**:1238-1241.
- KNIGHTS B. (1983). Food particle-size preferences and feeding behaviour in warmwater aquaculture of european eel *Anguilla anguilla* L.. *Aquaculture* **30**:173-190.
- KNIGHTS B. (1985). Feeding behavior and fish culture. En: "Nutrition and feeding in fish" (Eds: Cowey C.B., Mackie A.M. y Bell J.G.) Academic Press, London. pp. 223-241.
- KOCH J.E. y BODNAR R.J. (1994). Selective alterations in macronutrient intake of food-deprived or glucoprivic rats by centrally-administered opioid receptor subtype antagonists in rats. *Brain Res.* **657**:191-201.
- KOMAKI G., TAMAI H., SUMIOKI H., MORI T., KOBAYASHI N. y MORI K. (1990). Plasma β -endorphin during fasting in man. *Horm. Res.* **33**:239-243.

- KRAHN D.D., GOSNELL B.A., GRACE M. y LEVINE A.S. (1986). CRF antagonist partially reverses CRF-and stress-induced effects on feeding. *Brain Res. Bull.* **17**:285-289.
- KRSTULOVIC A.M. (1982). Investigations of catecholamine metabolism using high-performance liquid chromatography. Analytical methodology and clinical applications. *J. Chromatogr.* **229**:1-6.
- KRUNK H. (1963). Diurnal periodicity in the activity of the common sole, *Solea solea*. *Neth. J. Sea Res.* **2**:177-193.
- KÜHN E.R. (1990). Hormonal control of peripheral monodeiodination in vertebrates. En: "Progress in Comparative Endocrinology". Progress in Clinical and Biological Research. Vol. 342 (Eds: Epplé A., Scanes C.G. y Stetson M.H.) Wiley-Liss, New York. pp. 421-426.
- KÜHN E.R., HUYBRECHTS L.M., GOVAERTS F., VERBEECK E. y OLLEVIER F. (1986). The thyroxine-stimulating activity is only present in the glycoprotein and not in the protein fraction of a carp hypophyseal homogenate. *Gen. Comp. Endocrinol.* **63**:321-327.
- KÜHN E.R., MOL K.A. y DARRAS V.M. (1993). Control strategies of thyroid hormone monodeiodination in vertebrates. *Zool. Sci.* **10**:873-885.
- KYRKOULI S.E., STANLEY B.G. y LEIBOWITZ S.F. (1986). Galanin: stimulation of feed induced by medial hypothalamic injection of this novel peptide. *Eur. J. Pharmacol.* **122**:159-160.
- KYRKOULI S., STANLEY B.G., SEIRAFI R.D. y LEIBOWITZ S.F. (1990a). Stimulation of feeding by galanin: anatomical localization and behavioral specificity of this peptide's effect in the brain. *Peptides* **11**:995-1001.
- KYRKOULI S., STANLEY B.G., HUTCHINSON R., SEIRAFI R.D. y LEIBOWITZ S.F. (1990b). Peptide-amine interactions in the hypothalamic paraventricular nucleus: analysis of galanin and neuropeptide Y in relation to feeding. *Brain Res.* **521**:185-191.
- KYRKOULI S.E., STANLEY B.G. y LEIBOWITZ S.F. (1992). Differential effect of galanin and neuropeptide Y on extracellular norepinephrine levels in the paraventricular hypothalamic nucleus of the rat: a microdialysis study. *Life Sci.* **51**:203-210.
- LAGLER K.F., BARDACH J.E., MILLER R.R. y PASSINO D.R.M. (1984). Alimentos, digestión, nutrición y crecimiento. En: "Ictiología" AGT Editor, México. pp. 125-167.
- LAND T., LANGEL Ü. y BARTFAI T. (1991). Hypothalamic degradation of galanin (1-29) and galanin (1-16). Identification and characterization of the peptidolytic products. *Brain Res.* **558**:245-250.

- LANGHANS W. y SCHARRER E. (1992). Metabolic control of eating. *World Rev. Nutr. Diet.* **70**:1-67.
- LAVICKY J. y DUNN A.J. (1993). Corticotropin-releasing factor stimulates catecholamine release in hypothalamus and prefrontal cortex in freely moving rats as assessed by microdialysis. *J. Neurochem.* **60**:602-612.
- LEATHERLAND J.F. (1982). Effect of ambient salinity, food deprivation and prolactin on the thyroidal response to TSH, and *in vitro* hepatic T₄ to T₃ conversion in yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Acta Zool.* **63**:55-64.
- LEATHERLAND J.F. (1987). Thyroid hormones and reproduction. En: "Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles" (Eds: Norris D.O. y Jones R.E.) Plenum Press, New York. pp. 411-431.
- LEATHERLAND J.F. (1988). Endocrine factors affecting thyroid economy of teleost fish. *Am. Zool.* **28**:319-328.
- LEDERIS K.P., OKAWARA Y., RICHTER D. y MORLEY S.D. (1990). Evolutionary aspects of corticotropin releasing hormone. En: "Progress in Comparative Endocrinology". Progress in Clinical and Biological Research. Vol. 342 (Eds: Epplé A., Scanes C.G. y Stetson M.H.) Wiley-Liss, New York. pp. 467-472.
- LEE E.H.Y., CHANG S.Y. y CHEN A.Y.J. (1994). CRF facilitates NE release from the hippocampus: a microdialysis study. *Neurosci. Res.* **19**:327-330.
- LEFKOWITZ R.J. y CARON M.G. (1987). Molecular and regulatory properties of adrenergic receptors. *Res. Prog. Horm. Res.* **43**:469-497.
- LEIBOWITZ S.F. (1986). Brain monoamines and peptides: role in the control of eating behavior. *Fed. Proc.* **45**:1396-1403.
- LEIBOWITZ S.F. (1992). Neurochemical-neuroendocrine systems in the brain controlling macronutrient intake and metabolism. *Trends Neurosci.* **15**:491-497.
- LEIBOWITZ S.F. y HOR L. (1982). Endorphinergic and α -noradrenergic systems in the paraventricular nucleus: effects on eating behavior. *Peptides* **3**:421-428.
- LEIBOWITZ S.F. y KIM T. (1992). Impact of a galanin antagonist on exogenous galanin and natural patterns of fat ingestion. *Brain Res.* **599**:148-152.
- LEVINE A.S., MORLEY J.E., GOSNELL B.A., BILLINGTON C.J. y BARTNESS T.J. (1985). Opioids and consummatory behavior. *Brain Res. Bull.* **14**:663-672.
- LEVINE A.S., GRACE M., BILLINGTON C.J. y PORTOGHESE P.S. (1990). Nor-binaltorphimine decreases deprivation and opioid-induced feeding. *Brain Res.* **534**:60-64.

