

## **Función de los NPY-Y1 de la sustancia gris periacueductal dorsal (SGP-D) en conductas de consumo hedónico en ratas Wistar**

Role of NPY-Y1 from the dorsal periaqueductal gray (SGP-D) in hedonic consumption behaviors in Wistar rats

**Abraham Miranda-Páez<sup>a</sup>, Priscila Vázquez-León<sup>b</sup>, Adán Rodríguez-Hernández<sup>c</sup>, Bruno A. Marichal-Cancino<sup>d\*</sup>**

<sup>a</sup>Departamento de Fisiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Wilfrido Massieu esq. Manuel Stampa s/n Col. Nueva Industrial Vallejo, 07738; Alc. Gustavo A. Madero, México City, Mexico. Correo electrónico: abmipa@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0985-1816>

<sup>b</sup>Laboratorio de Neuropsicofarmacología, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México. 1er. Piso, Edif. B, Av. Universidad 3004 Col. Copilco Universidad, 04510; Alc. Coyoacan, Mexico City, Mexico. Correo electrónico: vpriscila05@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4924-1238>

<sup>c</sup>Departamento de Nutrición, Centro de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Ciudad Universitaria, 20131 Aguascalientes, Ags., Mexico. Correo electrónico: israel.rodriguez@edu.uaa.mx, <https://orcid.org/0000-0003-0134-9688>

<sup>d</sup>Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Ciudad Universitaria, 20131 Aguascalientes, Ags., Mexico. Correo electrónico: bruno.marichal@edu.uaa.mx, <https://orcid.org/0000-0003-0244-5209>

\*Autor para correspondencia

Recibido: 10 de junio de 2022  
Aceptado: 2 de diciembre de 2022  
Publicado: 31 de enero de 2023  
<https://doi.org/10.33064/iycuaa2023883782>  
e3782

### **Resumen**

En modelos preclínicos, los efectos del neuropéptido Y (NPY) en la sustancia gris periacueductal dorsal (SGP-D) incluyen alteraciones en ansiedad y consumo de alimento, pero los receptores involucrados y/o su ubicación no se han descrito a profundidad. Nuestro objetivo fue analizar los efectos farmacológicos de la estimulación/bloqueo de los receptores NPY-Y1 en la SGP-D sobre conductas homeostáticas/hedónicas naturales y preferencia etílica en ratas Wistar hembras y machos (250-270 g). Los animales recibieron inyecciones intra-SGP-D (n=9) con: (i) vehículo (DMSO 10%); (ii) neuropéptido-Y (NPY, agonista endógeno NPY-Y1); o (iii) BIBP-3226 (antagonista selectivo NPY-Y1). NPY aumentó el consumo de alimento y sacarosa ( $p < 0.05$ ) en hembras y machos, sin modificar la preferencia etílica. BIBP-3226 disminuyó la ingestión de ambas sustancias y aumentó la preferencia etílica. Se concluye que el receptor NPY-Y1 en la SGP-D regula conductas de consumo predominantemente hedónico (tanto naturales como vinculadas con abuso alcohólico).

**Palabras clave:** NPY, NPY-Y1, BIBP-3226, consumo de alimento, alcoholismo, sustancia gris periacueductal.

## Abstract

In preclinical models, NPYergic transmission in dorsal periaqueductal gray (D-PAG) is involved in anxiety and food intake. Nevertheless, the specific NPY receptors involved remain partially unknown. This study was set-up to investigate the pharmacological effects of stimulation/blockade of NPY1 in D-PAG in Wistar rats (male and female) on food, sucrose, and alcohol intake. Animals received injections (intra-D-PAG; n=9) of: (i) vehicle (DMSO 10%); (ii) neuropeptide-Y (NPY, NPY-Y1 receptor endogenous agonist); or (iii) BIBP-3226 (NPY-Y1 selective receptor antagonist). NPY in D-PAG increased food and sucrose ( $p < 0.05$ ), but not ethanol ( $p > 0.05$ ) intake. BIBP-3226 decreased food and sucrose intake ( $p < 0.05$ ) and increased ethanol consumption ( $p < 0.05$ ). Our findings suggest NPY-Y1 in D-PAG as a key modulator of consummatory behaviors (mainly hedonic) and ethanol intake.

**Keywords:** NPY, NPY-Y1, BIBP-3226, food intake, alcoholism, dorsal periaqueductal gray (D-PAG).

## Introducción

El neuropeptido Y (NPY) es el péptido mediador más abundante en el cerebro de los mamíferos (Allen et al., 1983; Gray & Morley, 1986). Es abundante en la corteza cerebral, el hipocampo, el hipotálamo (Chronwall et al., 1985), los núcleos basales (particularmente en el núcleo accumbens), la amígdala, el locus coeruleus (Allen et al., 1983) y la sustancia gris periacueductal dorsal (SGP-D) de la rata (Kask et al., 2002). Los diversos efectos del NPY en los mamíferos se atribuyen a la activación de cuatro subtipos de receptores (Y1,2,4,5) los cuales están acoplados a proteínas Gi/G<sub>o</sub> cuya segunda mensajería produce hiperpolarización neuronal por la activación de canales de potasio, el bloqueo de canales de calcio y la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (Katsuura & Inui, 2016; A. P. Silva, Cavadas, & Grouzmann, 2002).

