



LA ALIMENTACIÓN IRREGULAR TIENE UN EFECTO ANSIOGÉNICO EN RATAS WISTAR

Álvaro Pavón-Rosado ¹, T. Molina-Jiménez ², A. Cortés-Sol¹, C. Juárez-Portilla^{1,3} Elvira Morgado¹

¹Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, alvaropavon18@gmail.com; alcortes@uv.mx; elmorvi@hotmail.com

²Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Veracruzana, tmolina@uv.mx

³ Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana, cljuarez@uv.mx

RESUMEN

El estilo de vida moderno rompe con la relación entre nuestro sistema interno de temporización y el día solar, ocasionando una disrupción en los ritmos circadianos naturales. Este desfase entre las señales temporales internas con las externas produce alteraciones metabólicas, neurales y hormonales en el organismo. El objetivo de este trabajo fue demostrar el efecto ansiogénico que ejerce la ingestión de alimento en horas no habituales. Se utilizaron ratas Wistar hembras (n=18) y machos (n=18), bajo condiciones de bioterio, con ciclo de luz/oscuridad 12/12 h (encendido a las 04:00 h) y agua *ad libitum*. Tanto en machos como en hembras, se explotaron tres condiciones de alimentación durante 26 días: 1) Alimentación fija (AF), donde los sujetos recibieron alimento de 08:00-11:00 h (hora de alimentación no habitual en roedores nocturnos); 2) Alimentación regular (Alr), donde los sujetos fueron alimentados en diferentes horarios diariamente, en intervalos de tres horas (a las 10:00, 06:00, 18:00, 14:00, 22:00, 02:00 reiniciando el ciclo); y 3) *Ad libitum* (AL), sujetos con disponibilidad de alimento las 24 horas. En el día 26 de experimentación, los sujetos fueron evaluados en laberinto elevado en cruz (5 min) y campo abierto (5 min). Los resultados indicaron que en hembras, los grupos AF y Alr presentaron mayores indicadores de ansiedad con respecto al grupo AL, sin modificar su locomoción. Sin embargo, ninguna condición de alimentación produjo diferencias en la prueba de laberinto de brazos elevados en machos. En conclusión, se sugiere que la alimentación a horas no habituales, así como la irregularidad en los periodos diarios de ingestión de alimento, ejercen un estado leve ansiogénico que afecta principalmente a las hembras.

1. INTRODUCCIÓN

Se sabe que el ciclo de luz-oscuridad es el sincronizador de conductas y procesos fisiológicos más importante en los organismos, por lo que la distorsión en la sincronización circadiana que permite el ciclo luz-oscuridad ambiental promueve el desarrollo de trastornos del sueño, ansiedad, depresión y síndrome de Bournout (Mittler *et al.*, 2000). Sin embargo, hoy sabemos que las señales temporales que sincronizan la ritmicidad biológica son muy variadas, permitiendo un sistema multioscilario (Mrosovsky, 1996), cuyo sincronizador adquiere preponderancia según las necesidades del organismo. En este sentido, el alimento es también un importante sincronizador de los ritmos de equilibrio metabólico y de la regulación de procesos humorales (Salgado-Delgado *et al.*, 2008). De modo que, cuando la fuente de alimento es limitada a ciertas horas del día, ya sea en condiciones naturales o en protocolos experimentales, la conducta de los organismos implicados se organiza en función de la disponibilidad de alimento, es decir, que el alimento funciona como un sincronizador externo que regula procesos bioquímicos, fisiológicos e incluso conductuales (Stephan, 2002; Lowrey y Takahashi, 2004).

Al respecto, en nuestra sociedad actual, los horarios de alimentación temporalmente regular (aquellos que siguen horarios ordenados y previsibles) han sido remplazados por horarios inusuales e impredecibles a causa de diversos factores como los trabajos en turnos nocturnos, los cambios de zona horaria así como las actividades de ocio y placer. En condiciones de laboratorio, la alimentación normal (nocturna) en ratas puede ser suplantada por horarios cambiantes que pueden ser diurnos o nocturnos pero variando el horario diario de los mismos, de tal manera que esta desincronización induce fenotipos conductuales y metabólicos (Scheer *et al.*, 2009; Salgado-Delgado *et al.*, 2010; Wyse *et al.*, 2011). Sin embargo, no se ha explorado ampliamente el efecto de la alimentación irregular sobre los estados emocionales de los sujetos como la ansiedad. Por tanto, es de nuestro interés explorar los efectos de horarios irregulares de ingestión de alimento sobre la ansiedad experimental en ratas de la cepa wistar.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Sujetos de estudio