- LI C.H. y CHUNG D. (1976). Isolation and structure of an untriakontapeptides with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:1145-1148.
- LINDSKOG S., AHRÉN B., DUNNING B.E. y SUNDLER F. (1991). Galanin-immunoreactive nerves in the mouse and rat pancreas. *Cell Tissue Res.* **264**:363-368.
- LINTLOP S.P. y YOUSON J.H. (1983). Binding of thriiodothyronine to hepatocyte nuclei from sea lampreys, *Petromyzon marinus* L., at various stages of the life cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **49**:428-436.
- LIPOSITS Z. y PAULL W.K. (1989). Association of dopaminergic fibers with corticotropin releasing hormone (CRH)-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Histochemistry* **93**:119-127.
- LIPOSITS Z., PHELIX C. y PAULL W.K. (1986). Adrenergic innervation of corticotropin releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus of the rat. *Histochemistry* **84**:201-205.
- LÓPEZ AVALOS M.D., MANCERA J.M., PÉREZ-FIGARES J.M. y FERNÁNDEZ-LLÉBREZ P. (1993). Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor in the brain of the turtle, *Mauremys caspica*. *Anat. Embryol.* **188**:163-171.
- LÓPEZ-CALDERÓN A. (1992). Glándulas suprarrenales. En: "Fisiología humana" (Ed., Tresguerres, J.A.F.) Interamericana-McGraw-Hill, Madrid. pp. 971-991.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. y RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- LOWRY M.T. y YIM G.K.W. (1980). Selective reduction by dexamethasone of stress-related hyperphagias. *Life Sci.* **27**:2553-2558.
- MAGLIULO-CEPRIANO L., SCHREIBMAN M.P. y BLÜM V. (1993). The distribution of immonoreactive FMRF-amide, neurotensin, and galanin in the brain and pituitary gland of three species of *Xiphophorus* from birth to sexual maturity. *Gen. Comp. Endocrinol.* **92**:269-280.
- MAGNUSON J.J. (1962). An analysis of aggressive behaviour, growth, and competition for food and space in medaka *Oryzias latipes*. *Can. J. Zool.* **40**:313-363.
- MAGNUSON J.J. (1969). Digestion and food consumption by the skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Trans. Am. Fish. Soc.* **98**:379-392.
- MAGURRAN A. (1984). Gregarious goldfish. *New Scientist* **103**:32-33.
- MALLOL J., OBREGÓN M.J. y MORREALE DE ESCOBAR G. (1982). Analytical artifacts in radioimmunoassay of thyroxine in human milk. *Clin. Chem.* **28**:1277-1282.

- MANCERA J.M., LÓPEZ AVALOS M.D., PÉREZ-FIGARES J.M. y FERNÁNDEZ-LLÉBREZ P. (1991). The distribution of corticotropin-releasing factor immunoreactive neurons and nerve fibers in the brain of the snake, *Natrix maura*. *Cell. Tissue Res.* **264**:539-548.
- MANTEFIEL B.P., GIRSA I.I. y PAVLOV D.S. (1978). On rhythms of fish behavior. En: "Rhythmic activity of fishes" (Ed., Thorpe J.E.) Academic Press, London. pp. 215-224.
- MANZANARES J., DURHMAN R.A., LOOKINGLAND K.J. y MOORE K.E. (1993). δ -opioid receptor-mediated regulation of central dopaminergic neurons in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **249**:107-112.
- MARSDEN C.A. y JOSEPH M.H. (1986). Biogenic amines. En: "HPLC of small molecules, a practical approach" (Ed., Lim C.K.) IRL Press, Oxford. pp. 29-47.
- MATZ S.P. y TAKAHASHI T.T. (1994). Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the brain of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Comp. Neurol.* **345**:214-223.
- McKAY L.D., KENNEY N.J., EDENS N.K., WILLIAMS R.H. y WOODS S.C. (1981). Intracerebroventricular β -endorphin increases food intake of rats. *Life Sci.* **29**:1429-1434.
- McLEAN S. y HOEBEL B.G. (1982). Opiate and norepinephrine-induced feeding from the paraventricular nucleus of the hypothalamus are dissociable. *Life Sci.* **31**:2379-2382.
- MEEUWIS R., MICHIENSEN R., DECUYPERE E. y KÜHN E.R. (1989). Thyrotropic activity of the ovine corticotropin-releasing factor in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* **76**:357-363.
- MERCHENTHALER I., VIGH S., PETRUSZ P. y SCHALLY A.V. (1982). Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Amer. J. Anat.* **165**:385-396.
- MERCHENTHALER I., LÓPEZ F.J. y NEGRO-VILAR A. (1993). Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Prog. Neurobiol.* **40**:711-769.
- MICHENER S.R., AIMONE L.D., YAKSH T.L. y GO V.L.W. (1990). Distribution of galanin-like immunoreactivity in the pig, rat, and human central nervous system. *Peptides* **11**:1217-1223.
- MIDGLEY Jr. A.R., NISWENDER G.D. y REBAR R.W. (1969). Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). *Acta Endocrinol. Suppl.* **142**: 163-180.
- MILNE R.S., LEATHERLAND J.F. y HOLUB B.J. (1979). Changes in plasma thyroxine, triiodothyronine and cortisol associated with starvation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Environ. Biol. Fish* **4**:185-190.