Funcionalmente, el NPY es un potente péptido orexigénico que estimula la ingestión de alimentos, preferentemente carbohidratos (Beck, 2006; C. Silva & McNaughton, 2019). El NPY estimula el consumo y la preferencia de soluciones dulces independientemente de su valor calórico (Lynch, Grace, Billington, & Levine, 1993). Los efectos del NPY sobre la ingestión de alimentos están mediados por al menos dos receptores, los receptores NPY-Y1 y NPY-Y5 (Beck, 2006). Los efectos de los agonistas específicos del receptor de NPY sugieren que el NPY-Y1 podría mediar en el componente apetitivo de la conducta de ingestión, mientras

que NPY-Y5 se vincula con el acto de ingestión en sí (Beck, 2006; Day, Keen-Rhinehart, & Bartness, 2005).

La administración de NPY en áreas cerebrales asociadas con la alimentación aumenta la ingestión de alcohol, mientras que su administración en regiones asociadas con la ansiedad la reduce (Badia-Elder, Gilpin, & Stewart, 2007; Vázquez-León et al., 2020). Adicionalmente, se ha reportado aumento en la ingestión de etanol después de la infusión de NPY en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo de ratas macho (Kelley, Nannini, Bratt, & Hodge, 2001). El NPY puede influir en el consumo de etanol de muchas maneras, principalmente regulando los niveles basales de ansiedad, modulando los efectos sedantes del etanol y/o modulando las propiedades gratificantes del etanol (Thiele, Sparta, Hayes, & Fee, 2004).

La participación de la SGP-D en la ingestión de sustancias de abuso, que incluyen sacarosa y alcohol, podría estar ligada a su estrecha interacción con núcleos del sistema de recompensa del cerebro, como el núcleo accumbens (NAc), el área tegmental ventral (ATV) y el hipotálamo (Koob & Volkow, 2010; Vázquez-León, Miranda-Páez, Chávez-Reyes, et al., 2021). Además, se ha reportado que, diversos mamíferos (incluido el humano) que muestran alta preferencia por las sustancias dulces ingieren mayor cantidad de alcohol comparados con los que muestran una preferencia baja (Bell, Gosnell, Krahn, & Meisch, 1994; Gosnell & Krahn, 1992; A. Kampov-Polevoy, Garbutt, & Janowsky, 1997; A. B. Kampov-Polevoy, Overstreet, Rezvani, & Janowsky, 1995). La preferencia por la sacarosa podría ser un mejor indicador de susceptibilidad alcohólica sobre otros factores clásicos como la ansiedad (Koros, Piasecki, Kostowski, & Bienkowski, 1998; Vázquez-León, Miranda-Páez, & Marichal-Cancino, 2021).

En un estudio previo, informamos que el NPY produce efectos ansiolíticos e inhibe de manera prominente el consumo de alcohol en ratas Wistar, probablemente a través de los receptores NPY-Y1 en la SGP-D (Vázquez-León et al., 2020). El presente estudio se diseñó para analizar el efecto farmacológico de la estimulación/bloqueo de los receptores NPY-Y1 en la SGP-D de ratas Wistar machos y hembras sobre la conducta de ingestión de alimento, sacarosa y alcohol. Nuestra hipótesis de trabajo fue que el receptor NPY-Y1 de la SGP-D modularía de manera diferencial entre sexos biológicos a las conductas de ingestión de alimento, sacarosa y alcohol.

## **Materiales y métodos**

### **Diseño experimental y sujetos de estudio**

Se realizó un estudio experimental de naturaleza preclínica en el área de la Neurofarmacología. Se emplearon ratas de la cepa Wistar (250-270 g; 6-8 semanas de edad) provenientes de las "instalaciones para el cuidado de animales" institucionales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), las cuales fueron conservadas en condiciones controladas de bioterio en estricto apego con normativa mexicana sobre "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" (NOM-062-ZOO-1999). Los animales fueron alojados en jaulas individuales de acrílico y tapas de acero inoxidable. Todos los protocolos y procedimientos fueron aprobados por el comité de ética institucional. Los animales permanecieron sin manipulación en nuestras áreas experimentales durante 3 horas previas al inicio de cada procedimiento para permitir la habituación a los espacios. Luego de los procedimientos, los animales eran ingresados al área de bioterio donde permanecieron durante todo el estudio.

