



Universidad Nacional Autónoma de México

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Facultad de Psicología

División de estudios profesionales

El acceso restringido a un bocadillo dulce induce cambios conductuales y plásticos en el sistema corticolímbico similares a la adicción

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciado en psicología

PRESENTA

Geovanni Muñoz Escobar

Directora de tesis

Dra. Carolina Escobar Briones

Ciudad Universitaria, CD. MX. noviembre 2017



**Facultad
de Psicología**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Miembros del comité sinodal

Dr. David Natanael Velázquez Martínez. Facultad de Psicología, UNAM

Dr. Antonio Paulino Zainos Rosales. Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Olga Araceli Rojas Ramos. Facultad de Psicología, UNAM

Dra. Nadia Natali Guerrero Vargas. Facultad de Medicina, UNAM

INDICE:

ACRÓNIMOS.....	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES.....	4
Trastorno de la conducta alimentaria, ¿Un proceso de adicción?.....	4
Conductas relacionadas con el consumo de drogas y alimento altamente reforzante.....	6
Sistema de motivación y recompensa.....	9
Δ FosB como factor de transcripción de cambios plásticos en el sistema de recompensa.....	13
Los astrocitos como apoyo estructural en los cambios plásticos.....	16
El acceso restringido a alimento como factor desencadenante del consumo compulsivo de alimentos altamente reforzantes.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
OBJETIVOS	23
HIPÓTESIS	24
MATERIALES Y METODOS.....	25
Sujetos y condiciones generales.....	25
Diseño Experimental.....	26
Actividad General.....	26
Monitoreo de la temperatura corporal.....	27
Evaluación de la motivación y esfuerzo por obtener el chocolate.....	29
Medición de atracón (Binge eating).....	30
Análisis neuronal.....	31
Análisis Estadístico.....	33
RESULTADOS	34
Actividad locomotora anticipatoria al chocolate.....	34
Temperatura corporal.....	38
Prueba Conductual: esfuerzo y motivación por obtener el chocolate.....	41

Ganancia de peso y consumo kilocalorico.....	46
Atracón.....	47
Resultados del Análisis neuronal.....	49
DISCUSION.....	51
CONCLUSIONES.....	58
REFERENCIAS.....	60

Agradecimientos

Al programa de CONACYT de apoyo a ayudantes de investigador SIN III o emérito por la beca otorgada para la finalización del proyecto de tesis. Este trabajo fue financiado por CONACYT proyecto 239403.

Agradezco a la Dra. Carolina Escobar por todo el apoyo que me brindo desde mi estancia en su laboratorio y recibirme como un integrante más de su equipo de investigación, gracias por brindarme la oportunidad de crecer como persona y profesionalista y otorgarme las herramientas necesarias para continuar con esta grandiosa labor.

Dedicatorias

A mis padres:

Gracias por todo el esfuerzo que los llevo a convertirme en lo que soy, por esas grandes enseñanzas que me ayudaron a continuar con mis sueños cuando creí que ya no podía. Sobre todo, gracias por dejarme volar alto y sin miedo.

Mamá, gracias por creer en mí y en mis ideas, por alentarlas por muy grandes e inalcanzables que fueran, por el coraje que me enseñaste para seguir luchando. Papá, gracias por levantar mi vuelo cuando estaba a punto de caer, por enseñarme a aprender de mis errores y por enseñarme a confiar en lo que soy.

A mis hermanos:

Mi pilar, mi fábrica de risas, felicidad y mucho amor. Gracias por escuchar todas mis locas ideas de esta cabeza tan revuelta, por apoyarme en todo momento y luchar a mi lado. Gracias por estar en los momentos más felices de mi vida y por hacerme reír en los momentos más difíciles.

ACRÓNIMOS

<i>Ad libitum</i>	A voluntad; condición de acceso continuo.
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico; receptor para Glutamato.
AP1	Factor de transcripción
CDK5	Ciclina dependiente de cinasa
Chow	Alimento regular/ estándar
Core	Núcleo o centro
<i>Craving</i>	Búsqueda y deseo intenso por un estímulo reforzante.
DSM-V	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales quinta edición.
GFAP	Proteína acida glial fibrilar, expresada en diversos tipos celulares incluyendo los astrocitos
<i>Liking</i>	Me gusta
NF κ B	Factor nuclear potenciador, es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN
NIDA	Instituto Nacional de Drogas de abuso de los Estados Unidos
PBS	Buffer Fosfato salina
PH	Potencial de hidrogeno, medida de acidez o alcalinidad.
Shell	Cubierta o concha
Wanting	Lo quiero y/o lo busco
Δ FOSB	Factor de transcripción involucrado en cambios plásticos neuronales

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad a la que contribuyen múltiples variables, una de las hipótesis sugiere que el sobreconsumo de alimentos con alto contenido calórico y sus efectos en el sistema de recompensa pueden contribuir a las elevadas tasas de sobrepeso y obesidad. En modelos animales que involucran el acceso restringido de alimentos dulces con alto contenido calórico, los roedores desarrollan conducta de atracón, anticipación y abstinencia. A nivel cerebral se observa un incremento de la actividad neuronal en áreas corticolímbicas. Estos cambios sugieren que el acceso restringido a un bocadillo dulce puede propiciar el desarrollo de adicción a dichos alimentos. En esta investigación se exploraron condiciones de acceso restringido con y sin características circadianas con la propuesta de que, el evento de acceso al bocadillo dulce al convertirse en sincronizador, se establecen cambios conductuales y neuronales que inducen un fenómeno similar a la adicción. En este estudio se determinaron la presencia de conductas de esfuerzo, atracón e indicadores de cambios plásticos en estructuras corticolímbicas. Demostrando que el acceso restringido a un alimento apetecible promueve la presencia de conductas de esfuerzo y atracón, incrementando en magnitud mediante la expectación y anticipación, cuando el acceso es restringido y programado. De manera similar, el acceso restringido promueve un incremento en el número de células inmunoreactivas a Δ FosB, como indicador de plasticidad. Además, el consumo de chocolate, sin importar el patrón de acceso, promueve un incremento en la expresión de la proteína GFAP, pudiendo ser el reflejo de un proceso de inflamación y estrés oxidativo ante el consumo de un alimento alto en grasas y azúcares.

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de la obesidad ha aumentado drásticamente en las últimas décadas y actualmente es considerada por la Organización Mundial de la Salud como uno de los principales problemas que afectan directamente la calidad de vida de los individuos (WHO, 2016). La obesidad puede definirse en términos del índice de masa corporal (IMC), que a su vez se define como el peso del individuo dividido por el cuadrado de la talla: los individuos con un $IMC \geq 25$ y ≥ 30 se consideran con sobrepeso y obesidad respectivamente (Murray, Kroll, & Avena, 2015b). Las intervenciones dirigidas a abordarla para disminuir el alto índice de tejido adiposo, tienen un éxito limitado debido a que están enfocados a la reducción de las probabilidades de muerte. La hiperfagia o consumo crónico excesivo de alimento, es un comportamiento primario para el desarrollo de obesidad, por lo que se puede considerar que muchas de las formas de obesidad se producen parcialmente como consecuencia de comer en exceso y sin control (Leigh & Morris, 2016).

Es posible que esta forma de desregulación en la conducta de ingesta sea resultado del incremento en la disponibilidad y exposición a alimentos altamente hedónicos y energéticamente densos (Avena, Murray, & Gold, 2013). La ingestión de alimentos dulces y sabrosos con alto contenido calórico, pueden desencadenar eventos de atracón y sobreconsumo por placer y no por hambre (Corsica & Pelchat, 2010; Murray, Kroll, & Avena, 2015b). Estos modelos de alimentación son considerados como el resultado de alteraciones en el sistema de recompensa que regula la alimentación hedónica, controlada por las propiedades reforzantes de los alimentos (Rogers, 2017).

La alimentación hedónica o alimentación no homeostática es definida como el consumo de alimentos por placer en ausencia de un déficit energético, que usualmente se manifiesta como un sobreconsumo ante la presencia de alimentos altamente reforzantes (Meule, 2015).

Así como se ha reportado que el sobreconsumo puede desencadenar cambios en los procesos neuronales asociados con el reforzamiento, la restricción también parece ser un factor que puede estimular la motivación por consumir alimentos altos en grasa y azúcar incrementado la probabilidad de presentar episodios de atracón (Avena et al., 2013).

Mientras que el sobreconsumo disminuye la sensibilidad a la recompensa promoviendo un aumento en la motivación por alimentos altos en grasa y azúcar (Shin, Townsend, Patterson, & Berthoud, 2011), la restricción incrementa la sensibilidad a la recompensa y aumenta la motivación para la búsqueda y el consumo de drogas de abuso así como de alimentos altos en grasa y azúcar (Pankevich, Teegarden, Hedin, Jensen, & Bale, 2010; Berner, Avena, & Hoebel, 2008). Estos hallazgos demuestran que ambos factores pueden llevar a un sobreconsumo sin una necesidad calórica, promoviendo conductas similares a las reportadas ante el consumo de drogas de abuso.

La hipótesis central en la literatura es que los alimentos altamente reforzantes pueden impactar en el circuito de recompensa de una forma similar a las drogas de abuso, por lo tanto, estos cambios son posiblemente el origen de la motivación que tienen los individuos por consumir alimento excesivamente y contribuir a diversos problemas de salud como la obesidad.

ANTECEDENTES

Trastorno de la conducta alimentaria, ¿un proceso de adicción?

Existe controversia sobre si ciertas conductas compulsivas al alimento pueden ser calificadas como adicción.

En general, la adicción es definida con base de conductas dirigidas al consumo de la sustancia, así como los factores cognitivos y emocionales involucrados. Estos factores conductuales representan modificaciones en el cerebro que pueden propiciar y potenciar el escalamiento en el consumo de la sustancia. Estos cambios caracterizan la transición de un consumo ocasional y voluntario a un consumo habitual, a la compulsión y adicción crónica que, junto con altos niveles

de estrés, subyace a lo que se ha descrito como los tres estados recurrentes de la adicción: atracón/intoxicación, abstinencia/efectos negativos y preocupación/anticipación (craving) (Koob & Volkob, 2016; Koob & Volkob, 2010).

El *National Institute on Drug Abuse* (NIDA,2017) define adicción como una enfermedad crónica del cerebro, que se caracteriza por la búsqueda y uso compulsivo de drogas a pesar de las consecuencias nocivas. Se considera una enfermedad cerebral ya que cambia su estructura y función. Dichos cambios pueden ser duraderos e incidir en comportamientos perjudiciales para el sujeto.

El *Manual Estadístico de los Trastornos Mentales V* (DSM-V) ya no utiliza el término adicción para describir los problemas graves relacionado con el uso compulsivo y habitual de drogas. Utiliza la expresión trastornos relacionados con el consumo de sustancias y trastornos adictivos, los cuales, son divididos en dos grupos: *los trastornos por consumo de sustancias* y *los trastornos inducidos por sustancias*.

Así mismo, el DSM-V define a los trastornos de la conducta alimentaria y de la ingesta de alimento como una alteración persistente en el comportamiento relacionado con la alimentación que llevan a una alteración en el consumo o en la absorción de los alimentos y que causan un deterioro significativo de la salud física o del funcionamiento psicosocial. Algunos de los individuos con estos trastornos refieren síntomas similares a los que suelen atribuirse a las personas con trastornos por consumo de sustancias, como el ansia y los patrones de consumo compulsivo, esta semejanza puede reflejar la implicación de los mismos sistemas neuronales. Sin embargo, la obesidad no se incluye en el DSM-V ya que es el resultado del exceso de consumo de energía en relación a la energía gastada a largo plazo, donde influyen factores genéticos, fisiológicos, conductuales y ambientales que pueden variar entre los individuos. Por lo contrario, existen asociaciones entre la obesidad y ciertos trastornos conductuales como el trastorno por atracón (American Psychiatry Association, 2014).