Se utilizaron 36 ratas de la cepa Wistar (18 machos y 18 hembras) con un peso de 200 a 300 g. Los sujetos fueron alojados (n=6) en cajas de acrílico transparentes (44x33x20 cm), mantenidos en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h (con el encendido a las 04:00 h) y con agua y alimento *ad libitum*. El estudio fue realizado en las instalaciones de la Facultad de Biología, de la Universidad Veracruzana, campus Xalapa. La manipulación de los sujetos estuvo mediada por los acuerdos establecidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-199) y bajo vigilancia del comité de Ética y Transparencia de la Facultad de Biología-Xalapa UV.

Grupos experimentales

Después de dos semanas de habituación a las condiciones de bioterio, los sujetos fueron distribuidos de manera aleatoria a tres grupos experimentales (n=6 por género): grupo AL (*Ad libitum*), los sujetos disponían de agua y alimento las 24 h durante los 26 días de experimentación; grupo AF (Alimentación fija), los sujetos tenían agua disponible las 24 h, pero el alimento (300 g) se dio únicamente en horario de 08:00 a 11:00 h diariamente, durante 26 días; grupo Alr (Alimentación Irregular), los sujetos disponían de agua las 24 h y recibían 300 g de alimento en diferentes horarios diariamente (10:00, 06:00, 18:00, 14:00, 22:00, 02:00 h, reiniciando el ciclo) en intervalos de tres horas. Terminado el periodo de alimentación, el remanente fue retirado.

Pruebas conductuales

Los experimentos fueron realizados el día 26 del protocolo durante la fase de luz, comenzando a las 9:00 h. Las sesiones fueron grabadas con una cámara de videograbación (SONY). El registro conductual fue realizado por dos observadores, con la finalidad de validar los resultados obtenidos mediante un programa ex profeso. 1) **Prueba de laberinto de brazos elevados**: la prueba consistió en dos brazos de madera abiertos (color blanco) y dos cerrados (color negro) opuestos haciendo cruce. Las dimensiones de ambos brazos son de 50 cm de largo y 10 cm de ancho. Los brazos oscuros tienen paredes de 50 cm que los protegerán. El laberinto tiene una altura de 50 cm sobre el suelo. La rata fue colocada en la plataforma central con la vista hacia los brazos abiertos; la prueba tuvo una duración de 5 min. 2) **Prueba de campo abierto**: Después de pasar a la prueba de laberinto elevado en cruz, los animales fueron sometidos a la prueba de campo abierto. La prueba consistió en colocar a cada sujeto en una caja de acrílico opaca (44x33x20 cm), cuya base estuvo dividida en cuadros de 11 x 11 cm. Se evaluó el número de cuadros cruzados por el animal durante 5 min, tomando como criterio que la rata pasara al menos tres cuartas partes de su cuerpo de un cuadro a otro. Al término de cada sesión individual, los aparatos fueron desodorizados con una solución limpiadora de etanol al 5%.

Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba *pos hoc* Student-Newman-Keuls utilizando el programa de SIGMASTAT 3.5. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar.

3. Resultados

Prueba de campo abierto

Los datos obtenidos indican que hubo diferencias en la locomoción en los machos [$F_{(2,15)} = 6.06$, $P < 0.01$], pues los grupos AF y Alr incrementan el número de cuadro cruzados ($P < 0.05$;

Figura 1^a). Sin embargo, en las hembras no existieron diferencias entre los grupos [$F_{(2,15)} = 2.93$, $P < 0.08$, NS], aunque se puede observar una tendencia no significativa a incrementar los cuadros cruzados en el grupo AF (Figura 1B).