### **Cirugía estereotáxica**

Los animales fueron anestesiados con ketamina (80 mg/kg, Pisa®) y xilazina (15 mg/kg, Pisa®) por vía intraperitoneal. Se implantó por una cánula guía unilateral en la SGP-D (AP: – 7,3 mm, ML: 0,5 mm y DV: 4,0 mm) de acuerdo con el Atlas del cerebro de la Rata Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 2014) utilizando un aparato estereotáxico (mod: 502,650, World Precision Instruments® Sarasota FL) (Figura 1). La cánula guía se sujetó al cráneo con dos tornillos de acero inoxidable quirúrgico y acrílico dental. Se permitió la recuperación postquirúrgica de los animales por un periodo mínimo de 10 días antes de cualquier manipulación experimental.

### **Compuestos y microinyecciones**

Tanto NPY (humano) como (R)-N-(diphenylacetyl)-N-[(4-hydroxy-phenyl)methyl]- D-arginina amida (BIBP-3226) fueron obtenidos de la empresa Sigma-Aldrich® y disueltos en solución salina fisiológica. Las dosis empleadas (ie., 2.34 nmol NPY y 0.5 nmol BIBP-3226) se seleccionaron a priori con base en resultados previos de nuestro grupo (Vázquez-León et al., 2020) y se administraron como tratamientos agudos en administraciones únicas.

Luego del periodo de recuperación postquirúrgico (ver sección anterior), se administró el respectivo tratamiento farmacológico en la región SGP-D a través de un inyector conectado a una cánula (calibre 31 × 10 mm), que se extendía 1 mm más allá de la punta de la cánula guía. La cánula de inyección se conectó a una jeringa de 1 µL (Hamilton Co., Reno, NV, EE. UU.) con un tubo de polietileno 20 lleno de solución salina isotónica estéril (SSI).

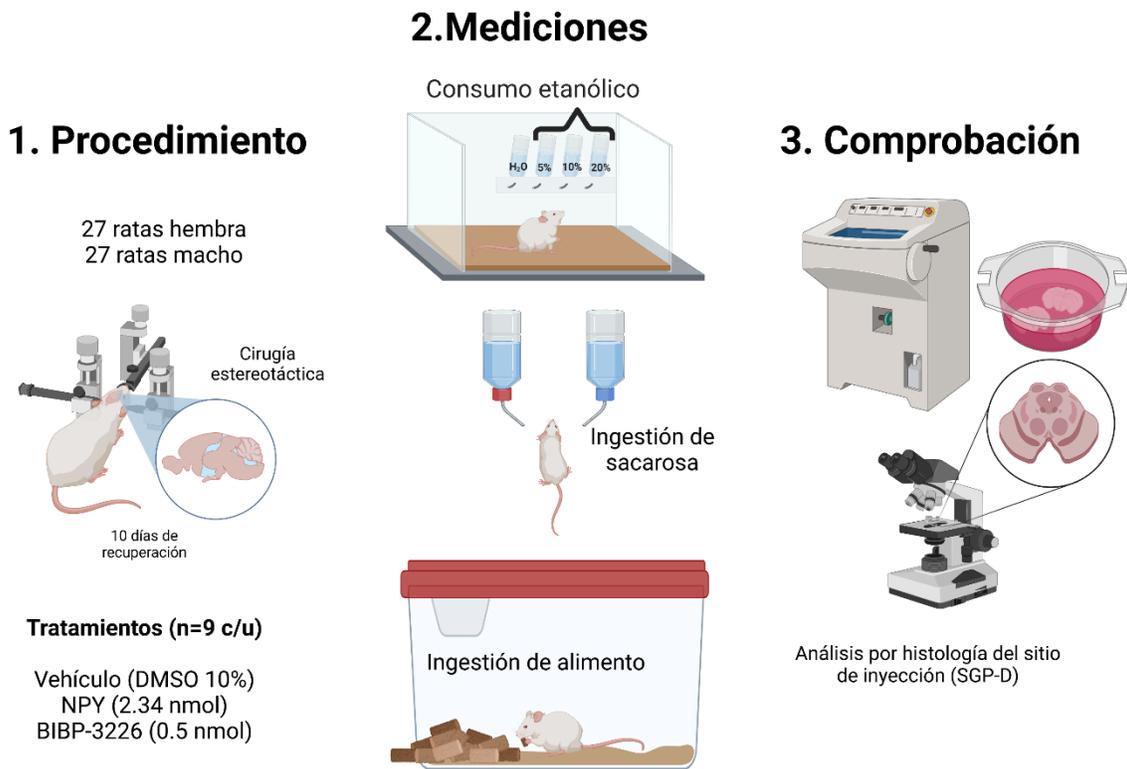
Las microinyecciones a través de la cánula se realizaron durante un período de 60 s, y luego la cánula de inyección se dejó sin tocar durante 60 s para evitar el reflujo del fármaco. Mientras tanto, cualquier movimiento de lucha de la rata se restringió suavemente mediante inmovilización (Figura 2).