Conductas relacionadas con el consumo de drogas y alimento altamente reforzante

La conducta compulsiva es una característica fundamental que se observa con el consumo de alimento sabroso similar al consumo de drogas de abuso. Es definida como la manifestación de acciones perseverativas y repetitivas, realizadas para reducir la tensión o ansiedad (Koob & Volkow, 2016). Esta característica puede coexistir con conductas impulsivas que son definidas como una predisposición hacia una acción rápida y no planeada en respuesta a estímulos internos y externos sin importar las consecuencias negativas, y que son acompañadas de sentimientos de placer o gratificación. De esta forma los individuos pueden moverse de la impulsividad a la compulsividad, y el control de las conductas para obtener el alimento o droga es paralelo a los cambios de reforzadores positivos a negativos (Koob & Volkow, 2016; Leigh & Morris, 2016).

Para el estudio del uso compulsivo y habitual de drogas, así como para la evaluación del consumo compulsivo de alimento se han desarrollado modelos animales que bajo determinados paradigmas presentan aspectos concretos conductuales asociados a su consumo (Volkow, Koob, & McLellan, 2016; García Pardo, Roger Sánchez, De la Rubia Ortí, 2017) . Entre ellos se observan:

Craving: El craving al alimento como a las drogas de abuso es definido como un deseo intenso o urgencia por consumir un alimento, que regularmente se presenta después de un periodo de abstinencia (Venniro, Caprioli, & Shaham, 2016; Rogers, 2017). En modelos animales se ha observado un incremento progresivo en la tasa de respuesta (palanqueo) durante las primeras semanas de abstinencia y se mantiene durante periodos prolongados, después de la autoadministración (Venniro et al., 2016). En protocolos de condicionamiento de preferencia de lugar (CPP) se ha observado un incremento a través del tiempo en la preferencia del lado pareado con la sustancia (Caprioli, Zeric, Thorndike, & Venniro, 2015). Otro indicador conductual relacionado con el craving es el aumento de la actividad locomotora general durante el periodo de búsqueda de la droga o alimento específico (De Jong, Vanderschuren, & Adan, 2012).

Atracones: “Binge Eating” es definido como un sobreconsumo en un corto periodo de tiempo (1-2 horas) significativamente mayor al que la mayoría de las personas consumiría en un periodo de tiempo similar bajo circunstancias similares (American Psychiatry Association, 2014). En modelos animales se ha definido como una ingestión excesiva en un corto periodo de tiempo, en un solo episodio, que por lo general se presenta después de un periodo de privación forzada (De Jong et al., 2012; Corwin, Avena, & Boggiano, 2011). Existen diversos modelos animales para inducir atracón; uno de ellos es el *modelo de acceso limitado* en este modelo los animales nunca se encuentran bajo restricción de alimento chow o agua y son expuestos a alimento sabroso esporádicamente (3 veces por semana) en tiempos limitados (1-3 horas), dicho acceso produce un aumento en el consumo del alimento sabroso a lo largo de 4 semanas. En este modelo el atracón es estimulado por elección y no por privación (Corwin et al., 2011; Corwin & Babbs, 2012; Westwater, Fletcher, & Ziauddeen, 2016).

Abstinencia: Se presenta después de un periodo de privación forzada o voluntaria del acceso a la droga o alimento sabroso (Rogers, 2017). En modelos animales con privación de alimento y acceso a una solución de sacarosa, cuando se privan de acceso a la solución dulce, las ratas expuestas a este ciclo de dieta, presentan conducta de atracón y síntomas de abstinencia como el incremento de ansiedad, un incremento en el castaño de dientes, así como temblores y brincos (Colantuoni et al., 2002; Avena, Rada, & Hoebel, 2008). La presencia de conductas de ansiedad es una de las características en la abstinencia la cual puede ser medida por medio de diversas pruebas conductuales por ejemplo el laberinto elevado, en donde las ratas evitan los brazos abiertos, especialmente cuando se encuentran iluminados, prefiriendo la obscuridad, es decir los brazos cerrados. Este conflicto de aproximación-evitación resulta en comportamientos que se han correlacionado con el aumento de los indicadores de estrés fisiológico (Llc, 2001).

Conductas de esfuerzo/motivación por obtener la recompensa:

Una de las características principales de la adicción es el esfuerzo y el tiempo invertido por obtener la sustancia o alimento. En modelos animales, el método más empleado para medir esta característica es el condicionamiento operante que bajo un paradigma de autoadministración, los animales son entrenados para conseguir la sustancia realizando una respuesta operante como presionar una palanca. La mayoría de los procedimientos de autoadministración utilizan un programa de razón progresiva (RP) donde el animal debe realizar un mayor número de respuesta de manera gradual para obtener el reforzador (García Pardo, Roger Sánchez, De la Rubia Ortí, 2017; Westwater et al., 2016; Venniro et al., 2016). Un método alternativo para la evaluación de la motivación y esfuerzo por obtener la recompensa sin la necesidad de un entrenamiento previo, es la utilización de una caja de malla de alambre sellada con orificios, la cual contendrá la recompensa (Valdes, 2010), dicha estrategia permite al animal ver y olfatear el contenido pero no obtenerlo, permitiendo evaluar las conductas relacionadas con la obtención del reforzador mediante la manipulación de la caja de malla (Blancas, Gonzalez, & Escobar, 2014).

Continuar con el uso de la sustancia a pesar de las consecuencias adversas:

Estudios recientes han demostrado que esta característica también ocurre en modelos animales (Caprioli et al., 2015; Venniro et al., 2016). Después de un periodo de tiempo de acceso prolongado a autoadministración de cocaína, los animales continúan con el consumo de la sustancia aun en la presencia de un estímulo condicionado aversivo, como un tono previamente pareado con un shock eléctrico en las patas (Vanderschuren & Everitt, 2004; De Jong et al., 2012). Para demostrar que la búsqueda de alimentos altamente reforzantes (usualmente una combinación de grasa y azúcar) también puede hacer a los animales resistentes al castigo, se han utilizado paradigmas comparables de aversión condicionada (Oswald, Murdaugh, King, & Boggiano, 2011). En este sentido, se ha demostrado que ante un acceso extendido a dieta de cafetería, la conducta de búsqueda del

alimento se vuelve insensible a la presentación de un estímulo condicionado aversivo (Johnson & Kenny, 2010).

Sistema de motivación y recompensa

Las estructuras que comprenden el sistema de recompensa son las mismas que responden a las drogas de abuso y a las recompensas naturales como la ingesta de alimento, el sexo y la interacción social. En general, este sistema está implicado en la regulación de la motivación y el valor reforzante de los estímulos (Koob & Volkow, 2016).

Las drogas de abuso, como la cocaína y las anfetaminas, inciden directamente (en los circuitos dopaminérgicos) en el circuito de recompensa, ingresando al sistema nervioso por la circulación. El alimento también incide en el mismo circuito en dos formas indirectas (Alonso-Alonso et al., 2015). La primera es la entrada por la vía neural proveniente de las papilas gustativas a las neuronas que secretan dopamina en el cerebro y la segunda vía es a través de hormonas y otras señales generadas por la digestión y absorción de la ingesta de alimentos hacia sistemas de regulación homeostática (Cathelain, Brunault, Ballon, Réveillère, & Courtois, 2016).

La ingesta de alimento es determinada por la interacción de señales circulantes de la homeostasis energética que son codificadas por los circuitos cerebrales encargados de generar todo un repertorio conductual para conseguir y consumir alimento. Pero la decisión para iniciar la conducta de ingesta no es influenciada únicamente por estados internos del equilibrio calórico, sino también por factores no homeostáticos, como la palatabilidad de los alimentos y señales ambientales que pueden producir respuestas condicionadas (Ferrario et al., 2016). Las hormonas y neuropeptidos involucrados en la homeostasis energética pueden influenciar la vía dopaminérgica del sistema de recompensa. Señales orexigenicas como la grelina, glucagón y orexinas incrementan la actividad de las neuronas dopaminérgicas de este sistema, mientras que las señales anorexigenicas como la leptina e insulina las inhiben y disminuyen la liberación de dopamina (Volkow, Wang, Tomasi, & Baler, 2013). Por lo cual, la alimentación por placer y no por

hambre es considerada como la salida conductual del incremento de la activación en el sistema de recompensa (Meule, 2015; Volkow, Wang, Tomasi, & Baler, 2013) (Ver Figura 1).

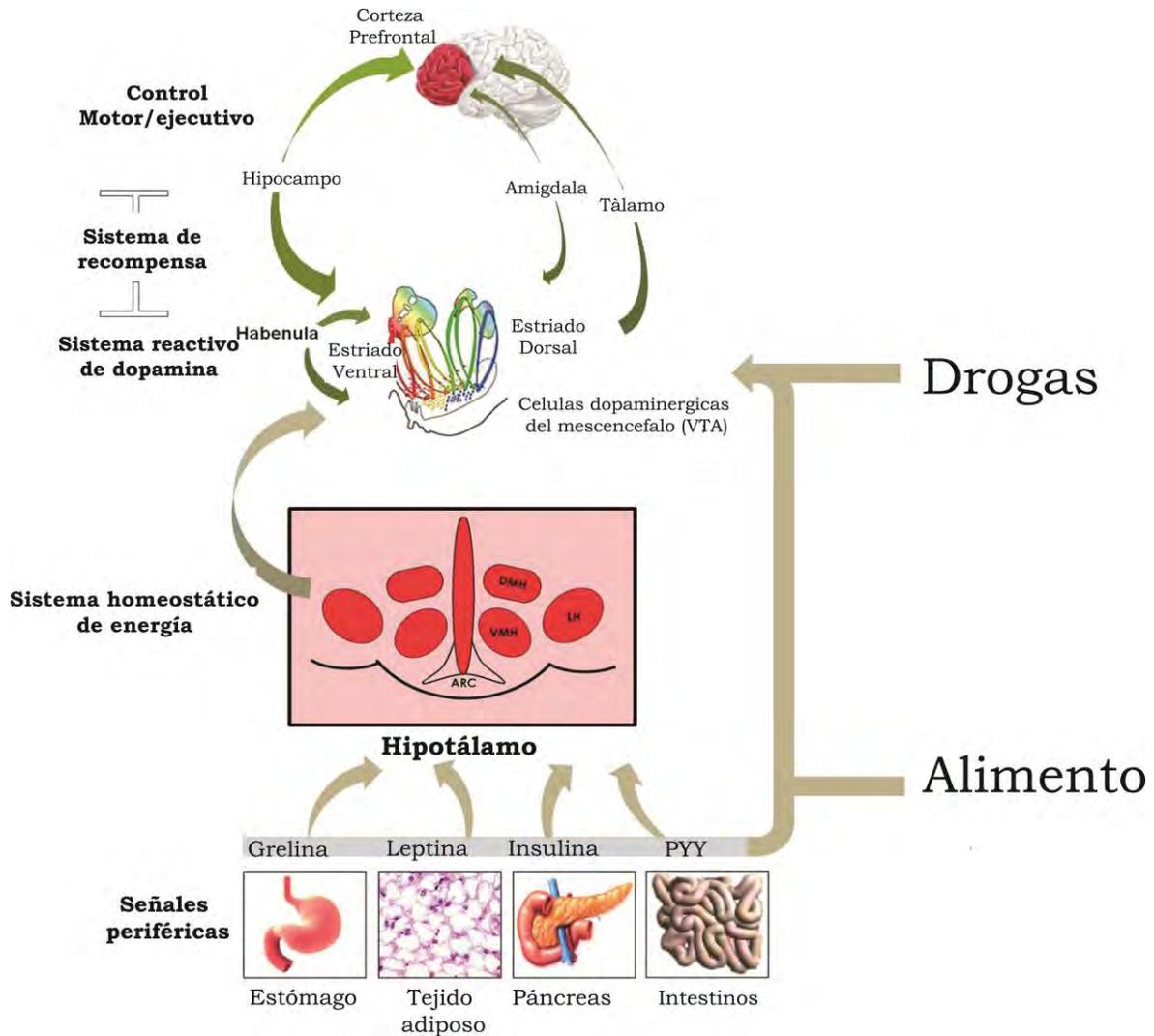


Figura 1. Contraste entre las drogas de abuso y el alimento. La acción de las drogas es a través de sus efectos directos en la vía dopaminérgica del sistema de recompensa cerebral. La regulación de la conducta de ingesta y la respuesta a los alimentos son moduladas por múltiples mecanismos centrales y periféricos, que directa o indirectamente impactan sobre el sistema de recompensa. PYY, péptido Y; VTA, área ventral tegmental (Modificado de Volkow et al., 2013).