- MITCHELL M.A. y RAZA A. (1986). The effects of glucagon and insulin on plasma thyroid hormone levels in fed and fasted domestic fowls. *Comp. Biochem. Physiol.* **85A**:217-223.
- MITCHELL M.A., MACLEOD M.G. y RAZA A. (1986). The effects of ACTH and dexamethasone upon plasma thyroid hormone levels and heat production in the domestic fowl. *Comp. Biochem. Physiol.* **85A**:207-215.
- MITOME M., HONMA S., YOSHIHARA T. y HONMA K-I. (1994). Prefeeding increase in paraventricular NE release is regulated by a feeding-associated rhythm in rats. *Am. J. Physiol.* **266**:E606-E611.
- MITSUMA T., HIROOKA Y. y NOGIMORI T. (1993). Effects of immunoneutralization of endogenous opioid peptides on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in rats. *Horm. Res.* **39**:77-80.
- MOLINA P.E. y ABUMRAD N.N. (1994). Metabolic effects of opiates and opioid peptides. *Adv. Neuroimmunol.* **4**:105-116.
- MÖNNIKES H., SCHMIDT B.G., RAYBOULD H.E. y TACHE Y. (1992). CRF in the paraventricular nucleus mediates gastric and colonic motor response to restraint stress. *Am. J. Physiol.* **262**:G137-G143.
- MONTGOMERY R. (1957). Determination of glycogen. *Arch. Biochem. Biophys.* **67**:378-386.
- MOONS L., BATTEN T.F.C. y VANDESANDE F. (1991). Autoradiographic distribution of galanin binding sites in the brain and pituitary of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Neurosci. Lett.* **123**:49-52.
- MORIEN A., McMAHON L. y WELLMAN P.J. (1993). Effects on food and water intake of the α_1 -adrenoceptor agonists amidephrine and SK&F-89746. *Life Sci.* **53**:169-174.
- MORIMOTO A., NAKAMORI T., MORIMOTO K., TAN N. y MURAKAMI N. (1993). The central role of corticotropin-releasing factor (CRF-41) in psychological stress in rats. *J. Physiol.* **460**:221-229.
- MORIN P.P., HARA T.J. y EALES J.G. (1993). Thyroid hormone deiodination in brain, liver, gill, heart and muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during photoperiodically-induced parr-smolt transformation. I. Outer- and inner-ring thyroxine deiodination. *Gen. Comp. Endocrinol.* **90**:142-156.
- MORLEY J.E. (1987). Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocr. Rev.* **8**:25-6-287.
- MORLEY J.E. y LEVINE A.S. (1982). Corticotropin-releasing factor, grooming and ingestive behavior. *Life Sci.* **31**:1459-1464.

- MORLEY J.E. y SILVER A.J. (1991). Role of the endocrine brain in the control of eating and drinking. En: "Brain endocrinology" (Ed., Motta M.) Raven Press, New York. pp. 431-447.
- MORLEY J.E., GOSNELL B.A. y KRAHN D.D. (1985). Peptides as central regulators of feeding. *Brain Res. Bull.* **14**:511-519.
- MORREALE DE ESCOBAR G., PASTOR R., OBREGÓN M.J. y ESCOBAR DEL REY F. (1985). Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* **117**:1890-1900.
- MORREALE DE ESCOBAR G., OBREGÓN M.J., RUIZ DE OÑA C. y ESCOBAR DEL REY F. (1988). Transfer of thyroxine from the mother to the rat fetus near term. Effects on brain 3,5,3'-triiodothyronine deficiency. *Endocrinology* **122**:1521-1531.
- MURPHY H.M. y WIDEMAN C.H. (1992). Vasopressin, cortisosterone levels, and gastric ulcers during food-restriction stress. *Peptides* **13**:373-376.
- NAKANISHI S., INOUE A., KITA T., NAKAMURA M., CHUNG A.C.Y., COHEN N. y NUMA S. (1979). Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* **278**:423-427.
- NAVARRO I., GUTIÉRREZ J. y PLANAS J. (1992). Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of the year. *Comp. Biochem. Physiol.* **102A**:401-407.
- NENCINI P. y GRAZIANI M. (1990). Opiatergic modulation of preparatory and consummatory components of feeding and drinking. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **37**:531-537.
- NG T.B., IDLER R. y EALES J.G. (1982). Pituitary hormones that stimulate the thyroidal system in teleost fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **48**:3723-389.
- NICHOLSON L.F.B., MONTGOMERY J.C. y FAULL R.L.M. (1994). GABA, muscarinic cholinergic, excitatory amino acid, neurotensin and opiate binding sites in the octavolateralis column and cerebellum of the skate *Raja nasuta* (Pisces: Rajidae). *Brain Res.* **652**:40-48.
- NIIMI A. y BEAMISH F.W.H. (1974). Bioenergetics and growth large-mouth bass, *Micropterus salmoides*, in relation to body weight and temperature. *Can. J. Zool.* **52**:447-456.
- NILSSON G.E. (1989). Regional distribution of monoamines and monoamine metabolites in the brain of the crucian carp (*Carassius carassius* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **94C**:223-228.