### **Ingestión de alimento**

Las ratas recibieron alimento estándar para roedores de laboratorio durante todo el estudio (Propecua™, México) en un recipiente de acero inoxidable ubicado en la parte delantera, junto con los cuatro tubos dispensadores de dieta líquida. Para la medición de la ingestión de alimento, se colocaron 50 g de alimento en cada contenedor y se pesó el sobrante 24 horas después para determinar la cantidad diaria (g/día) ingerida. Se recuperó cualquier sobra macroscópica de alimento dentro de las jaulas para considerarla en la medición evitando sobreestimaciones.

### **Ingestión de sacarosa y consumo alcohólico**

Se midió la ingestión voluntaria de sacarosa y alcohol en todas las ratas. Para este propósito, cuatro tubos de vidrio estándar (70 mL, 25 × 200 mm) equipados con una boquilla de vidrio y un orificio terminal (diámetro = 1 mm) se instalaron en las jaulas individuales para permitir la ingesta de líquidos. Cada tubo se llenó con diferentes soluciones: agua, sacarosa 10%, y alcohol etílico 5% y 10%. Las concentraciones de etanol se eligieron con base en reportes previos (Mendoza-Ruiz, Vázquez-León, Martínez-Mota, Juan, & Miranda-Páez, 2018) y Vázquez-León y cols. (Vázquez-León, Miranda-Páez, Calvillo-Robledo, & Marichal-Cancino, 2021; Vázquez-León et al., 2020). Cada tubo de vidrio se pesó antes y después de 24 horas para cuantificar la cantidad de sacarosa o alcohol consumido. La ingestión de sacarosa se expresó en g/día. La ingestión de alcohol se calculó en gramos de alcohol absoluto por kg de peso corporal (g/kg)/día.



**Figura 1.** Diseño experimental. Figura realizada con BioRender con licencia.

### **Histología**

Una vez concluidos los experimentos conductuales, se procedió a la eutanasia de los animales mediante una sobredosis con anestésico (pentobarbital sódico, 60 mg/kg ip). Se sometieron a perfusión intracardiaca con solución salina isotónica seguida de formaldehído al 4%. Posteriormente, se procedió a disecar el cerebro desde bulbos olfatorios hasta bulbo raquídeo, conservándolos en una solución de formaldehído al 10% por al menos una semana. Se montaron las piezas anatómicas en un vibratomo para realizar los cortes histológicos (100  $\mu$ m de espesor) en un baño de solución de sacarosa 6%, tinción correspondiente de los cortes con violeta de cresilo y verificación de los sitios de implantación de la cánula a nivel de la SGP-D. Por último, se realizó una revisión de los cortes con microscopio estereoscópico. Solamente se incluyeron en los resultados los datos de los animales con las cánulas correctamente instaladas en el sitio objetivo (Figura 1).



Figura 2. Fotografía ilustrativa del proceso de microinyección i.c.v. en la rata. Fotografía propiedad del laboratorio de Neurofarmacología y Terapéutica Experimental.

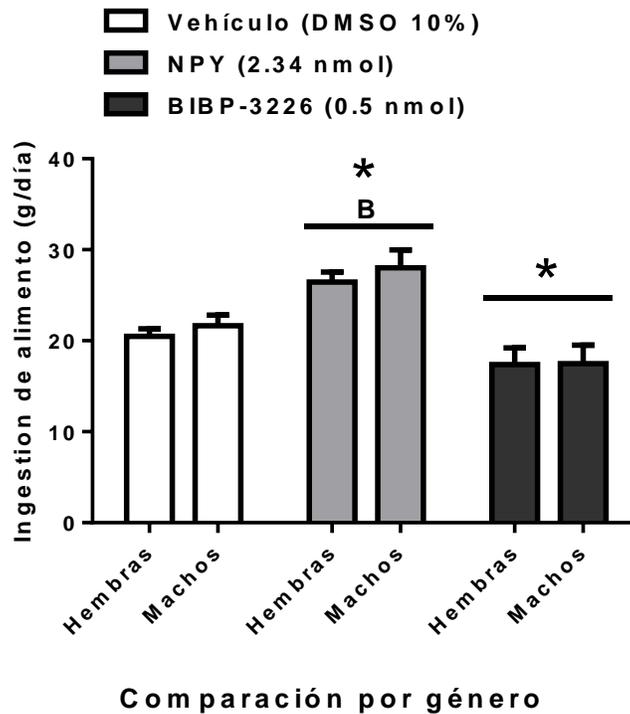
### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados usando el programa Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc. San Jose Cal, USA). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza de dos vías para cada una de las variables, seguido por la prueba de Bonferroni en caso de encontrarse diferencia significativa. Para todas las variables medidas la significancia estadística fue  $p < 0.05$ .