El sistema neuronal que regula la recompensa consiste en una red de regiones cerebrales que comprenden la vía mesocorticolímbica que surge de las neuronas dopaminérgicas provenientes del área ventral tegmental (VTA) en el mesencéfalo. Envía proyecciones al núcleo accumbens (NAcc), hipocampo, corteza prefrontal

(PFC) y amígdala. EL VTA y el NAcc forman una red interconectada para el procesamiento de la recompensa; así mismo, la amígdala es fundamental en el control de la ansiedad (Sharma, Fernandes, & Fulton, 2013). Este sistema está críticamente implicado en el desarrollo de conductas motivadas incluyendo la ingesta de alimentos. Por otra parte, neuronas en el VTA y el NAcc expresan receptores para diversas señales metabólicas, el péptido similar al glucagón, grelina, insulina y orexinas, entre otros. Por lo tanto, no es sorprendente que estas hormonas/péptidos también participen en la regulación de la respuesta hedónica de los alimentos (Volkow et al., 2013).

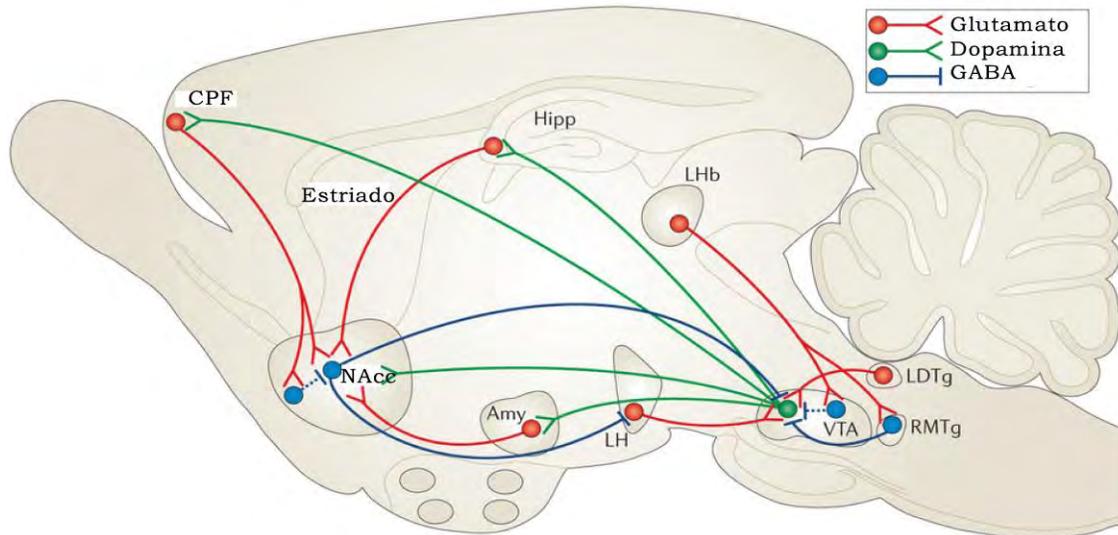
Las neuronas dopaminérgicas del VTA también envían aferencias a la CPF, a la amígdala central (ACe), amígdala basolateral (BLA) y al hipocampo. Todas estas regiones que son llamadas el sistema de recompensa cerebral, están interconectadas de diversas formas: por ejemplo, el NAcc recibe inervaciones glutamatérgicas de la CPF, amígdala e hipocampo y a su vez estas áreas tienen conexiones glutamatérgicas con otras áreas (Koob, 2014).

Las regiones del sistema de recompensa se han asociado a una función conductual específica: El circuito VTA-NAcc es crucial para el reconocimiento de recompensas en el ambiente y para iniciar su consumo (Berridge & Robinson, 2016; Koob & Volkow, 2016; Koob & Le Moal, 2008; Koob & Volkow, 2010) así mismo, estas regiones responden a estímulos aversivos, la amígdala como un componente crucial para la asociación de memorias relacionadas con el miedo, aversión y la recompensa; el hipocampo como un mediador de la memoria declarativa y la CPF con aspectos relacionados a la memoria de trabajo y el control ejecutivo (Koob & Volkow, 2016) (Ver Figura 2).

El NAcc, además, es una interface entre el sistema límbico y motor relacionado con las conductas motivadas y el proceso relacionado con la recompensa. El NAcc es inervado por neuronas dopaminérgicas del VTA y su ablación produce hipofagia, lo que ha sido atribuido a la ausencia de recompensa asociada a la ingesta de alimento (Berridge & Kringelbach, 2015; Castro, Cole, & Berridge, 2015). Se divide principalmente en dos regiones NAcc Shell que representa la

parte ventromedial y NAcc Core que representa la parte dorsolateral. Ambas regiones están diferencialmente involucradas en estados específicos conductuales como la ingesta y la actividad.

Sistema de Recompensa



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 2. Sistema de recompensa. Esquema simplificado de las conexiones dopaminérgicas, glutamatergicas y GABAérgicas aferentes y eferentes del área ventral tegmental (VTA) y núcleo accumbens (NAcc) en el cerebro de ratona. El principal circuito de recompensa incluye las proyecciones dopaminérgicas provenientes del VTA a el NAcc que liberan dopamina en respuesta a los estímulos relacionados con la recompensa. Así mismo, hay proyecciones GABAérgicas del NAcc al VTA. El NAcc recibe inervaciones glutamatergicas de la CPF, hipocampo (Hipp) y amígdala. El VTA también recibe proyecciones glutamatergicas del hipotálamo lateral y habenula (LHb) (Modificado de Russo & Nestler, 2014).

El NAcc Core proyecta hacia la CPF (región prefrontal) así como a la BLA (Murray et al., 2015a), este circuito está implicado en el *craving*, la anticipación y la búsqueda del reforzador por lo que se ha relacionado con el “*wanting*”: lo quiero lo busco (Koob & Volkow, 2016; Berridge & Robinson, 2016). La iniciación de la búsqueda de la recompensa es una conducta dirigida a un objetivo que depende de la conexión funcional entre la amígdala basolateral y el NAcc Core; así mismo, esta interacción es necesaria para la adquisición del comportamiento de búsqueda voluntaria del reforzador controlada por señales (Murray et al., 2015a).

Por su parte, el NAcc Shell está implicado con el sistema límbico, sus proyecciones eferentes están estrechamente relacionadas con la salida de estructuras límbicas como el VTA, amígdala y el hipotálamo lateral por lo que está más relacionado con el “liking”: me gusta (Castro et al., 2015; Berridge & Robinson, 2016).

El consumo repetido de drogas de abuso y recompensas naturales (como el alimento) puede llevar a adaptaciones en las neuronas dopaminérgicas y sus conexiones, para facilitar su búsqueda y consumo, lo cual produce un escalamiento en el consumo y promueve la conducta compulsiva (Sharma et al., 2013).

La plasticidad sináptica es necesaria para las adaptaciones que resultan de la respuesta a una amplia gama de estímulos ambientales. Por lo cual, la plasticidad sináptica en el sistema de recompensa es una pieza para el desarrollo de cambios conductuales y neuronales a largo plazo, involucrados en el consumo y búsqueda persistente de drogas de abuso, así como de alimento apetitoso (Malenka & Kauer, 2007; Barker & Ullian, 2010).

ΔFosB como factor de transcripción de cambios plásticos en el sistema de recompensa

Las principales adaptaciones neuronales del sistema mesocorticolímbico incluyen alteraciones en regiones específicas de la expresión génica, incluyendo la activación y supresión de los factores de transcripción como ΔFOSB (Sharma et al., 2013).

La regulación de la expresión génica es un mecanismo importante por el cual la exposición crónica a una droga de abuso causa cambios duraderos en el cerebro para promover un estado de adicción (Robison & Nestler, 2011; Volkow & Morales, 2015). Se propone que estos cambios moleculares podrían ser el nexo entre los cambios conductuales y el desarrollo de conductas compulsivas ante el consumo de drogas de abuso y de alimento altamente reforzante (Nestler, 2008; Volkow et al., 2013).

El mecanismo clásico para la regulación de la expresión de genes es a través de la acción de los factores de transcripción: proteínas que, en respuesta a las vías de señalización celulares, se unen a secuencias específicas de ADN (generalmente en las regiones promotoras o activadoras de genes diana) y aumentan o reprimen la expresión de estos genes mediante la promoción o el bloqueo del reclutamiento del complejo transcripcional RNA polimerasa II (Robison & Nestler, 2011). Los factores de transcripción son parte de grandes complejos de proteínas, cuyos mecanismos de acción eventualmente implican alteraciones en la estructura de la cromatina (Robison & Nestler, 2011; Nestler, 2008). Aunque las neuronas poseen cientos de factores de transcripción, los estudios de las adaptaciones inducidas por drogas de abuso se han centrado en un pequeño subconjunto entre los cuales se encuentra el factor de transcripción Δ FOSB.

Δ FOSB es codificado por el gen *FosB* y comparte homología con otros factores de transcripción de la familia FOS. Se heterodimeriza con proteínas de la familia JUN para formar la proteína activadora AP-1 (también conocida como factor de transcripción AP-1) complejo que se une a los sitios AP-1 de los genes responsivos para regular su transcripción. Sin embargo, todas las proteínas de la familia FOSB son inducidas de forma transitoria por la exposición aguda a drogas. Ante la administración crónica, de casi cualquier droga de abuso, se induce una expresión de larga duración específicamente de Δ FOSB. (Perrotti et al., 2009; Nestler, 2008; Robison & Nestler, 2011). La estabilidad regulada intrínseca de la proteína es una característica importante, ya que proporciona un mecanismo molecular por el cual los cambios inducidos por las drogas de abuso pueden persistir durante semanas después de que la ingesta de la droga se detiene (Madsen, Brown, & Lawrence, 2012).

Este proceso suele ser más pronunciado en el NAcc y el estriado dorsal, aunque también se ha observado en otras áreas cerebrales relacionadas con la recompensa como la CPF. La inducción de Δ FOSB en el NAcc y el estriado dorsal por drogas de abuso ocurre particularmente en el subtipo de neuronas espinosas

medianas (MSNs, por sus siglas en inglés) que expresan receptores a dopamina D1 (Robison & Nestler, 2011).

Δ FOSB es activador transcripcional de dos genes relacionados con procesos plásticos neuronales: la cinasa-5 dependiente de ciclina (Cdk5) y su cofactor P35 (McClung & Nestler, 2003). Su expresión se relaciona directamente con los cambios en el estado de fosforilación de numerosas proteínas sinápticas incluyendo subunidades de receptores a glutamato, así como en el incremento de espinas dendríticas en el NAcc, y se asocia directamente con las alteraciones conductuales dados por la cocaína (Robinson & Kolb, 2004; Nestler, 2008).

El factor nuclear- κ B, es otro factor de transcripción que podría estar regulado por Δ FOSB. Es inducido y activado rápidamente por diversos estímulos y está relacionado a cambios plásticos sinápticos y de memoria por administración repetida de cocaína. Este factor promueve el aumento de la densidad dendrítica de las neuronas MSNs del NAcc y la sensibilización a los efectos reforzantes de la droga (Robison & Nestler, 2011).