- NILSSON N.A. y NORTHCOTE T.C. (1981). Rainbow trout, *Salmo gairdneri* and cutthroat trout, *Salmo clarki*, interactions in coastal british columbia lakes. *J. Fish. Res. Board Can.* **88**:1228-1246.
- NORRIS D.O. (1985). Vertebrate endocrinology. (2^a Ed.) Lea & Febiger, Philadelphia.
- NOZAKI M. y GORBMAN A. (1984). Distribution of immunoreactivity sites for several components of pro-opiocortin in the pituitary and brain of adult lampreys, *Petromyzon marinus* and *Entosphenus tridentatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **53**:335-352.
- OKAWARA Y., MORLEY S.D., BURZIO L.O., ZWIERS H., LEDERIS K. y RICHTER D. (1988). Cloning and sequence analysis of cDNAs for corticotropin releasing factor precursor from de teleost fish *Catostomus commersoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**:8439-8443.
- OLIVEREAU M. y OLIVEREAU J.M. (1988). Localization of CRF-like immunoreactivity in the brain and pituitary of teleost fish. *Peptides* **9**:13-21.
- OLIVEREAU M. y OLIVEREAU J.M. (1991a). Immunocytochemical localization of a galanin-like peptidergic system in the brain and pituitary of some teleost fish. *Histochemistry* **96**:343-354.
- OLIVEREAU M. y OLIVEREAU J.M. (1991b). Corticotropin-like immunoreactivity in the brain of intact, hypophysectomized, cortisol- and metopirone-treated eels. *Cell Tissue Res.* **265**: 485-492.
- OLIVEREAU M., OLLEVIER F., VANDESANDE F. y VERDONCK W. (1984). Immunocytochemical identification of CRF-like and SRIF-like peptides in the brain and the pituitary of cyprinid fish. *Cell. Tissue Res.* **237**:379-382.
- OLIVEREAU M., VANDESANDE F., BOUCIQUE E., OLLEVIER F. y OLIVEREAU J.M. (1987). Immunocytochemical localization and spatial relation to the adenohypophysis of a somatostatin-like and a corticotropin-releasing factor-like peptide in the brain of four amphibian species. *Cell. Tissue Res.* **247**:317-324.
- OLLA B.L. y SAMET C. (1974). Fish-to-fish attraction and the facilitation of feeding behaviour as mediated by visual stimuli in the striped mullet, *Mugil cephalus*. *J. Fish. Res. Board Can.* **31**:1621-1630.
- OLSON R.D., KASTIN A.J., MITCHEL G.F., OLSON G.A., COY D.H. y MONTALBANO D. (1978). Effects of endorphin and enkephalin analogs on fear habituation in golsfih. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **9**:111-114.
- OLSON G.A., OLSON R.D. y KASTIN A.J. (1991). Endogenous opiates: 1990. *Peptides* **12**:1407-1432.
- OLSON G.A., OLSON R.D. y KASTIN A.J. (1992). Endogenous opiates: 1991. *Peptides* **13**:1247-1287.

- OLSON G.A., OLSON R.D. y KASTIN A.J. (1993). Endogenous opiates: 1992. *Peptides* **14**:1339-1378.
- OOHARA M., NEGISHI M., SHIMIZU H., SATO N. y MORI M. (1993). α -Melanocyte stimulating hormone (MSH) antagonizes the anorexia by corticotropin releasing factor (CRF). *Life Sci.* **53**:1473-1477.
- OPP M., OBAL F.Jr. y KRUEGER J.M. (1989). Corticotropin-releasing factor attenuates interleukin 1-induced sleep and fever in rabbits. *Am. J. Physiol.* **257**:R528-R535.
- OPPENHEIMER J.H., SCHWARTZ H.L., MARIASH C.N., KINLAW W.B., WONG N.C.W. y FREAKER H.C. (1987). Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr. Rev.* **8**:288-308.
- OROSCO M. y NICOLAIDIS S. (1994). Insulin and glucose-induced changes in feeding and medial hypothalamic monoamines revealed by microdialysis in rats. *Brain Res. Bull.* **33**:289-297.
- OWENS M.J. y NEMEROFF C.B. (1991). Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol. Rev.* **43**:425-470.
- PAEZ X. y LEIBOWITZ S.F. (1993). Changes in extracellular PVN monoamines and macronutrient intake after idazoxan or fluoxetine injection. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **46**:933-941.
- PAEZ X. y STANLEY B.G. y LEIBOWITZ S.F. (1993). Microdialysis analysis of norepinephrine levels in the paraventricular nucleus in association with food intake at dark onset. *Brain Res.* **606**:167-170.
- PAGE M.E., BERRIDGE C.W., FOOTE S.L. y VALENTINO R.J. (1993). Corticotropin-releasing factor in the locus coeruleus mediates EEG activation associated with hypotensive stress. *Neurosci. Lett.* **164**:81-84.
- PAGE N., OROSCO M., ROUCH C., YAO O., JACQUOT C. y BOHUON C. (1993). Fasting affects more markedly neuropeptide Y than monoamines in the rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **55**:71-75.
- PANIAGUA R. y NISTAL M. (1983). Introducción a la histología animal comparada. Atlas-libro de la estructura microscópica de los animales. Labor Universitaria Manuales, Barcelona. pp. 271-273.
- PAPADOUKA V. y CARR K.D. (1994). The role of multiple opioid receptors in the maintenance of stimulation-induced feeding. *Brain Res.* **639**:42-48.
- PAPKA R.E., NEWTON B.W. y McNEILL D.L. (1991). Origin of galanin-immunoreactive nerve fibers in the rat paracervical autonomic ganglia and uterine cervix. *J. Auton. Nerv. Sys.* **33**:25-34.