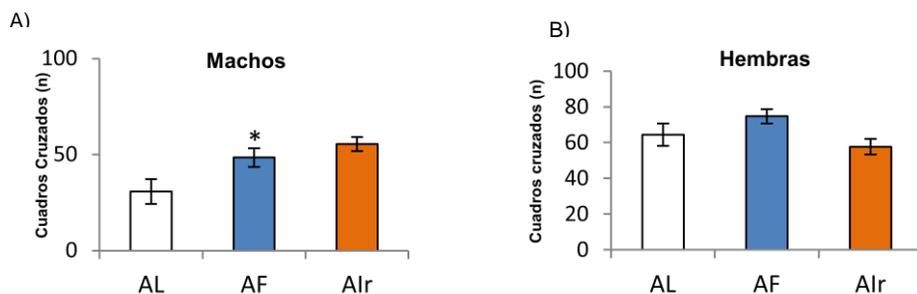


Figura 1. Prueba de campo abierto. En machos, se observó un incremento en la actividad locomotriz en los grupo AF y Alr respecto al AL, mientras que en hembras no se observan diferencias entre los grupos. * $P < 0.05$ vs AF y Alr, ANOVA de una vía, prueba post hoc Student-Newman-Keuls

Prueba de laberinto elevado en cruz

El análisis estadístico no indicó diferencias en los grupos de machos en ninguna de las variables evaluadas en la prueba de laberinto elevado en cruz: número de entradas al brazo abierto [$F_{(2,15)}=1.46$, $P < 0.26$, NS], porcentaje de entradas al brazo abierto [$F_{(2,15)}=1.62$, $P < 0.23$, NS], tiempo total en el brazo abierto [$F_{(2,15)}=1.17$, $P < 0.33$, NS] e índice de ansiedad [$F_{(2,15)}=1.59$, $P < 0.23$, NS]. Sin embargo, en las hembras se observaron diferencias en la variables de número de entradas al brazo abierto [$F_{(2,15)}=5.51$, $P < 0.01$] y el porcentaje de entradas a los brazos abiertos [$F_{(2,15)}=4.38$, $P < 0.16$, NS] pero no en el tiempo total en brazo abierto [$F_{(2,15)}=2.04$, $P < 0.16$] e índice de ansiedad [$F_{(2,15)}=1.52$, $P < 0.25$, NS]. Los grupos de AF y Alr tuvieron un menor número y porcentaje de entradas a brazo abierto ($P < 0.05$; Figura 2).

Discusión:

En el presente estudio se evaluó el efecto ansiogénico que se genera por la ingestión de alimento en horarios irregulares. Los resultados pueden resumirse de la siguiente manera: 1) En campo abierto, los grupos AF y Alr de machos tuvieron un aumento en la actividad locomotriz, efecto que no fue observado en hembras; y 2) las ratas hembra de los grupos AF y Alr tuvieron una reducción en el número de entradas y el porcentaje de entradas al brazo abierto mientras que en machos no hubo cambios en ninguna de las variables evaluadas en la prueba de laberinto de brazos elevados. Estos datos sugieren que los horarios irregulares de alimentación promueven un estado antigénico leve preferentemente en ratas hembra.

La ingestión de alimento es una actividad de vital importancia para los organismos y es regulada por una serie de mecanismos fisiológicos que interactúan para obtener el correcto balance energético y lograr un estado de homeostasis en el organismo (Escobar). Así, el alimento funciona como un sincronizador externo capaz de regular procesos bioquímicos, fisiológicos y conductuales (Escobar *et al.*, 1998; Damiola *et al.*, 2000; Stephan, 2002). En nuestro estudio se encontró que la variación de los horarios de alimentación decrementó las variables de número y porcentaje de entrada a los brazos abiertos en la prueba de laberinto, sólo en ratas hembra. Esto sugiere un estado leve de ansiedad dado que los animales prefieren los brazos cerrados y un incremento en el tiempo en los brazos abiertos es considerado un efecto ansiolítico (Walf y Frye, 2007). Es importante mencionar que las hembras de los grupos AF y Alr se encontraban en fase diestro1 donde los niveles de hormonas esteroides se encuentran en bajas concentraciones. Al respecto, existen estudios que sustentan que las ratas que se encuentran en las fase de proestro-estro (caracterizada por altos niveles plasmáticos de estradiol y progesterona) incrementan la tasa de disparo neuronal del núcleo septal lateral, una estructura implicada en aspectos motivacionales y de hedonismo (Contreras *et al.*, 2000) y tienen un efecto ansiolítico en laberinto de brazos elevados (Marcondes *et al.*, 2001). Por tanto, el efecto ansiogénico observado en estos grupos

pudo ser influenciado por el estado hormonal mostrado de forma indirecta por el estado de diestro continuo en que los animales se encontraban.