### **Resultados**

#### **Ingestión de alimento**

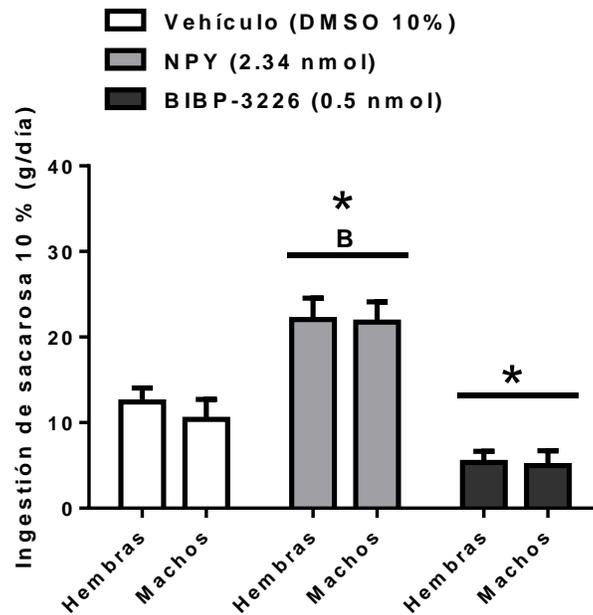
En la Figura 3, se muestra el efecto de los tratamientos sobre la ingestión de alimento. Tanto en las hembras como en los machos, el NPY aumentó la ingestión de alimento ( $p < 0.05$ ) en comparación con el vehículo. Mientras que los animales tratados con BIBP-3226 mostraron un menor consumo de alimento comparado con vehículo o NPY. Adicionalmente, cuando comparamos los efectos por sexo no encontramos diferencias ( $p > 0.05$ ).



**Figura 3.** Efecto agudo de los tratamientos intra-SGP-D sobre la ingestión de alimento en ratas hembra y macho. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y se analizaron mediante ANOVA de dos vías ( $n=9$ ). \*,  $p < 0.05$  vs. vehículo (DMSO 10%); B,  $p < 0.05$  vs. BIBP-3226 (0.5 nmol).

### **Ingestión de sacarosa**

En la figura 4, se muestra el efecto de los tratamientos sobre la ingestión de sacarosa al 10%. Tanto en machos como en hembras, los grupos que recibieron NPY (intra-SGP-D) consumieron mayor cantidad de sacarosa en comparación con el vehículo y con BIBP-3226 ( $p < 0.05$ ). A su vez, los animales tratados con BIBP-3226 consumieron menor cantidad de sacarosa en comparación con el vehículo ( $p < 0.05$ ). No existió interacción entre los tratamientos y el sexo biológico ( $p > 0.05$ ).

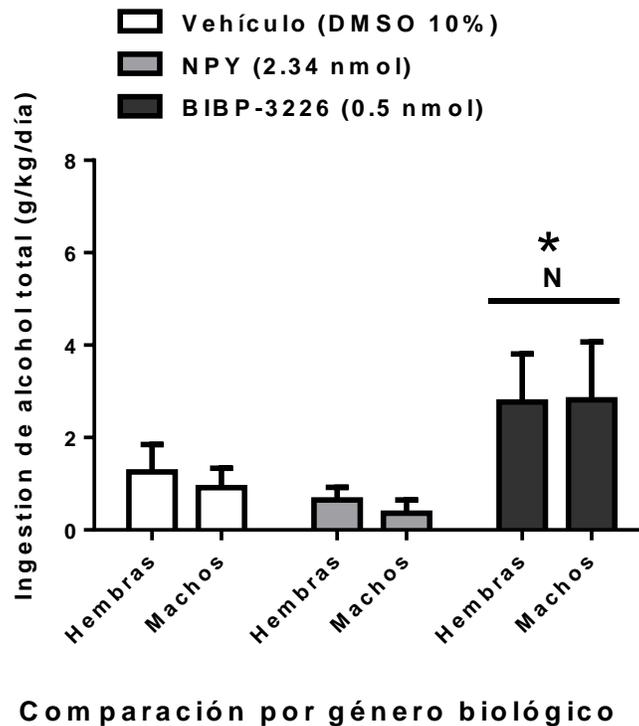


#### Comparación por género biológico

**Figura 4.** Efecto agudo de los tratamientos intra-SGP-D sobre la ingestión de sacarosa al 10% en ratas hembra y macho. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y se analizaron mediante ANOVA de dos vías ( $n=9$ ). \*,  $p < 0.05$  vs. vehículo (DMSO 10%); B,  $p < 0.05$  vs. BIBP-3226 (0.5 nmol).

#### Consumo de alcohol total

En la figura 5, se muestra el efecto de los tratamientos sobre el consumo total de alcohol. Los animales que recibieron BIBP-3226 (0.05 nmol) intra-SGP-D consumieron una mayor cantidad de alcohol con respecto al vehículo y a los que recibieron NPY ( $p < 0.05$ ), sin interacción entre tratamientos y sexo biológico ( $p > 0.05$ ).