- PARENT A. (1983). The monoamine-containing neuronal systems in the teleostean brain. En: "Fish neurobiology. Higher brain areas and functions" Vol. 2 (Eds: Davis R.E y Northcutt R.G.) The University of Michigan Press, Michigan. pp. 285-315.
- PARFITT A., WELLER J.L. y KLEIN D.C. (1975). Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-induced stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Mol. Pharmacol.* **11**:241-255.
- PARROT R.F. (1990). Central administration of corticotropin releasing factor in the pig: effects on operant feeding, drinking and plasma cortisol. *Physiol. Behav.* **47**:519-524.
- PASTERNAK G.W. (1993). Progress in opiate pharmacology. En: "Current and emerging issues in cancer pain: research and practice" (Eds: Chapman C.R. y Foley K.M.) Raven Press, New York. pp. 113-127.
- PEETERS R., BUYS N., VANMONTFORT D., VAN ISTERDAEL J., DECUYPERE E. y KÜHN E.R. (1992). Preferential release of tri-iodothyronine following stimulation by thyrotropin or thyrotropin-releasing hormone in sheep of different ages. *J. Endocrinol.* **132**:93-100.
- PERT C.B., APOSHIAN D. y SYNDER S.H. (1974). Phylogenetic distribution of opiate receptor binding. *Brain Res.* **75**:356-361.
- PETER R.E. (1979). The brain and feeding behavior. En: "Fish physiology" Vol. III (Eds: Hoar W.S., Randall D.J. y Brett J.R.) Academic Press, New York. pp. 121-159.
- PETER R.E. y FRYER J.N. (1983). Endocrine functions of hypothalamus of actinopterygians. En: "Fish neurobiology. Higher brain areas and functions" Vol. 2 (Eds: Davis R.E y Northcutt R.G.) The University of Michigan Press, Michigan. pp. 165-201.
- PFEFFER E. (1982). Utilization of dietary protein by salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **73B**:51-57.
- PICKERING A.D. y POTTINGER T.G. (1983). Seasonal and diel changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **49**:232-239.
- PIEKUT D.T. y KNIGGE K.M. (1989). Immunocytochemistry of putative CRF receptors in rat forebrain using a CRF anti-idiotypic antibody. *Neurosci. Res. Commun.* **4**:167-173.
- PLISETSKAYA E., DICKOFF W.W. y GORBMAN A. (1983). Plasma thyroid hormones in cyclostomes: Do they have a role in regulation of glycemic levels? *Gen. Comp. Endocrinol.* **49**:97-107.
- PRIETO J.C. (1990). Localización y papel de los neuropéptidos en los islotes de Langerhans. En: "Los islotes de Langerhans: un órgano multiendocrino" (Eds: Blázquez E. y Tamarit J.) Centro de estudios Ramón Areces, Madrid. pp. 153-166.

- RACOTTA R. y SOTO-MORA L.M. (1993). Specificity of alpha- and beta-adrenergic inhibition of water and food intake. *Physiol. Behav.* **53**:361-365.
- RACOTTA I.S., LEBLANC J. y RICHARD D. (1994). The effect of caffeine on food intake in rats: involvement of corticotropin-releasing factor and the sympatho-adrenal system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **48**:887-892.
- RAYMON H.K. y LESLIE F.M. (1994). Opioid effects on [³H]norepinephrine release from dissociated embryonic locus coeruleus cell cultures. *J. Neurochem.* **62**:1015-1024.
- REDDING J.M., DE LUZE A., LELOUP-HATEY J. y LELOUP J. (1986). Suppression of plasma thyroid hormone concentrations by cortisol in the european eel *Anguilla anguilla*. *Comp. Biochem. Physiol.* **83A**:409-413.
- ROBERT J.J., OROSCO M., ROUCH C., JACQUOT C. y COHEN Y. (1989). Effects of opiate agonists and an antagonist on food intake and brain neurotransmitters in normophagic and obese "cafeteria" rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **34**:577-583.
- ROLLAND M., AQUARON R. y LISSITZKY S. (1970). Thyroglobulin iodoamino acids estimation after digestion with pronase and leucylaminopeptidase. *Anal. Biochem.* **33**:307-317.
- ROLLS E.T. y MORA F. (1992). Hambre, sed y saciedad. En: "Fisiología humana" (Ed., Treguerres J.A.F.) Interamericana McGraw-Hill, New York. pp. 1155-1165.
- RONDEEL J.M.M. y JACKSON I.M.D. (1993). Molecular biology of the regulation of hypothalamic hormones. *J. Endocrinol. Invest.* **16**: 219-246.
- RONKEN E., VAN MUISWINKEL F.L., MULDER A.H. y SCHOFFELMEER A.N.M. (1993). Opioid receptor-mediated inhibition of evoked catecholamine release from cultured neurons of rat ventral mesencephalon and locus coeruleus. *Eur. J. Pharmacol.* **230**:349-355.
- ROSENBLUM P.M. y PETER R.E. (1989). Evidence for the involvement of endogenous opioids in the regulation of gonadotropin secretion in male goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **73**:21-17.
- ROSENTHAL M.J. y MORLEY J.E. (1989). Corticotropin releasing factor (CRF) and age-related differences in behavior in mice. *Neurobiol. Aging* **10**:167-171.
- ROUSSET B.A.F. (1991). Trafic intracellulaire et clivage protéolytique de la thyroglobuline, la prohormone thyroïdienne. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **52**:335-360.
- ROZIN P. y MAYER R.J. (1961). Regulation of food intake in the goldfish. *Am. J. Physiol.* **201**:968-974.
- RUIZ DE OÑA C., MORREALE DE ESCOBAR G., CALVO R.M., ESCOBAR DEL REY F. y OBREGÓN M.J. (1991). Thyroid hormone and 5'-deiodinase in the rat fetus late in gestation. Effects of maternal hypothyroidism. *Endocrinology* **128**:422-432.