En modelos animales, la sobreexpresión de Δ FOSB en las neuronas espinosas medianas del NAcc y del estriado dorsal se asocia a la sensibilización locomotora a la cocaína, el incremento en el condicionamiento de preferencia de lugar y el incremento en la autoadministración (Madsen et al., 2012; Lobo et al., 2013).

La exposición a diferentes drogas de abuso como la cocaína, morfina, canabinoides y etanol, inducen la expresión de Δ FOSB, a diferentes magnitudes, en el núcleo accumbens, en el estriado dorsal, así como en la corteza prefrontal, amígdala, hipocampo y núcleo de la cama de la estría terminal. En la corteza orbitofrontal, una subregión de la corteza prefrontal, Δ FOSB se ha relacionado con la conducta compulsiva e impulsiva característica de un estado adictivo (Madsen et al., 2013; Nestler, 2008). Así mismo, Δ FOSB es inducido en las MSNs que expresan el receptor D1 ante el consumo de diversos reforzadores naturales incluyendo la sacarosa, los alimentos altos en grasa, el sexo y el ejercicio. Esto implica que este factor de transcripción también está involucrado en la regulación de los reforzadores naturales bajo condiciones normales y durante estados

patológicos de ingesta compulsiva (Nestler, 2008; Madsen et al., 2012; Robinson & Kolb, 2004; Sharma et al., 2013; Alonso-Alonso et al., 2015). En ratones que sobreexpresan Δ FOSB se observa una disminución en la producción de dopamina en el mesencéfalo que proyecta al estriado, por lo cual demuestra que el aumento de Δ FOSB, en el sistema de recompensa, incrementa el valor reforzante de la comida, el consumo de alimentos ricos en grasa y/o azúcar para restablecer los niveles de dopamina (Teegarden, Nestler, & Bale, 2008) (Ver Figura 3).

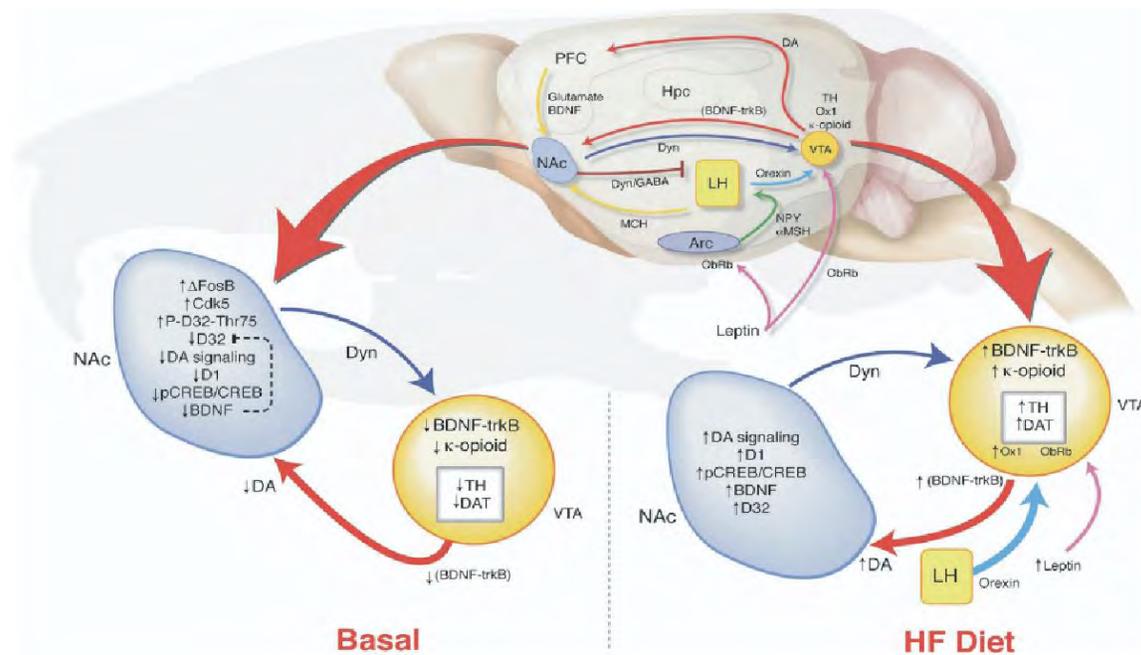


Figura 3. La dieta alta en grasas (HF) normaliza la señalización dopaminérgica asociada a la recompensa ante la sobreexpresión de Δ FOSB. Bajo condiciones basales de sobreexpresión a largo plazo Δ FOSB conduce a la desregulación dopaminérgica (DA) y la expresión génica en el núcleo accumbens (NAcc) alterando la retroalimentación del área ventral tegmental (VTA). La exposición a HF conduce a la normalización de la señal de DA en el NAcc y el VTA. Tomado de **Teegarden, Nestler, & Bale, 2009.**

Los astrocitos como apoyo estructural en los cambios plásticos

La proteína ácida glial fibrilar (GFAP) forma parte de los filamentos intermedios, expresada en diversos tipos celulares en el sistema nervioso central incluyendo los astrocitos (Sofroniew & Vinters, 2010). Los astrocitos desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la función homeostática cerebral incluyendo

el soporte estructural, metabólico y en el mantenimiento homeostático del medio extracelular de las neuronas; proporcionan un microambiente controlado donde los niveles de neurotransmisores pueden ser regulados mediante su recaptura, impidiendo la activación de otras sinapsis o receptores extrasinápticos (Barker & Ullian, 2010; Pirttimaki & Parri, 2013). Los astrocitos también participan de forma directa en la transmisión sináptica a través de la liberación regulada de moléculas sinápticamente activas incluyendo glutamato, purinas, GABA y D-serina (gliotransmisores) en respuesta a cambios en la actividad neuronal. La liberación de gliotransmisores implica que los astrocitos tienen excitabilidad reflejada en el incremento de calcio (Ca^{++}) intracelular y que a su vez puede modificar la excitabilidad neuronal (Perez-Alvarez, Navarrete, Covelo, Martin, & Araque, 2014; Rossi, 2012).

Además de tener un efecto directo sobre la actividad sináptica por medio de la liberación de “gliotransmisores”, los astrocitos favorecen cambios a largo plazo en la función sináptica a través de la liberación de factores de crecimiento y otras moléculas relacionadas, controlan el número y la fuerza de las sinapsis de una neurona y por tanto contribuyen a los mecanismos subyacentes a la plasticidad sináptica (Valtcheva & Venance, 2016; Perez-Alvarez et al., 2014) (Figura 4).

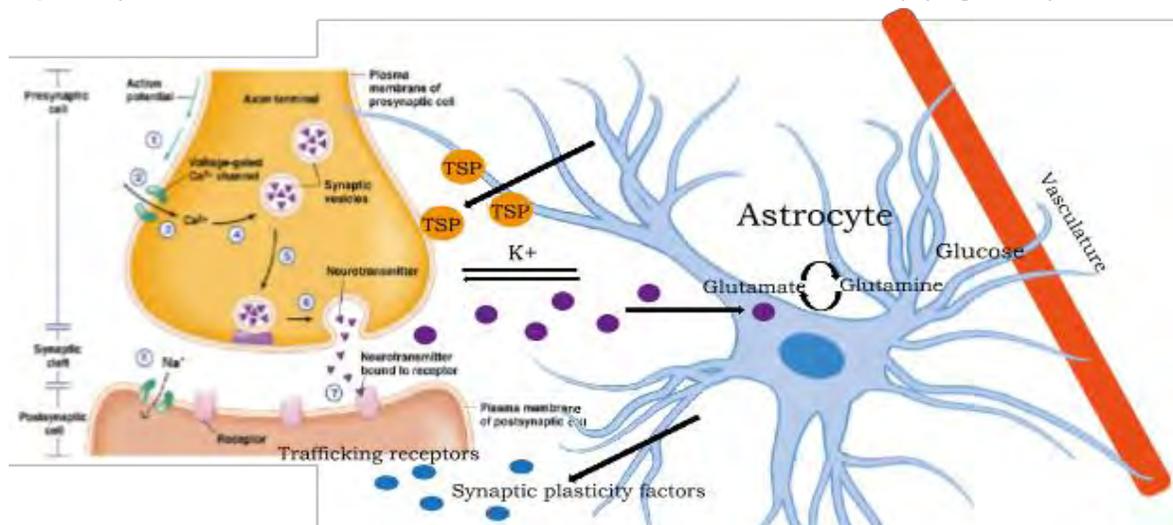


Figura 4. Además de un soporte metabólico (como el reciclamiento de glutamato y la homeostasis iónica), los astrocitos liberan factores que contribuyen a la formación de sinapsis. La trombospondina (TSP, por sus siglas en inglés) actúa a través de los mecanismos de la pre-sinapsis para incrementarlas en número. La liberación de determinados factores de crecimiento puede incrementar la inserción de receptores para el fortalecimiento de la sinapsis. Modificado de Barker & Ullian, 2010.

Las adaptaciones de los astrocitos son comúnmente visualizadas mediante la inmunoreactividad de la proteína GFAP de los filamentos estructurales. Se ha observado que la expresión total y el número de células que expresan GFAP incrementa en el núcleo NAcc después de la administración repetida de cocaína (Bull et al., 2014; Bowers & Kalivas, 2003). Adicionalmente, ratas que han tenido acceso a una autoadministración de morfina sobre-expresan GFAP en el VTA.

En la corteza prefrontal de ratas que muestran una alta preferencia por el consumo de etanol, la densidad de astrocitos fue baja, indicando la importancia del funcionamiento de los astrocitos en la modulación de la respuesta conductual a estímulos reforzantes (Bull et al., 2014; Wang et al., 2017; Valtcheva & Venance, 2016). Durante la sensibilización locomotora ante la administración repetida de metanfetaminas en ratas, se observa un incremento en los niveles de expresión de GFAP en el NAcc y en la corteza del cíngulo (Narita, Suzuki, Kuzumaki, Miyatake, & Suzuki, 2008; Bull et al., 2014).

En cuanto al consumo de alimentos altos en grasa y azúcares, se ha demostrado que la exposición a una dieta alta en grasa, en roedores, resulta en una mayor ganancia de peso así como en un incremento en respuesta inflamatoria central y un incremento en la activación de los astrocitos, principalmente en núcleos hipotalámicos involucrados en la ingesta de alimento como el núcleo arqueado y el núcleo dorsomedial, lo cual se ha asociado con la modulación de la organización sináptica en estos núcleos (Buckman et al., 2015). Este incremento en la activación de los astrocitos sugiere la contribución de estas células en la regulación de la conducta de ingesta y el balance homeostático ante el consumo de alimento “sabroso” (Argente-Arizón, Guerra-Cantera, Garcia-Segura, Argente, & Chowen, 2016).

Como se ha mencionado, diversos estudios han indicado que el valor reforzante de los alimentos, como la dieta alta en grasa, está controlado por el sistema de recompensa; sin embargo, se ha demostrado que el desarrollo de esta preferencia requiere de la activación de los astrocitos hipotalámicos (a través de la activación los receptores a cannabinoides tipo 1, CB1) (Argente-Arizón et al., 2016). Por otro

lado, la activación de los astrocitos está involucrada con una respuesta inflamatoria ante el consumo de dietas altas en grasa, asociado a la disminución en las funciones cognitivas y un decremento específico de espinas dendríticas en la CPF, que podría ser consecuencia del incremento del estrés oxidativo producido por el consumo de este tipo de dietas (White et al., 2009; Duthheil, Ota, Wohleb, Rasmussen, & Duman, 2015).