**Figura 5.** Efecto de los tratamientos intra-SGP-D sobre la ingestión total de alcohol en ratas hembra y macho. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y se analizaron mediante ANOVA de dos vías ( $n=9$ ). \*,  $p < 0.05$  vs. vehículo (DMSO 10%); N,  $p < 0.05$  vs. NPY (2.34 nmol).

## Discusión

### Ingestión de alimento y sacarosa

La ingestión de alimento involucra fenómenos hedónicos (i.e., se consume por placer) y homeostáticos (i.e., se consume por necesidad energética) (Rossi & Stuber, 2018). En este trabajo, la ingestión de alimento no puede diferenciar el rasgo hedónico del homeostático. Sin embargo, al ser un alimento estándar (y el único conocido por los roedores a lo largo de sus vidas en laboratorio), es probable que su consumo obedezca predominantemente un rasgo homeostático. Por otro lado, los azúcares en general poseen la capacidad de activar los sistemas de recompensa del cerebro (Rada, Avena, & Hoebel, 2005), por lo tanto, su consumo denota un rasgo predominantemente hedónico. Así, este trabajo empleó el consumo de alimento como un indicador de consumo predominantemente homeostático y la ingestión de sacarosa como uno hedónico (Figuras 3 y 4).

Las áreas cerebrales que median la ingestión de alimentos incluyen estructuras como lo son la corteza prefrontal, hipotálamo, amígdala, área tegmental ventral y núcleo paraventricular; pero recientemente se ha reportado una función clave de las neuronas en

la SGP participando la ejecución de la conducta de ingestión de alimentos (Tryon & Mizumori, 2018). Nuestro grupo ha propuesto a la SGP como una región clave en los mecanismos que subyacen en la adicción a sustancias generadoras de síndrome de abstinencia (e.g., nicotina, cocaína, alcohol, cannabinoides, opioides, etc.) (Vázquez-León, Miranda-Páez, Chávez-Reyes, et al., 2021). Mientras que otros grupos de investigación internacional han postulado que la SGP-D puede estar involucrado en todas las conductas motivadas por estímulos tanto apetitivos como aversivos (C. Silva & McNaughton, 2019). En nuestros resultados, mostramos que el NPY genera un aumento tanto en el consumo de alimento como en la ingestión de sacarosa, mientras que el bloqueo de NPY-Y1 se asocia con inhibición del consumo de alimento (Figura 3), pero una inhibición muy elevada de la ingestión de sacarosa (Figura 4). Por lo tanto, podemos proponer que el control de NPY-Y1 de la SGP-D es más importante y significativo sobre las conductas hedónicas que sobre las homeostáticas. Tal aseveración va en el mismo sentido de lo reportado previamente (C. Silva & McNaughton, 2019; Tryon & Mizumori, 2018; Vázquez-León, Miranda-Páez, Chávez-Reyes, et al., 2021; Vázquez-León et al., 2020).

### **Consumo alcohólico**

Otros estudios han reportado que la administración de NPY en el ventrículo lateral de ratas seleccionadas por su alto consumo alcohólico genera una disminución en la ingestión de alcohol (Badía-Elder, Stewart, Powrozek, Murphy, & Li, 2003). Es importante destacar que la administración de compuestos en el ventrículo lateral puede alcanzar fácilmente áreas como la SGP-D, debido a la ágil difusión de sustancias desde el sistema ventricular y la proximidad del acueducto mesencefálico con la SGP (Paxinos & Watson, 2014). Nuestros datos sugieren que el NPY *per se* no disminuye la ingesta alcohólica en animales normales (i.e., con un bajo-normal consumo alcohólico; Figura 5). Sin embargo, el bloqueo del receptor NPY-Y1 en la SGP-D con BIBP-3226 (0.5 nmol) generó un aumento significativo en la ingestión de alcohol cuando se evaluaron sus efectos sin distinción de sexos biológicos (Figura 5). Lo anterior sugiere que dicho receptor regula de manera negativa la conducta de ingestión alcohólica. Esta observación ya había sido reportada previamente por nuestro grupo de estudio en un modelo de alcoholismo forzado (Vázquez-León et al., 2020), por lo que podemos destacar que se trata de un efecto altamente reproducible.

### **Efectos entre sexos biológicos**

Admitimos que, entender la función de las hormonas femeninas en las conductas de ingestión homeostática y hedónica de sustancias necesitaría de la implementación de un estudio con un diseño experimental distinto al empleado en este trabajo. No obstante, ese conocimiento cae fuera de los objetivos y/o alcances de la presente investigación. El hecho

de que no existieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre hembras y machos en los efectos producidos por el NPY y el BIBP-3226 sugiere que se trata de un importante sistema de control de los rasgos apetitosos de la conducta de ingestión de sustancias en los roedores, y probablemente en el resto de los mamíferos (Yi et al., 2018). Para apoyar esta propuesta, modelos de inducción del apetito se relacionan con aumentos en el receptor NPY-Y1 en sistema nervioso central (Xu, Kalra, Moldawer, & Kalra, 1998) y el receptor NPY-Y1 está involucrado en los mecanismos que regulan el consumo de sustancias de abusos como la metanfetamina y diversos rasgos hedónicos de la alimentación en ratas (Hsieh, Chen, Yu, Liao, & Kuo, 2013).