Este efecto ansiogénico inducido por la irregularidad en los horarios de ingestión de alimento no fue observado en machos.

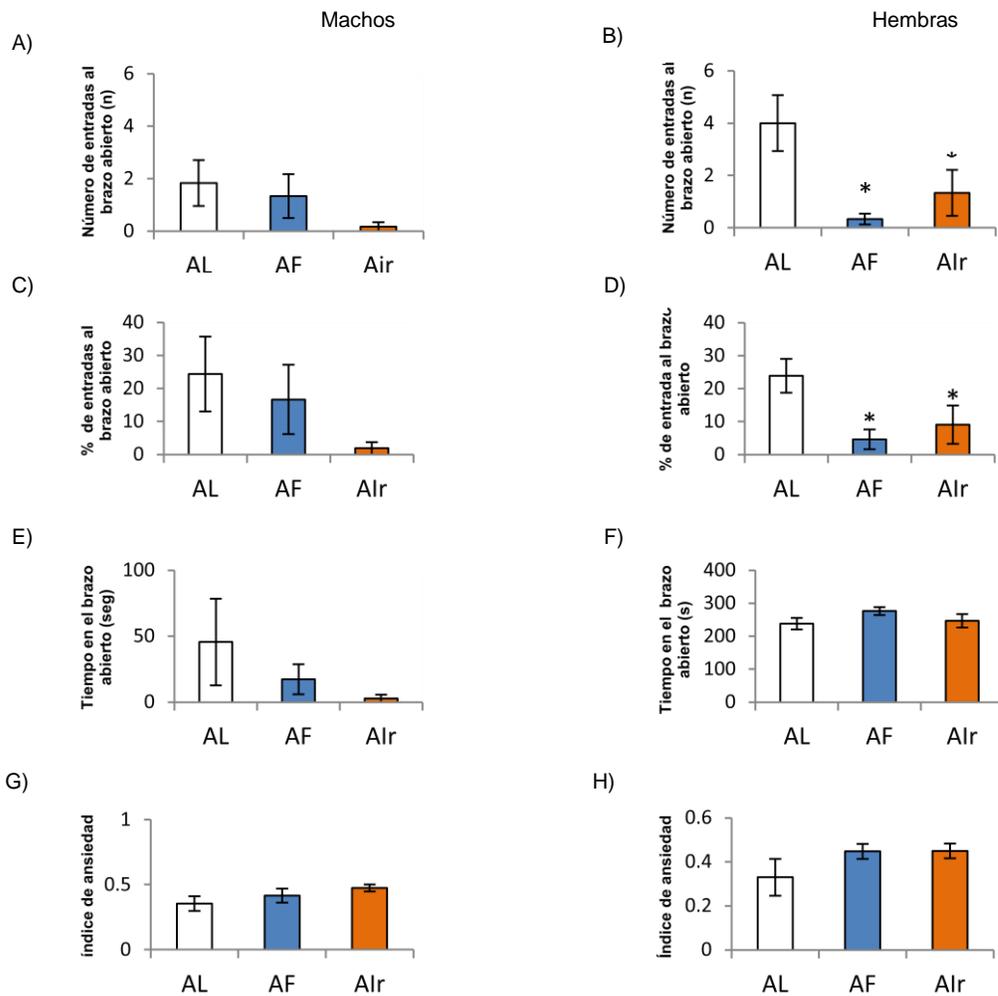


Figura 2. Prueba de laberinto elevado en cruz. En machos no se observan diferencias en ninguna de las variables evaluadas entre los grupos (A,C,E,G). En las hembras se observó una reducción en el número y el porcentaje de entradas al brazo abierto (B y F), pero no en el tiempo en el brazo abierto e índice de ansiedad (F y H). *P < 0.05 vs AF y Alr, ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Student-Newman-Keuls.