Por lo anterior, es evidente que la función de los astrocitos es compleja y que participan tanto en funciones de plasticidad sináptica, como en funciones inflamatorias y de deterioro neuronal (John Lin et al., 2017). Por ello, la contribución de los astrocitos en el sistema de recompensa ante el consumo de alimento “sabroso” requiere ser evaluada para conocer si los cambios en la presencia o número de astrocitos en estas áreas pueden contribuir de igual forma que, en las drogas de abuso, a los cambios conductuales subyacentes a su consumo.

El acceso restringido a alimento como factor desencadenante del consumo compulsivo de alimentos altamente reforzantes

El control homeostático a corto plazo de la ingesta de alimento es esencial para la supervivencia animal. Además de los circuitos homeostático los efectos reforzantes del alimento modulan la ingestión y la conducta de búsqueda (Morin et al., 2017).

La conducta de ingesta depende de ciclos circadianos, ya que las fuentes de alimento varían a lo largo del día. Por ello, los animales requieren conocer en donde y estimar a qué hora van a encontrar el alimento. Esta capacidad de estimar el tiempo lleva a los animales a tener la posibilidad de anticiparse ante la disponibilidad del alimento, es decir, conlleva a una preparación fisiológica y conductual (Escobar et al., 2011). De tal manera, la hora en que está disponible el alimento se convierte en una potente señal de tiempo para el sistema circadiano, la cual es capaz de sincronizarlo, así como de anular las señales temporales transmitidas por el núcleo supraquiasmático, quien principalmente se sincroniza por el ciclo luz/obscuridad.

El efecto sincronizador del alimento se hace más potente cuando se restringe el acceso de alimento a una ventana temporal reducida (de 2 o 3 horas) y en la fase de reposo. Este protocolo demuestra que la hora del alimento modifica la organización temporal y aumenta la activación en horas normalmente de reposo. En la conducta se desarrolla actividad anticipatoria, que se compone de una activación e incremento de la actividad locomotora, así como conductas exploratorias y un incremento de conductas instrumentales, como el palanqueo, para obtener el alimento. Estos cambios se acompañan de cambios en la temperatura corporal y aumento de corticosterona (Van der Vinne et al., 2015).

A nivel cerebral, se observa que pocas horas antes del acceso al alimento, cuando los roedores exhiben actividad anticipatoria, diversos núcleos hipotalámicos involucrados en el balance energético muestran un incremento en la actividad neuronal. Este aumento de activación se observa también en estructuras límbicas involucradas en la respuesta motivacional y de recompensa (Angeles-Castellanos, Mendoza, Diaz-Munoz & Escobar, 2005; Angeles-Castellanos, Aguilar-Roblero, & Escobar, 2004; Ángeles-Castellanos et al., 2008). Demostrando que para las adaptaciones conductuales, neuronales y fisiológicas que permiten al animal prepararse para la llegada del alimento el sistema homeostático y el sistema de motivación-recompensa tienen un papel importante.

Lo anterior, resalta la importancia de la disponibilidad del alimento para inducir actividad anticipatoria en respuesta a un balance energético negativo, como mecanismo para mantener la homeostasis energética. Diversos estudios sugieren que los animales y quizás las personas también pueden anticipar el acceso a una droga de abuso (Jansen, Sergeeva, Stark & Sorg, 2012; Webb, 2017) y que también se pudiera anticipar al acceso de alimento apetitoso. En roedores se ha observado que el acceso restringido y programado a la misma hora de un alimento sabroso (5gr de chocolate), sin restricción de alimento, genera expectancia y actividad anticipatoria 15-30 minutos antes del acceso. Lo que sugiere una gran dependencia del tiempo para la motivación y búsqueda del alimento placentero. Este efecto es selectivo de áreas corticolímbicas

involucradas en la regulación de la motivación y recompensa que no dependen del sistema homeostático energético (Ángeles-Castellanos et al., 2008; van der Vinne et al., 2015).

Por lo anterior, las propiedades reforzantes del chocolate pueden ser la fuerza impulsora que comienza las oscilaciones y producen la expectancia y anticipación. Esto podría sugerir que la activación diaria y de la conducta de búsqueda pueden ser el resultado de mecanismos similares a los subyacentes al consumo de drogas de abuso (Jansen, Sergeeva, Stark, & Sorg, 2012; Ángeles-Castellanos et al., 2008; Blancas et al., 2014; Angeles-Castellanos, Mendoza & Escobar, 2007; Mendoza, Angeles-Castellanos & Escobar, 2005).

Factores como el valor hedónico y nutrimental de la comida son relevantes para la sincronización. El acceso diario a un alimento sabroso sin privación de alimento puede llevar a la disociación entre la influencia motivacional y la activación metabólica homeostática (Van der Vinne et al., 2015).

Muchos núcleos del sistema límbico están involucrados con la valencia positiva del valor hedónico del alimento. En ratas, la corteza prefrontal responde a la valencia positiva del alimento, así mismo la amígdala y sus conexiones anatómicas con el circuito neural hipotalámico para el control de la ingesta. El NAcc se considera la interface entre el sistema límbico y motor que regula las propiedades reforzantes en la conducta de ingesta (Ángeles-Castellanos et al., 2008), mostrando un papel claro en los mecanismos motivacionales involucrados en la anticipación a los estímulos reforzantes (Ángeles-Castellanos et al., 2008; Mendoza et al., 2005; Blancas et al., 2014).

Los patrones de alimentación son una variable importante implicada en el sobreconsumo de alimento “sabroso” alto en grasa y/o azúcares. Se ha reportado que el sobreconsumo de alimentos energéticamente densos promueve conductas motivadas por obtener el alimento y que la restricción puede estimular la motivación y un consumo similar al atracón. Por lo tanto, estos dos estados fisiológicos, aparentemente opuestos, son capaces de promover conductas similares al consumo compulsivo de alimento “sabroso”. Las implicaciones de

estos resultados son que el patrón de consumo, antes o después de la obesidad, puede provocar cambios duraderos en el sistema nervioso central y en el comportamiento que promuevan la alimentación en ausencia de una necesidad calórica (Van der Vinne et al., 2015; Sirohi, Van Cleef, & Davis, 2016).

JUSTIFICACIÓN

El consumo excesivo de alimentos con alto contenido en grasas y azúcar (que suelen ser altamente reforzantes y que ofrecen un bajo valor nutricional), disminuye la calidad de la salud en los individuos. Hay que resaltar que las tasas actuales de sobrepeso y obesidad son altas, sugiriendo que dichos patrones conductuales de alimentación pueden ser resistentes al cambio (Murray et al., 2015b), produciendo estados patológicos de consumo que inciden en la salud de los individuos.

Por lo cual, consideramos importante el comprender los mecanismos que subyacen al consumo no homeostático de alimento apetitoso, con alto contenido en grasas y azúcar (regulado por el sistema de recompensa) y su capacidad para interferir con las señales homeostáticas. Particularmente los patrones de consumo aunados a una alta disponibilidad de estos alimentos, pueden ser factores desencadenantes de conductas de consumo compulsivo y de cambios plásticos neuronales y conductuales similares a los observados ante el consumo de drogas de abuso.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las drogas de abuso y los alimentos con alto contenido en grasa y azúcar impactan sobre las mismas regiones cerebrales implicadas en la modulación de la motivación y el valor reforzante de los estímulos.

Si bien, las drogas pueden generar cambios plásticos neuronales en el sistema de recompensa a través de la expresión de factores de transcripción como lo es Δ FOSB, el alimento altamente reforzante podría tener un impacto similar llevando a estados conductuales similares de un estado adictivo: como la búsqueda, la

anticipación, el consumo excesivo (atracción) y el esfuerzo por obtenerlo (Rogers, 2017).

En nuestro grupo, encabezado por la Dra. Carolina Escobar, se ha demostrado que el acceso diario y restringido de chocolate, que es un alimento sabroso, rico en grasa y azúcar, puede inducir conductas de esfuerzo por obtenerlo, conductas de anticipación, así como un incremento de la actividad neuronal en áreas corticolímbicas (Blancas et al., 2014; Mendoza et al., 2005; Escobar et al., 2011). Estos cambios pueden derivarse de adaptaciones conductuales y neuronales, que modulan los procesos de motivación y recompensa asociados a un sistema de medición del tiempo, que dependa del patrón de acceso al alimento sabroso.

El propósito de esta investigación fue determinar si el acceso restringido de alimento reforzante (chocolate) es necesario para inducir conductas de anticipación, esfuerzo y atracción, así como cambios plásticos en estructuras corticolímbicas (acumulación de Δ FOSB y aumento de GFAP) que subyazcan al cambio conductual.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar cambios conductuales y un aumento en expresión de Δ FOSB y GFAP, como indicadores de plasticidad neuronal en ratas expuestas diariamente a distintos patrones de acceso a chocolate: acceso restringido y programado, acceso restringido en horarios aleatorios o *ad libitum*.

Objetivos específicos:

Estudiar:

La anticipación de actividad locomotora en ratas expuestas a distintos patrones de acceso al chocolate.

Los cambios en el patrón diario de temperatura asociados al consumo diario de chocolate

La expresión de conductas de esfuerzo y atracón en ratas expuestas a distintos patrones de acceso al chocolate.

Los cambios en la expresión de la proteína Δ FosB en el núcleo accumbens, corteza prefrontal y amígdala basolateral en ratas expuestas a distintos patrones de acceso al chocolate.

La existencia de una mayor expresión de la proteína GFAP en el núcleo accumbens y corteza prefrontal en ratas expuestas a distintos patrones de acceso al chocolate.

HIPÓTESIS

Hi: El acceso diario restringido y programado a 5gr de chocolate inducirá el desarrollo de actividad locomotora anticipatoria.

Ho: El acceso diario restringido y programado a 5gr de chocolate no inducirá el desarrollo de actividad locomotora anticipatoria.

Hi: El acceso diario restringido y programado a 5gr de chocolate inducirá cambios en la temperatura corporal.

Ho: El acceso diario restringido y programado a 5gr de chocolate no inducirá cambios en la temperatura corporal.

Hi: El acceso diario restringido a 5gr de chocolate inducirá un incremento en las conductas de esfuerzo por obtener el chocolate.

Ho: El acceso diario restringido a 5gr de chocolate no inducirá un incremento en las conductas de esfuerzo por obtener el chocolate.

Hi: El acceso diario restringido a 5gr de chocolate inducirá la conducta de atracón: un sobreconsumo mayor al 20% de su ingesta calórica diaria.

Ho: El acceso diario restringido a 5gr de chocolate no inducirá la conducta de atracón: un sobreconsumo mayor al 20% de su ingesta calórica diaria.

Hi: El acceso diario y restringido a 5gr de chocolate inducirá una mayor expresión de la proteína Δ FosB en la corteza prefrontal, núcleo accumbens y amígdala basolateral.

Ho: El acceso diario y restringido a 5gr de chocolate no inducirá una mayor expresión de la proteína Δ FosB en la corteza prefrontal, núcleo accumbens y amígdala basolateral.

Hi: El acceso diario y restringido a 5gr de chocolate inducirá una mayor expresión de la proteína GFAP en la corteza prefrontal y núcleo accumbens.

Ho: El acceso diario y restringido a 5gr de chocolate no inducirá una mayor expresión de la proteína GFAP en la corteza prefrontal y núcleo accumbens.

Hi: La magnitud de los cambios plásticos reflejará la intensidad del atracón y las conductas de esfuerzo.

Ho: La magnitud de los cambios plásticos no reflejará la intensidad del atracón y las conductas de esfuerzo.

MATERIALES Y METODOS

Sujetos y condiciones generales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 230-260 gr, provenientes del bioterio general de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las ratas fueron mantenidas en el bioterio del Departamento de Anatomía y alojadas en cajas de acrílico individuales (40 x 50 x 20 cm) dentro de roperos con capacidad para 8 animales ubicados en un cuarto de monitoreo conductual y con flujo continuo de aire. Los sujetos se mantuvieron bajo un ciclo de luz/obscuridad 12/12 (encendido de la luz a las 7:00 horas) con temperatura regulada (23 ± 1.5 C°), comida chow estándar (Rodent Laboratory Chow 3.06 Kcal/g) y agua *ad libitum*.