### **Conclusiones**

La actividad de los receptores NPY-Y<sub>1</sub> en la SGP-D, de manera equiparable en ambos sexos biológicos, modula: (i) positivamente y de manera moderada la conducta de ingestión de alimentos (conducta predominantemente homeostática); (ii) positivamente y de manera marcada la ingestión de sacarosa; y (iii) negativamente el consumo alcohólico.

### **Agradecimientos**

Esta investigación sirvió para el desarrollo del proyecto curricular y servicio social de la alumna Mildred Scarleth Ortiz Ramos, de la carrera de QFI de la ENCB.

El Dr. Abraham Miranda Páez agradece a la "Escuela Nacional de Ciencias Biológicas" del IPN por el proyecto SIP 20210587. El Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino agradece al "Departamento de Investigación y Posgrado" de la UAA por el financiamiento al proyecto PIFF21-1.

### **Referencias**

- Allen, Y. S., Adrian, T. E., Allen, J. M., Tatemoto, K., Crow, T. J., Bloom, S. R., & Polak, J. M. (1983). Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science*, 221(4613), 877-879. doi:10.1126/science.6136091
- Badia-Elder, N. E., Gilpin, N. W., & Stewart, R. B. (2007). Neuropeptide Y modulation of ethanol intake: effects of ethanol drinking history and genetic background. *Peptides*, 28(2), 339-344. doi:10.1016/j.peptides.2006.07.028
- Badia-Elder, N. E., Stewart, R. B., Powrozek, T. A., Murphy, J. M., & Li, T. K. (2003). Effects of neuropeptide Y on sucrose and ethanol intake and on anxiety-like behavior in high alcohol drinking (HAD) and low alcohol drinking (LAD) rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 27(6), 894-899. doi:10.1097/01.Alc.0000071929.17974.Da

- Beck, B. (2006). Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1471), 1159-1185. doi:10.1098/rstb.2006.1855
- Bell, S. M., Gosnell, B. A., Krahn, D. D., & Meisch, R. A. (1994). Ethanol reinforcement and its relationship to saccharin preference in Wistar rats. *Alcohol*, 11(2), 141-145. doi:10.1016/0741-8329(94)90055-8
- Chronwall, B. M., DiMaggio, D. A., Massari, V. J., Pickel, V. M., Ruggiero, D. A., & O'Donohue, T. L. (1985). The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience*, 15(4), 1159-1181. doi:10.1016/0306-4522(85)90260-x
- Day, D. E., Keen-Rhinehart, E., & Bartness, T. J. (2005). Role of NPY and its receptor subtypes in foraging, food hoarding, and food intake by Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289(1), R29-36. doi:10.1152/ajpregu.00853.2004
- Gosnell, B. A., & Krahn, D. D. (1992). The relationship between saccharin and alcohol intake in rats. *Alcohol*, 9(3), 203-206. doi:10.1016/0741-8329(92)90054-e
- Gray, T. S., & Morley, J. E. (1986). Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system. *Life Sci*, 38(5), 389-401. doi:10.1016/0024-3205(86)90061-5
- Hsieh, Y.-S., Chen, P.-N., Yu, C.-H., Liao, J.-M., & Kuo, D.-Y. (2013). The neuropeptide Y Y1 receptor knockdown modulates activator protein 1-involved feeding behavior in amphetamine-treated rats. *Molecular Brain*, 6(1), 46. doi:10.1186/1756-6606-6-46
- Kampov-Polevoy, A., Garbutt, J. C., & Janowsky, D. (1997). Evidence of preference for a high-concentration sucrose solution in alcoholic men. *Am J Psychiatry*, 154(2), 269-270. doi:10.1176/ajp.154.2.269
- Kampov-Polevoy, A. B., Overstreet, D. H., Rezvani, A. H., & Janowsky, D. S. (1995). Saccharin-induced increase in daily fluid intake as a predictor of voluntary alcohol intake in alcohol-preferring rats. *Physiol Behav*, 57(4), 791-795. doi:10.1016/0031-9384(94)00389-0
- Kask, A., Harro, J., von Hörsten, S., Redrobe, J. P., Dumont, Y., & Quirion, R. (2002). The neurocircuitry and receptor subtypes mediating anxiolytic-like effects of neuropeptide Y. *Neurosci Biobehav Rev*, 26(3), 259-283. doi:10.1016/s0149-7634(01)00066-5
- Katsuura, G., & Inui, A. (2016). Subchapter 25B - Neuropeptide Y. In Y. Takei, H. Ando, & K. Tsutsui (Eds.), *Handbook of Hormones* (pp. 215-e225B-211). San Diego: Academic Press.