- SALIGAUT C., SALBERT G., BAILHACHE T., BENNANI S. y JEGO P. (1992). Serotonin and dopamine turnover in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain and pituitary: changes during the annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**:261-268.
- SAMUELS M.H., KRAMER P., WILSON D. y SEXTON G. (1994). Effects of naloxone infusions on pulsatile thyrotropin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**:1249-1252.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F., MARTÍNEZ M., ZAMORA S. y MADRID J.A. (1994). Design and performance of an accurate demand feeder for the study of feeding behaviour in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Physiol. Behav.* **56**:789-794.
- SAVAGE G.E. (1969). Some preliminary observations on the role of the telencephalon in food-reinforced behaviour in the goldfish, *Carassius auratus*. *Anim. Behav.* **17**:760-772.
- SAVAGE G.E. y ROBERTS M.G. (1975). Behavioural effects of electrical stimulation of the hypothalamus of the goldfish *Carassius auratus*. *Brain Behav. Evol.* **12**:42-56.
- SCHICK R.R., SAMSAMI S., ZIMMERMANN J.P., EBERL T., ENDRES C., SCHUSDZIARRA V. y CLASSEN M. (1993). Effect of galanin on food intake in rats. Involvement of lateral and ventromedial hypothalamic sites. *Am. J. Physiol.* **264**:R355-R361.
- SCHULTZ D.C. Y NORTHCOTE T.G. (1972). An experimental study of feeding behaviour and interaction of coastal cutthroat trout, *Salmo clarki* and dolly varden *Salvelinus malma*. *J. Fish. Res. Board Can.* **29**:555-565.
- SENTHILKUMARAN B. y JOY K.P. (1993). Annual variations in hypothalamic serotonin and monoamine oxidase in the catfish *Heteropneustes fossilis* with a note on brain regional differences of day-night variations in gonadal preparatory phase. *Gen. Comp. Endocrinol.* **90**:372-382.
- SHAW W.N. (1993). Long-term treatment of obese Zucker rats with LY255582 and other appetite suppressants. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **46**:653-659.
- SHERIDAN M.A. y MOMMSEN T.P. (1991). Effects of nutritional state on *in vivo* lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **81**:473-483.
- SHERWOOD N.M. y PARKER D.B. (1990). Neuropeptide families: an evolutionary perspective. *J. Exp. Zool.* **4**:63-71.
- SHIELDS C.A. y EALES J.G. (1986). Thyroxine 5'-deiodinase activity in hepatocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Distribution, effects of starvation, and exogenous inhibitors. *Gen. Comp. Endocrinol.* **63**:334-343.

- SIMON E.J. (1991). Opioid receptors and endogenous opioid peptides. *Med. Res. Rev.* **11**:357-374.
- SIMON E.J. y HILLER J.M. (1994). Opioid peptides and opioid receptors. En: "Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects, 5th Ed." (Ed., Siegel G.J. y cols) Raven Press, New York. pp. 321-339.
- SLOLEY B.D., HICKIE D.E., DIXON D.G., DOWNER R.G.H. y MARTIN R.J. (1986). The effects of sodium pentachlorophenate, diet, and sampling procedure on amine and tryptophan concentrations in the brain of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* **28**:267-277.
- SLOLEY B.D., TRUDEAU V.L., DULKA J.G. y PETER R.E. (1991). Selective depletion of dopamine in the goldfish pituitary caused by domperidone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **69**:776-781.
- SLOLEY D.B., TRUDEAU V.L. y PETER R.E. (1992). Dopamine catabolism in goldfish (*Carassius auratus*) brain and pituitary: lack of influence of catecholestrogens on dopamine catabolism and gonadotropin secretion. *J. Exp. Zool.* **263**:398-405.
- SMITH J.A.M., LOUGHLIN S.E. y LESLIE F.M. (1992). κ -opioid inhibition of [³H]dopamine release from rat ventral mesencephalic dissociated cell cultures. *Mol. Pharmacol.* **42**:575-583.
- SMITH B.K., YORK D.A. y BRAY G.A. (1994). Chronic cerebroventricular galanin does not induce sustained hyperphagia or obesity. *Peptides* **15**:1267-1272.
- SOKAL R.R. y ROHLF F.J. (1979). Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. Ediciones Blume, Madrid.
- SOMA G.I., KITAHARA N., NISHIZAWA T., NANAMI H., KOTAKE C., OKAZAKI H. y ANDO T. (1984). Nucleotide sequence of a cloned cDNA for proopiomelanocortin precursor of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Nucleic Acids Res.* **12**:8029-8041.
- SOWER S.A. y FAWCETT R.S. (1991). Changes in gill Na⁺, K⁺-ATPase, thyroxine and triiodothyronine of coho salmon held in two different rearing densities during smoltification. *Comp. Biochem. Physiol.* **99A**:85-89.
- SPIELER R.E. (1992). Feeding-entrained circadian rhythms. En: "Rhythms in fishes". NATO ASI Series. Vol. A236 (Ed., Ali M.A.) Plenum Press, New York. pp. 137-147.
- SPIELER R.E. y NOESKE T.A. (1984). Effects of photoperiod and feeding schedule on diel variations of locomotor activity, cortisol, and thyroxine in goldfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* **113**:528-539.
- SPIESS J., RIVIER J., RIVIER C. y VALE W. (1981). Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 6517-6521.