La manipulación de los animales se realizó bajo las normas de uso de animales de experimentación según el decreto de la ley de protección a los animales del Distrito Federal, publicada en la Gaceta Oficial del Distrito Federal 26/02/02. El

presente proyecto de investigación fue aprobado por la Comisión de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM con el número de registro 157/2014.

Diseño Experimental

Los sujetos fueron asignados de manera aleatoria a uno de 4 grupos: (1) Control: ratas con acceso a alimento chow y agua *ad libitum*; (2) Chocolate *ad libitum* (CH-ADLIB): ratas con acceso a alimento chow, agua y chocolate *ad libitum* por 21 días; (3) Chocolate Aleatorio (CH-ALE): Ratas con acceso a alimento chow y agua *ad libitum* y con acceso a 5 g de chocolate diariamente por 21 días en una hora aleatoria; (4) Sincronización al chocolate (CH-SINC): Ratas con acceso a alimento chow y agua *ad libitum* y acceso a 5 g de chocolate diariamente programado a la misma hora (13:00 h) por 21 días. Cada pieza de chocolate (chocolate Kínder maxi™; 5 g contiene 28.6 Kcal, 10.3% proteínas, 54.2% carbohidratos y 35.5% grasa) se proporcionó en la parte izquierda de las cajas individuales de los sujetos, sin tiempo límite de consumo. El penúltimo día de acceso aleatorio para el grupo CH-ALE fue programado a las 13:00 pm para realizar un análisis temporal equitativo. Las ratas de los grupos CH-ALE y CH-SINC se dividieron en dos subgrupos para el sacrificio, 1 h antes de la ingestión de los 5 g de chocolate (12:00 horas) y el otro subgrupo 1 h después del consumo (14:00 horas). Los sujetos de los otros dos grupos se sacrificaron a las 13:00 horas.

Actividad general

Los sujetos experimentales (n=8 para todos los grupos) se alojaron en cajas individuales de acrílico transparente y colocados en lockers con 8 compartimentos que cuentan con una placa con sensores de movimiento los cuales se ubican debajo de la caja. Los sensores registran la actividad locomotora continuamente durante todo el día. Las cuentas de movimiento se almacenan automáticamente cada minuto en una PC para su posterior análisis en el programa SPAD9 (Omniaiva México SA de CV) basado en Matlab. Los datos son representados cualitativamente en histogramas, los cuales son organizados horizontalmente cada 24 horas, un día debajo de otro, permitiendo la visualización del patrón de

actividad locomotora diaria, dicho grafico es conocido como actograma. Los actogramas son colocados en doble gráfica (dos días continuos) con la finalidad de observar mejor el patrón circadiano de la actividad locomotora general.

Los datos obtenidos por el sistema de registro son normalizados en porcentaje de la actividad diaria, debido a la diferencia en el umbral de detección de los sensores. Todos los sujetos experimentales tuvieron una línea base para establecer el patrón normal de actividad locomotora sin exposición al chocolate. Posterior a este periodo se sometió a cada grupo a su respectivo protocolo de acceso a chocolate por 3 semanas (21 días).

Para la visualización del patrón temporal de actividad en 24 horas, para cada semana del experimento, se elaboraron perfiles de actividad obteniendo el promedio de 8 ratas para cada 15 minutos de los 7 días de cada semana. La última semana de exposición al chocolate se realizó un análisis más fino de la actividad locomotora para determinar la intensidad de la conducta de anticipación. Se determinó la cantidad de actividad / hora de cada sujeto, para las 6 horas previas de acceso al chocolate (según el horario del grupo CH-SINC; 7 am a 13:00 horas). Se obtuvo un promedio \pm error estándar para cada grupo.

Para observar la intensidad de la actividad anticipatoria a lo largo de las 3 semanas de exposición al chocolate para cada grupo experimental se realizó un análisis semanal del cambio de la actividad locomotora en la fase de luz con respecto a la Línea Base (Δ). Las comparaciones se realizaron de forma intergrupar. Para alinear temporalmente la respuesta al chocolate, el penúltimo día de acceso aleatorio para el grupo CH-ALE fue programado a las 13:00 horas y el último día de acceso al chocolate. Se realizó un análisis de la actividad 30 min y 60 min antes y después del acceso al chocolate (12:00, 12:30, 13:00, 13:30, 14:00).

Monitoreo de la temperatura corporal

Para el monitoreo de la temperatura corporal antes de iniciar la línea base, a 8 ratas de cada grupo se les implantó un sensor de temperatura iButton (iButton

Sensor-Temperature Logger; Maxim Integrated Products, Dallas, Semiconductor, USA) en la cavidad intraperitoneal. Los sensores fueron programados para coleccionar los datos de temperatura corporal cada 30 min durante todo el experimento.

Para la implantación del sensor, los animales fueron anestesiados con una administración intramuscular de Xilazina (Procin 0.01ml/100g de acuerdo al peso corporal) y ketamina (Inoketam 0.02mL/100g de acuerdo al peso corporal). Se realizó una incisión en la cavidad abdominal de 1.5 cm a 2 cm para la inserción del sensor previamente esterilizado (5 min en alcohol más 5 min en gentamicina). Los músculos anteriores abdominales fueron suturados con *catgout*, hilo absorbente, la piel fue suturada con hilo seda (triple 000). Terminada la cirugía se limpió el área con un microbicida (isodine). Todos los animales estuvieron bajo un periodo de recuperación de 3 días. Finalizados los experimentos los sensores fueron extraídos posterior a la perfusión.

Se elaboraron perfiles de temperatura por cada semana, obteniendo el promedio de 8 ratas por grupo cada 30 min. Para la semana 3 del protocolo se realizó un análisis más específico para determinar cambios asociados con la anticipación, para ello se obtuvo el promedio por hora de la temperatura corporal 6 horas antes de las 13:00 (horario de acceso al chocolate para el grupo CH-SINC) para todos los grupos. Los promedios de temperatura fueron comparados de forma intergrupala.

Para observar los cambios en la temperatura corporal asociados al consumo de chocolate a lo largo de las 3 semanas de exposición se realizó un análisis semanal del cambio de la temperatura corporal en la fase de luz con respecto a la Línea Base (Δ) de cada grupo experimental, las comparaciones se realizaron de manera intergrupala.

Finalmente, para describir los cambios en la temperatura corporal asociados a la restricción a 5 gr de chocolate, se realizó un análisis del último día de acceso, en el cual ambos grupos restringidos (CH-SINC Y CH-ALE) recibieron el chocolate a las 13:00 horas. Para ello se obtuvo el promedio de la temperatura corporal una

hora antes del acceso y una hora después del acceso, cada 30 min (12:00,12:30, 13:00, 13:30, 14:00). Las comparaciones se realizaron entre los grupos.

Evaluación de la motivación y esfuerzo por obtener el chocolate

Para el análisis conductual de la motivación y esfuerzo por obtener el chocolate se expuso individualmente a cada sujeto experimental (n=9 por grupo) durante 5 min (13:00) a una caja de malla sellada que contenía 5 g de chocolate. Para el análisis de la prueba conductual se filmó individualmente a cada sujeto. La prueba se llevó a cabo en dos fases experimentales, en el día 20 y 21 de acceso al chocolate.

La caja de malla (5 cm x cm por 5 mm x 5 mm de orificios) permite a los animales ver y oler el chocolate, pero no tocarlo ni morderlo (Valdés, 2010). La caja fue introducida a las 12:50 en cada caja habitación por 5 min y después fue retirada.

Al día 20 de acceso a chocolate los sujetos fueron expuestos a una caja de malla vacía. Al día 21 de acceso al chocolate todos los grupos fueron nuevamente evaluados, pero ante la exposición de la caja de malla con chocolate.

Las grabaciones fueron analizadas con una estrategia de muestreo instantáneo (Blancas, et al., 2014), para contar las conductas de interacción y esfuerzo dirigidas a la caja y para obtener el chocolate. Para el método de muestreo instantáneo los videos fueron divididos en fragmentos de 5 s y la conducta observada al corte de los 5 s fue registrada, con esta estrategia se obtuvieron un total de 60 muestras conductuales durante el intervalo de 5 min. El esfuerzo y motivación por obtener el chocolate fue determinado por el conteo del número de contactos y manipulaciones con la caja de acuerdo al siguiente catálogo conductual (Blancas, et. al., 2014):

Tabla1. Catalogo conductual de los indicadores a evaluar durante la exposición a una caja de malla con o sin chocolate.

Categoría	Indicador conductual
<ul style="list-style-type: none"> • Esfuerzo 	<ul style="list-style-type: none"> • Empujar la caja • Girar a caja • Morder la caja • Subirse a la caja
<ul style="list-style-type: none"> • Interacción pasiva 	<ul style="list-style-type: none"> • Olfatear la caja • Contacto con las patas
<ul style="list-style-type: none"> • Ansiedad 	<ul style="list-style-type: none"> • Acicalarse • Enterrarse en el aserrín • Escarbar en el aserrín
<ul style="list-style-type: none"> • Exploración 	<ul style="list-style-type: none"> • Caminar • Explorar en dos patas • Olfatear (horizontal y vertical)
<ul style="list-style-type: none"> • Inmóvil 	<ul style="list-style-type: none"> • Quieta

Los eventos fueron representados en medianas para cada grupo y las comparaciones fueron realizadas de forma intergrupar. El número de eventos obtenidos en la fase de exposición a la caja vacía fue restado al número de eventos obtenidos en fase de exposición a la caja con chocolate (Δ), con el objetivo de analizar únicamente las conductas dirigidas a la obtención del chocolate, por lo cual los valores positivos indicaran mayores niveles del indicador conductual durante la fase “caja con chocolate” mientras que los valores negativos indicaron mayores niveles del indicador conductual durante la fase “caja vacía”.

Medición de atracón (*Binge Eating*)

En esta prueba experimental fueron utilizados una serie diferente de ratas bajo las mismas condiciones experimentales. Al final de cada semana del protocolo, todos los grupos experimentales tuvieron una hora de acceso (13:00-14:00 h) a

chocolate (21 gr/118 Kcal) el cual fue colocado sobre el comedero de su caja habitación. Para que en todos los grupos fuera un evento de administración del estímulo, para el grupo CH-ADLIB el chocolate fue retirado el día previo a la prueba. Posteriormente, se determinó la cantidad de chocolate ingerido, en kilocalorías, en una hora. Se estableció como criterio el 20% del consumo kilocalórico diario, para considerar un sobreconsumo en un corto periodo de tiempo. Las comparaciones se realizaron de forma intragrupal.

Análisis Neuronal

Posterior al día 21 de acceso al chocolate se obtuvieron los cerebros para la realización de inmunohistoquímica (n=6). Todos los grupos fueron divididos en dos subgrupos para ser sacrificados en dos puntos temporales: 12:00 h (antes del acceso al chocolate; (n=3 por grupo) y 14:00 (después del acceso al chocolate n=3 por grupo).

Preparación del tejido e inmunohistoquímica

Perfusión y extracción del cerebro

Las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital (pisabental; 1.5 ml) y perfundidas por vía intracardiaca con 250 ml de solución salina (0.9%) seguida de 250 ml de paraformaldehído al 4% en 0.1 mM de buffer fosfato (PB: pH 7.2) Los cerebros fueron removidos y postfijados por 48 horas en paraformaldehído a una temperatura de 4°C y crioprottegidos en una solución de sacarosa al 30% por una semana. Posteriormente los cerebros fueron cortados en secciones de 40 µm por medio de un criostato a una temperatura de -18 ± 1 °C. Las secciones cerebrales fueron recolectadas en 4 series anteroposteriores en pozos con solución buffer fosfato al 0.1 Mm y 7.2 pH (PBS).