- Kelley, S. P., Nannini, M. A., Bratt, A. M., & Hodge, C. W. (2001). Neuropeptide-Y in the paraventricular nucleus increases ethanol self-administration. *Peptides*, 22(3), 515-522. doi:10.1016/s0196-9781(01)00361-8
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217-238. doi:10.1038/npp.2009.110
- Koros, E., Piasecki, J., Kostowski, W., & Bienkowski, P. (1998). Saccharin drinking rather than open field behaviour predicts initial ethanol acceptance in Wistar rats. *Alcohol Alcohol*, 33(2), 131-140. doi:10.1093/oxfordjournals.alcalc.a008369
- Lynch, W. C., Grace, M., Billington, C. J., & Levine, A. S. (1993). Effects of neuropeptide Y on ingestion of flavored solutions in nondeprived rats. *Physiol Behav*, 54(5), 877-880. doi:10.1016/0031-9384(93)90295-q
- Mendoza-Ruiz, L. G., Vázquez-León, P., Martínez-Mota, L., Juan, E. R. S., & Miranda-Pérez, A. (2018). Forced ethanol ingestion by Wistar rats from a juvenile age increased voluntary alcohol consumption in adulthood, with the involvement of orexin-A. *Alcohol*, 70, 73-80. doi:10.1016/j.alcohol.2018.01.008
- Paxinos, G., & Watson, C. (2014). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York, 7th edn.
- Rada, P., Avena, N. M., & Hoebel, B. G. (2005). Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience*, 134(3), 737-744. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.04.043
- Rossi, M. A., & Stuber, G. D. (2018). Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. *Cell Metab*, 27(1), 42-56. doi:10.1016/j.cmet.2017.09.021
- Silva, A. P., Cavadas, C., & Grouzmann, E. (2002). Neuropeptide Y and its receptors as potential therapeutic drug targets. *Clin Chim Acta*, 326(1-2), 3-25. doi:10.1016/s0009-8981(02)00301-7
- Silva, C., & McNaughton, N. (2019). Are periaqueductal gray and dorsal raphe the foundation of appetitive and aversive control? A comprehensive review. *Prog Neurobiol*, 177, 33-72. doi:10.1016/j.pneurobio.2019.02.001
- Thiele, T. E., Sparta, D. R., Hayes, D. M., & Fee, J. R. (2004). A role for neuropeptide Y in neurobiological responses to ethanol and drugs of abuse. *Neuropeptides*, 38(4), 235-243. doi:10.1016/j.npep.2004.04.005
- Tryon, V., & Mizumori, S. (2018). A Novel Role for the Periaqueductal Gray in Consummatory Behavior. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 12, 178. doi:10.3389/fnbeh.2018.00178

- Vázquez-León, P., Miranda-Páez, A., Calvillo-Robledo, A., & Marichal-Cancino, B. A. (2021). Blockade of GPR55 in dorsal periaqueductal gray produces anxiety-like behaviors and evokes defensive aggressive responses in alcohol-pre-exposed rats. *Neurosci Lett*, 136218. doi:10.1016/j.neulet.2021.136218
- Vázquez-León, P., Miranda-Páez, A., Chávez-Reyes, J., Allende, G., Barragán-Iglesias, P., & Marichal-Cancino, B. A. (2021). The Periaqueductal Gray and Its Extended Participation in Drug Addiction Phenomena. *Neurosci Bull*. doi:10.1007/s12264-021-00756-y
- Vázquez-León, P., Miranda-Páez, A., & Marichal-Cancino, B. A. (2021). Experimental protocol for detecting higher alcohol consumers from a conventional rat line based on basal anxiety. *MethodsX*, 8, 101444. doi:10.1016/j.mex.2021.101444
- Vázquez-León, P., Ramírez-San Juan, E., Marichal-Cancino, B. A., Campos-Rodríguez, C., Chávez-Reyes, J., & Miranda-Páez, A. (2020). NPY-Y(1) receptors in dorsal periaqueductal gray modulate anxiety, alcohol intake, and relapse in Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 199, 173071. doi:10.1016/j.pbb.2020.173071
- Xu, B., Kalra, P. S., Moldawer, L. L., & Kalra, S. P. (1998). Increased appetite augments hypothalamic NPY Y1 receptor gene expression: effects of anorexigenic ciliary neurotropic factor 1 Presented in part at the 27th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, LA, vol. 23, p. 1343 #528.2.1. *Regulatory Peptides*, 75-76, 391-395. doi:[https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(98\)00093-7](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(98)00093-7)
- Yi, M., Li, H., Wu, Z., Yan, J., Liu, Q., Ou, C., & Chen, M. (2018). A Promising Therapeutic Target for Metabolic Diseases: Neuropeptide Y Receptors in Humans. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(1), 88-107. doi:10.1159/000486225