Por otra parte, la prueba de campo abierto, dependiendo de sus características, es utilizada para evaluar estados emocionales o sólo la actividad locomotora de la rata, asociada a algún tratamiento farmacológico o alguna otra manipulación experimental (Saavedra *et al.*, 2011). En nuestros resultados los grupos con alimentación en horarios irregulares (machos) tuvieron un aumento en la actividad locomotora. Sin embargo, estos efectos de hiperactividad no influyeron sobre las variables evaluadas en la prueba laberinto elevado en cruz. En el caso de las hembras no hubo diferencias, aunque se puede observar una tendencia a incrementar la actividad

locomotriz en el grupo AF. Esto puede deberse a un efecto sobre el estado emocional de las ratas macho, más que a un efecto motor (Lagunas *et al.*, 2010).

Conclusión:

Se sugiere que la alimentación a horas no habituales, así como la irregularidad en los periodos diarios de ingestión de alimento, ejercen un estado leve ansiogénico que afecta principalmente a las hembras.

Bibliografía

1. Contreras C.M., Molina M., Saavedra M., Martínez-Mota L., "Lateral septal neuronal firing rate increases during proestrus-estrus in the rat", *Physiol Behav*, Vol. 68, 2000, pp. 279-284.
2. Damiola F., Minh N. L., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F. y Schibler U., "Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus", *Genes and Devel*, Vol. 14, 2000, pp. 2950-2961.
3. Escobar C., Díaz Muñoz M., Encinas F. y Aguilar-Roblero R., "Persistence of metabolic rhythmicity during and its entrainment by restricted feeding schedules in rats", *Am J Physiol* Vol. 274, 1998, pp. 1309-1316
4. Lagunes N., Calmarza I.F., Diz Y.C., García L.M.S., "Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice submitted to chronic unpredictable stress", *Horm Behav*, Vol. 58, 2010, pp. 786-791.
5. Lowrey P.L. y Takahashi J.S., "Mammalian circadian biology: Elucidating genome-wide levels of temporal organization", *Annu Rev of Genomics Hum*, 2004, Vol. 5, pp 407-441.
6. Marcondes F.K., Miguel K.J., Melo L.L. y Spadari-Bratfisch R.C., "Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test", *Physiol Behav*, Vol. 74, 2001, pp. 435-440.
7. Mitler M.M., Dinges W.C., Dinges D.F., "Sleep medicine, public policy, and public healths", En: Meir H. Kryger, Thomas Roth, and William C. Dement. Philadelphia, W. B. Saunders, Principles and practice of sleep medicine 3rd edition, 2000, pp.580-588.
8. Mrosovsky N., "Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks", *Biol Rev*, Vol. 71, 1996, pp.343-372.
9. Saavedra M., Rivadeneyra-Domínguez E., Rodríguez-Landa J.F., "Alteraciones motoras inducidas por la microinyección intrahipocámpal de metilazoximetanol en ratas macho forzadas a nadir, *Arch Neurocienc*, Vol. 16, 2011, pp. 186-192.
10. Salgado-Delgado R.C., Ángeles-Castellanos M., Buijs M.R., Escobar C., "Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats", *Neuroscience*, Vol 154, 2008, pp. 922-931.
11. Salgado-Delgado R., Nadia S., Angeles-Castellanos M., Buijs R.M., Escobar C., "In a rat model of night work, activity during the normal resting phase produces desynchrony in the hypothalamus", *J Biol Rhythms*, Vol. 25, 2010, pp. 421-431.
12. Scheer F.A., Hilton M.F., Mantzoros C.S., Shea S.A., "Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment", *Proc Natl Acad Sci*, Vol. 106, 2009, pp. 4453-4458.
13. Stephan F.K., "The «other» circadian system: food as a zeitgeber", *J Biol Rhythms*, Vol. 17, 2002, pp. 284-292.
14. Walf A.A. y Frye C.A., "The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents". *Nat Protoc*, Vol. 2, 2007, pp. 322-328.
15. Wyse C.A., Selman C., Page M.M., Coogan A.N., Hazlerigg D.G., "Circadian desynchrony and metabolic dysfunction; did light pollution make us fat?", *Med Hypotheses*, Vol. 77, 2011, pp. 1139-1144.