Inmunohistoquímica para Δ FosB y la proteína GFAP

Una de las series anteroposteriores de cada cerebro se incubó por 72 h en el anticuerpo primario policlonal Δ FosB/FosB (anti FosB hecho en rabbit; Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX, USA) diluido a una concentración 1:1500 µl en Supermix (PBS, gelatina al 0.25% y tritón al 0.5%). Otra serie anteroposterior fue

incubada con el anticuerpo primario monoclonal GFAP (anti GFAP hecho en mouse; Millipore). Posterior al tiempo de incubación, los cortes fueron lavados 3 veces por 10 minutos con PBS y fueron colocados en el anticuerpo secundario anti-rabbit y anti-mouse (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a una dilución de 5:1000 μ l en Supermix durante 90 min. Posteriormente, se lavaron los cortes 3 veces por 10 min cada uno y se incubaron por 90 min en el complejo AB (avidina-biotina; Vector Laboratories Inc.) a una dilución de 9:1000 μ l cada uno. Después de este periodo el tejido fue lavado nuevamente con PBS para colorear la reacción con el cromógeno diaminobenzidina diluido en una solución de Trizma (pH 7.2) en concentración de 5 mg/1 ml y 35 μ l de peróxido de hidrogeno (H_2O_2 al 30% por cada 100 ml) durante 10 minutos. Una vez obtenida la tinción, los cortes fueron lavados en PBS.

Los cortes se montaron en portaobjetos gelatinados con una solución de montaje, posteriormente fueron deshidratados en una serie de alcoholes al 70%, 96%, 100% y xileno, se cubrieron con cubreobjetos con medio de montaje Entellan, para sellar los cortes.

Análisis del tejido

Cuantificación de las células inmunopositivas a Δ FosB/FosB

Se seleccionaron los cortes anteriores, mediales y posteriores de todos los núcleos a evaluar con la ayuda del atlas estereotáxico Paxinos y Watson (1998). La corteza prefrontal (PFC) (3.5 mm, 3.2 and 2.5 mm anterior a bregma) Accumbens Core y Shell (1.9, 1.6 and 1.2 mm anterior a bregma) y la amígdala basolateral (BLA) (-1.56 anterior, -1.92 medial, -2.28 posterior a bregma).

Los cortes fueron observados con un microscopio óptico (Leica DM 3000) el cual cuenta con una cámara digital (Leica ICC50 HD) conectada a una PC. Las imágenes fueron capturadas a una magnificación de 20x con el software LAS EZ (Leica Application Suite) y guardadas en formato jpg para su análisis.

Las células inmunopositivas a Δ FosB/FosB fueron cuantificadas automáticamente por medio del software de análisis de imagen Image J Launcher (NIH), definiendo

el fondo de la imagen y el tamaño y circularidad aproximado de los núcleos celulares mediante la herramienta “analyze particles”.

Cuantificación de la expresión de la proteína GFAP

Se seleccionaron los cortes anteriores, mediales y posteriores de la corteza prefrontal y Núcleo Accumbens Core y Shell utilizando las mismas coordenadas antes descritas. Las imágenes fueron capturadas a una magnificación de 20x y guardadas en formato jpg para su análisis. En cada una de las series se estableció un balance de blancos para obtener el mismo fondo en cada imagen. La cuantificación de la expresión de la proteína GFAP se realizó mediante el software de análisis de imagen Image J pro plus 6.0.0.260 (MedianCybernetics, Inc.) utilizando la herramienta *measure > count/size*. Previo a la medición se estableció el color de la imagen (gray scale 8 bits) y la escala espacial (20x) de las imágenes a medir. Posteriormente se estableció un rango de intensidad por medio de la herramienta “Threshold” a considerar para la medición, dicho rango permite seleccionar únicamente las marcas correspondientes a GFAP. El rango fue establecido para todos los grupos.

Análisis Estadístico

Actividad y temperatura corporal

Se aplicó una ANOVA de dos vías de medidas repetidas para los factores: condición (4 grupos) y hora (6 puntos temporales antes de las 13:00 horas). Para las comparaciones del Δ de cambio se realizó una ANOVA de medidas repetidas para los factores: tiempo (LB, 1 semana, 2 semana y 3 semana) en cada condición. Para la evaluación de la respuesta al chocolate en el último día de acceso se aplicó una ANOVA de dos vías de medidas repetidas para los factores: condición (grupos) y tiempo (1 hora antes y después de las 13 horas, en bloques de 30 min.). Las comparaciones múltiples se realizaron por medio de la prueba *post hoc* de Tukey.

Conductas de esfuerzo

Para el análisis de la prueba conductual se realizó la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis utilizada para el análisis de varianza de rangos, con los factores: condición (4 grupos) y la fase del experimento (caja vacía o llena durante el día 20 y el día 21). Las comparaciones múltiples fueron realizadas por medio de la prueba *post hoc* de Dunn. Las evaluaciones estadísticas de los datos conductuales se realizaron con el software Graph Prism 6.

Medición de atracón (Binge Eating)

Para las comparaciones del consumo de chocolate en un corto periodo de tiempo (1 hora) se utilizó una prueba ANOVA de medidas repetidas con los factores tiempo (LB, 1 semana, 2 semana y 3 semana) para cada grupo. Las comparaciones múltiples fueron realizadas por medio de la prueba *post hoc* de Tukey.

Expresión neuronal de Δ FosB y GFAP en atrociitos

Para ambos marcadores, se utilizó la prueba estadística ANOVA de una sola vía con la variable independiente de condición (4 grupos) y la variable dependiente número de células inmunoreactivas para Δ FosB o número total de cuentas arrojadas por el programa Image J Pro Plus para GFAP.

RESULTADOS

Actividad General

Durante la línea base todos los grupos mostraron un patrón circadiano de actividad definido, es decir, una mayor distribución de la actividad general en la fase de oscuridad (alrededor del 80%) y menor actividad durante la fase de luz (18-20%) (Figura 1, B, D, F y H). Durante la fase experimental de acceso al chocolate todos los grupos conservaron el patrón circadiano de actividad, sin embargo, el grupo chocolate *ad libitum* mostró un incremento de actividad locomotora durante el día alrededor del 22 y 23 % de su actividad total desde la primera semana, lo cual repercutió en un decremento de la actividad nocturna. En

el grupo CH-SINC se observó un incremento de la actividad a la hora de acceso al chocolate desde la primera semana (Figura 1H) y una disminución de la actividad nocturna, así como una breve anticipación mayormente visible en la tercera semana. En contraste, el grupo chocolate aleatorio no desarrolló esta breve anticipación y permaneció con valores similares a la línea base (Figura 1F).

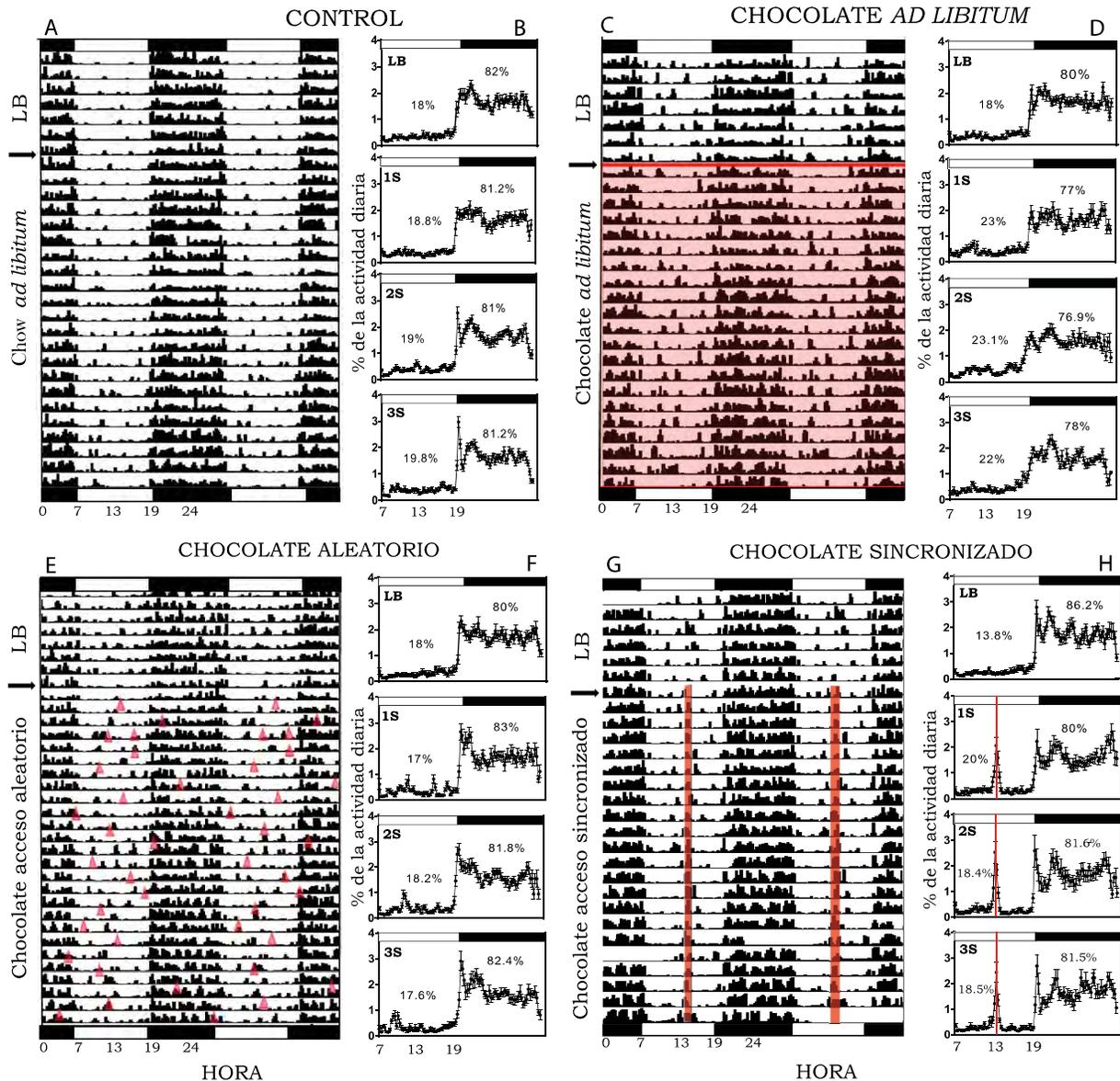


Figura 1. Actogramas en doble representación y perfiles de actividad locomotora semanal. Durante la línea base (LB) y las 3 semanas de acceso al chocolate se observó en todos los grupos un patrón definido de actividad general nocturna. Las barras horizontales negras representan la fase de oscuridad y las barras blancas la fase de luz. Actogramas representativos para el grupo control (A) CH-ADLIB (C); sombreado rojo representa el periodo de acceso *ad libitum* al chocolate, CH-ALE (E); triángulos rojos representan momento de acceso diario a 5g de chocolate, y CH-SINC (G); barras rojas representan al acceso diario restringido a la misma hora (13:00 horas) a 5g de chocolate. Las figuras B, D, F, H representan los perfiles temporales de actividad durante la LB y 3 las semanas del protocolo (n=8; para todos los grupos).