- STRYJEK-KAMINSKA D., LOOS U., MAIER V., DITSCHUNEIT H.H. y PFEIFFER E.F. (1988). Seasonal variations of glucose and triiodothyronine concentrations in serum of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Horm. Metabol. Res.* **20**:727-729.
- SUNDBY A., HEMRE G-I., BORREBAEK B., CHRISTOPHERSEN B. y BLOM A.K. (1991). Insulin and glucagon family peptides in relation to activities of hepatic hexokinase and other enzymes in fed and starved atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* **100B**:467-470.
- SUZUKI S. (1992). Thyroid gland. En: "Atlas of endocrine organs. Vertebrates and invertebrates" (Eds: Matsumoto A. e Ishii S.) Springer-Verlag, Berlín. pp. 63-71.
- SWANSON L.W., SAWCHENKO P.E., RIVIER J. y VALE W. (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* **36**:165-186.
- SWEETING R.M. y EALES J.G. (1992a). HPLC analysis of *in vitro* hepatic deiodination products of thyroid hormones in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**:367-375.
- SWEETING R.M. y EALES J.G. (1992b). The acute influence of ingested thyroid hormones on hepatic deiodination pathways in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**:376-384.
- SWEETING R.M. y EALES J.G. (1992c). Thyroxine 5'-monodeiodinase activity in microsomes from isolated hepatocytes of rainbow trout: Effects of growth hormone and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Gen. Comp. Endocrinol.* **88**:169-177.
- SWEETING R.M. y EALES J.G. (1992d). The effects of fasting and feeding on hepatic thyroxine 5' monodeiodinase activity in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Can. J. Zool.* **70**:1516-1525.
- TANAKA Y., EGAWA M., INOUE S. y TAKAMURA Y. (1991). Effect of hypothalamic administration of growth hormone-releasing factor (GRF) on feeding behavior in rats. *Brain Res.* **558**:273-279.
- TANDLER A. y BEAMISH F.W.H. (1981). Apparent specific dynamic action (SDA), fish weight and level of caloric intake in largemouth bass, *Micropterus salmoides* (Lacepede). *Aquaculture* **23**:231-242.
- TATEMOTO K., RÖKAEUS A., JÖRUVALL H., MACDONALD J. y MUTT V. (1983). Galanin- a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett.* **164**:124-128.
- TEMPEL D.L. y LEIBOWITZ S.F. (1990a). Diurnal Variations in the feeding responses to norepinephrine, neuropeptide Y and galanin in the PVN. *Brain Res. Bull.* **25**:821-825.

- TEMPEL D.L. y LEIBOWITZ S.F. (1990b). Galanin inhibits insulin and corticosterone release after injection into the PVN. *Brain Res.* **536**:353-357.
- TEMPEL D.L. y LEIBOWITZ S.F. (1993). Glucocorticoid receptors in PVN: interactions with NE, NPY, and Gal in relation to feeding. *Am. J. Physiol.* **256**:E794-E800.
- TEMPEL D.L., LEIBOWITZ K.J. y LEIBOWITZ S.F. (1988). Effects of PVN galanin on macronutrient selection. *Peptides* **9**:309-314.
- TERRY P. y KATZ J.L. (1994). A comparison of the effects of the D₁ receptor antagonists SCH 23390 and SCH 39166 on suppression of feeding behavior by the D₁ SKF 38393. *Psychopharmacology* **113**:328-333.
- THIBAUT L. (1992). Influence of feeding paradigm in rats on temporal pattern of: II. Brain serotonergic and catecholaminergic systems. *Chronobiol. Int.* **9**:19-34.
- THOMAS J.A. y KEENAN E.J. (1986). Adrenocorticosteroid drugs. En: "Principles of endocrine pharmacology" Plenum Medical Book Company, New York. pp. 197-225.
- THORPE J.E., McCONWAY M.G., MILES M.S. y MUIR J.S. (1987). Diel and seasonal changes in resting plasma cortisol levels in juvenile atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **65**:19-22.
- TRAN T.N., FRYER J.N., LEDERIS K. y VAUDRY H. (1990). CRF, urotensin I, and sauvagine stimulate the release of POMC-derived peptides from goldfish neurointermediate lobe cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* **78**:351-360.
- TRANULIS M.A., CHRISTOPHERSEN B., BLOM A.K. y BORREBAEK B. (1991). Glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Effects of starvation and temperature variations. *Comp. Biochem. Physiol.* **90B**:687-691.
- UHL G.R., CHILDERS S. y PASTERNAK G. (1994). An opiate-receptor gene family reunion. *TINS* **17**:89-93.
- UR E. y GROSSMAN A. (1994). The neuroregulation of corticotropin secretion. En: "The pituitary gland" 2^a Ed. (Ed., Imura H.) Raven Press, New York. pp. 309-330.
- VAHL O. (1979). An hypothesis on the control of food intake in fish. *Aquaculture* **17**:221-229.
- VALE W., SPIESS J., RIVIER C. y RIVIER J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science* **213**:1394-1397.
- VALENTINCIC T.B. y CAPRIO J. (1994a). Chemical and visual control of feeding and escape behaviors in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Physiol. Behav.* **55**:845-855.

- VALENTINCIC T.B. y CAPRIO J. (1994b). Consummatory feeding behavior to amino acids in intact and anosmic channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Physiol. Behav.* **55**:857-863.
- VALENTINCIC T.B., WEGERT S. y CAPRIO J. (1994). Learned olfactory discrimination versus innate taste responses to amino acids in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Physiol. Behav.* **55**:865-873.
- VALENTINO R.J., PAGE M.E. y CURTIS A.L. (1991). Activation of noradrenergic locus coeruleus neurons by hemodynamic stress is due to local release of corticotropin-releasing factor. *Brain Res.* **555**:25-34.
- VALENTINO R.J., FOOTE S.L. y PAGE M.E. (1993). The locus coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Ann. New York Sci.* **697**:173-188.
- VALLARINO M. (1985). Occurrence of β -endorphin-like immunoreactivity in the brain of the teleost, *Boops boops*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **60**:63-69.
- VALLARINO M., FEUILLOLEY M., VANDESANDE F. y VAUDRY H. (1991). Immunohistochemical mapping of galanin-like immunoreactivity in the brain of the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Peptides* **12**:351-357.
- VAN DER KRAAK G.J. y EALES J.G. (1980). Saturable 3,5,3'-triiodo-L-thyronine-binding receptors in liver nuclei of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Gen. Comp. Endocrinol.* **42**:437-448.
- VIJAYAN M.M. y LEATHERLAND J.F. (1989). Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein, and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Can. J. Zool.* **67**:2746-2750.
- VIJAYAN M.M., FLETT P.A. y LEATHERLAND J.F. (1988). Effect of cortisol on the *in vitro* hepatic conversion of thyroxine to triiodothyronine in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **70**:312-318.
- VISSER T.J. (1988). Metabolism of thyroid hormone. En: "Hormones and their actions. Part I" (Eds: Cooke B.A., King R.J.B. y van der Molen H.J.) Elsevier Science Publishers BV. pp. 81-103.
- VOLPATO G.L. y FERNANDES M.O. (1994). Social control of growth in fish. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **27**:797-810.
- VRONTAKIS M.E., TORSSELLO A. y FRIESEN H.G. (1991). Galanin. *J. Endocrinol. Invest.* **14**:785-794.
- WALTON M.J. y COWLEY C.B. (1982). Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **73B**:59-79.
- WATANABE T. (1982). Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **73B**:3-15.

- WELLMAN P.J., DAVIES B.T., MORIEN A. y McMAHON L. (1993). Modulation of feeding by hypothalamic paraventricular nucleus α_1 - and α_2 -adrenergic receptors. *Life Sci.* **53**:669-679.
- WESTERINK B.H.C., TEISMAN A. y DE VRIES J.B. (1994). Increase in dopamine release from the nucleus accumbens in response to feeding: a model to study interactions between drugs and naturally activated dopaminergic neurons in the rat brain. *Arch. Pharmacol.* **349**:230-235.
- WHITNALL M.H. (1993). Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog. Neurobiol.* **40**:573-629.
- WILBER J.F. (1989). Regulation of appetite by peptides and monoamines. En: "Endocrinology" Vol. 3 (Ed., De Groot L.J.) Saunders, Philadelphia. pp. 2769-2776.
- WINBERG S. y NILSSON G.E. (1993). Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **106C**:597-614.
- WONG M., DELANEY K. y GELPERIN A. (1991). Opiate agonists activate feeding in *Limax*: Comparison of in vivo and in vitro effects. *Behav. Neurosci.* **105**:15-24.
- YAMADA H., HORIUCHI R., GEN K. y YAMAUCHI K. (1993). Involvement of four hormones in thyroxine deiodination in several tissues of immature yearling masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Zool. Sci.* **10**:587-596.
- YAMAMOTO T., MALER L. y NAGY J.I. (1992). Organization of galanin-like immunoreactive neuronal systems in weakly electric fish (*Apteronotus leptorhynchus*). *J. Chem. Neuroanat.* **5**:19-38.
- YANAIHARA N., MOCHIZUKI T., TAKATSUKA N., IGUCHI K., SATO K., KAKUYAMA H., LI M. y YANAIHARA C. (1993). Galanin analogues: agonist and antagonist. *Reg. Peptides* **46**:93-101.
- YEOMANS M.R. (1993). Prior exposure to low or high fat milk enhances naloxone anorexia in rats. *Appetite* **20**:125-134.
- YORK D.A. (1992). Central regulation of appetite and autonomic activity by CRH, glucocorticoids and stress. *Prog. NeuroEndocrinImmunol.* **5**:153-165.
- YULIS C.R., LEDERIS K., WONG K. y FISHER A.W.F. (1986). Localization of urotensin I and corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in the central nervous system of *Catostomus commersoni*. *Peptides* **7**:79-86.
- ZANUY S. y CARRILLO M. (1985). Annual cycles of growth, feeding rate, gross conversion efficiency and hematocrit levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) adapted to two different osmotic media. *Aquaculture* **44**:11-25.

ZENTEL H.J., NOHR D., MÜLLER S., YANAIHARA N. y WEIHE E. (1990). Differential occurrence and distribution of galanin in adrenal nerve fibers and medullary cells in rodent and avian species *Neurosci. Lett.* **120**:167-170.

ZWAAN M.D. y MITCHELL J.E. (1992). Opiate antagonists and eating behavior in humans: a review. *J. Clin. Pharmacol.* **32**:1060-1072.