Realizando un análisis fino de la actividad, se observó una anticipación locomotora 1 hora antes del acceso al chocolate durante la tercera semana de acceso para el grupo CH-SINC (Figura 2A). El análisis estadístico ANOVA de dos vías de medidas repetidas indicó una diferencia significativa en la interacción de los factores tiempo x grupo [$F (18, 168) = 12.84, p < 0.0001$] así como para el factor tiempo [$F (6, 168) = 12.92, p < 0.0001$] y el factor grupo [$F (3, 28) = 13.5 p < 0.0001$]. La prueba *post hoc* de Tukey confirmó dichas diferencias entre el grupo sincronizado y todos los grupos en un punto temporal previo al acceso al chocolate para el grupo sincronizado: 12:00 h $p < 0.05$ y a la hora de acceso: 13:00 h $p < 0.05$ (Figura C). Con la finalidad de analizar semanalmente el incremento de la actividad locomotora en la fase de luz como respuesta al chocolate se realizó un análisis de la diferencia de la actividad locomotora total en la fase de luz con respecto a la línea base (Δ). La prueba ANOVA de una sola vía de medidas repetidas no indicó diferencias significativas para el grupo control [$F (1.433, 10.03) = 0.3157, p = 0.6658$] ni para el grupo CH-ALE [$F (1.447, 10.13) = 1.332, p = 0.2937$] con respecto a la línea base.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas desde la primera semana para el grupo CH-SINC [CH-SINC $F (1.759, 8.797) = 8.152, p < 0.05$] y para el grupo CH-ADLIB [CH-ADLIB $F (2.203, 15.42) = 6.429, p = 0.0081$] (Figura 2B). La prueba *post-hoc* de Tukey confirmó estas diferencias en el grupo CH-SINC Y CH-ADLIB en comparación con la línea base $p < 0.05$.

Con el objetivo de analizar la respuesta anticipatoria al acceso restringido a 5 gr de chocolate se realizó un análisis de la actividad en el último día de acceso al chocolate para los grupos CH-SINC y CH-ALE, para lo cual ambos grupos recibieron el chocolate a las 13:00 horas el penúltimo día de acceso. El análisis estadístico ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró diferencias en la interacción de los factores [$F (18, 168) = 0.7766, P = 0.7254$] y para el factor tiempo [$F (4, 48) = 17.59, P < 0.0001$] y condición experimental [$F (1, 12) = 22.74, P = 0.0005$]. La prueba *post-hoc* de Tukey confirmó estas diferencias a las 12:00 y 12:30 horas $p < 0.05$ mostrando que el grupo CH-SINC puede anticipar e

incrementa su actividad locomotora previo al acceso en comparación con el grupo CH-ALE que recibía la misma cantidad diaria, pero en horarios aleatorios. No se observaron diferencias al momento del acceso al chocolate (ingestión) ni tiempo como respuesta de haberlo comido (Figura 2 C).

Actividad Locomotora Anticipatoria

Anticipación al chocolate 3 semana

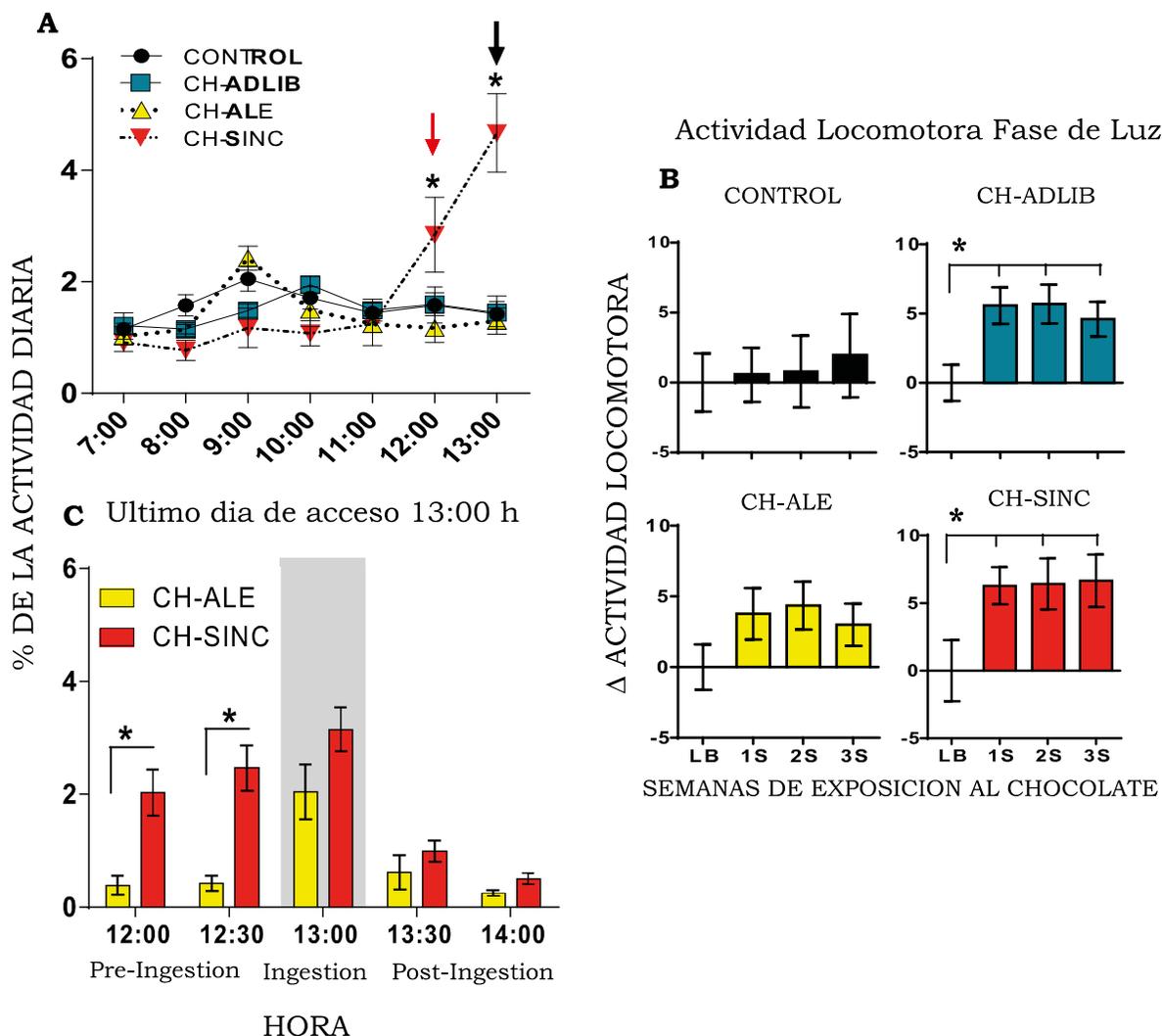


Figura 2. Actividad Locomotora Anticipatoria al chocolate. (A) Promedio de actividad locomotora durante las 6 horas previas al acceso al chocolate (13:00 h); la flecha negra indica el momento de acceso al chocolate para el grupo sincronizado; la flecha roja indica el momento previo al acceso al chocolate (anticipación) *Diferencia estadística con respecto a todos los grupos $p < 0.05$ $M \pm SEM$. (B) Diferencia de la actividad locomotora en la fase de luz con respecto a la línea base. *Diferencia estadística con respecto a la línea base $p < 0.05$ $M \pm SEM$. (C) Promedio de la actividad locomotora para el día 21 de acceso al chocolate; la barra gris indica el momento de acceso para el grupo CH-RDA Y CH-SINC. *Diferencia estadística entre los grupos $p < 0.05$.

Temperatura Corporal

Durante la línea base todos los grupos mostraron un patrón circadiano de temperatura definido, con valores mayores durante la fase de actividad (fase oscura) y valores menores durante la fase de reposo (fase de luz). Durante las semanas de acceso al chocolate el grupo CH-ADLIB no mostró cambios significativos en los niveles temperatura corporal en comparación con el grupo control y su propia la línea base, el mismo comportamiento fue observado para el grupo CH-RDA (Ver figura 3 A, B y C). Sin embargo, el grupo CH-SIN mostró una elevación de la temperatura a la hora de acceso al chocolate (13:00 h) desde la primera semana, así como niveles más bajos de temperatura al inicio de la fase de descanso, dichos cambios fueron más evidentes a la semana 3 de acceso al chocolate (ver figura 3D).

PERFILES DE TEMPERATURA

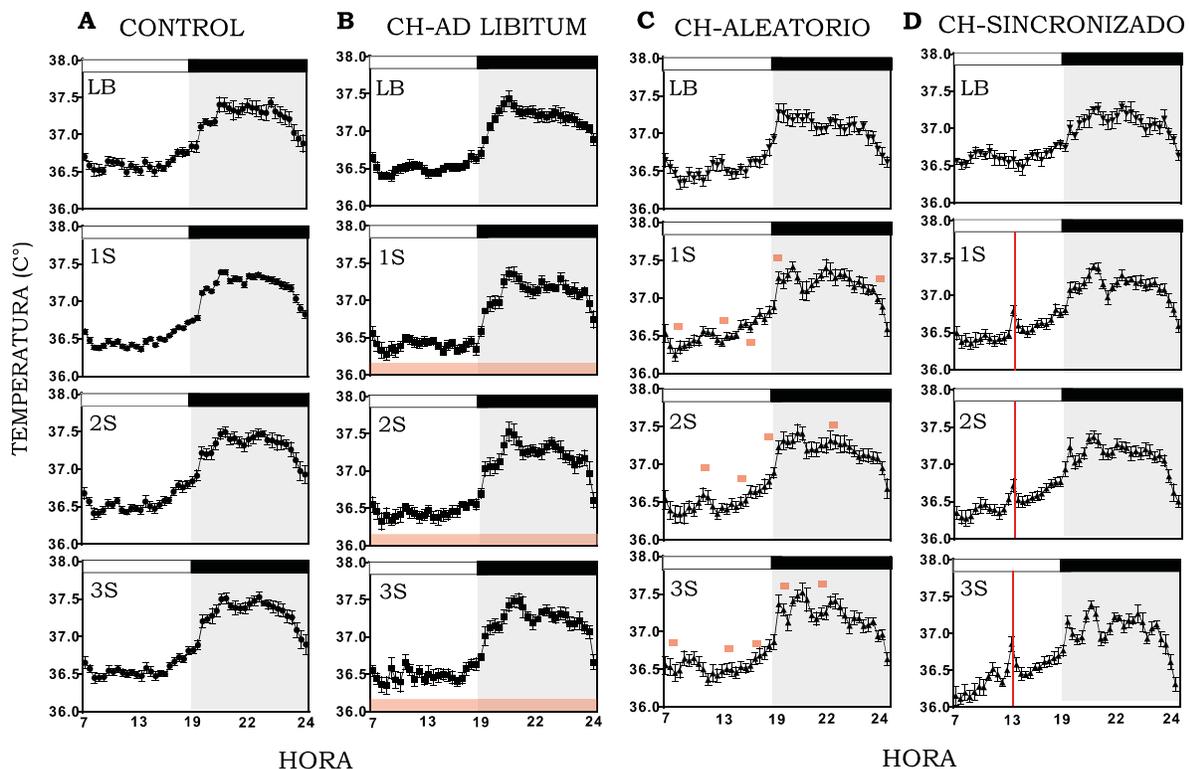


Figura 3. Perfiles semanales del patrón temporal de 24 horas de la temperatura corporal. Se puede observar en todos los grupos un patrón circadiano temporal durante la LB y las semanas de acceso al chocolate, con mayores niveles de temperatura durante la noche. Las barras negras y blancas superiores representan la fase de oscuridad y de luz respectivamente. La figura A muestra los perfiles para el grupo control, (B) CH-ADLIB, las barras rojas inferiores representan el periodo de acceso al chocolate; (C) CH-ALE, los cuadrados rojos son representativos del acceso diario a 5 gr de chocolate en horarios aleatorios; (D) CH-SINC, las líneas rojas representan el acceso diario a 5 gr de chocolate programado a las 13 horas, mostrando un aumento progresivo de temperatura en anticipación y un pico a la hora de acceso.

Durante la tercera semana de acceso al chocolate el grupo CH-SINC mostró al iniciarse la fase de actividad (fase de luz) un decremento anticipatorio de la temperatura corporal que pudo observarse desde 6 horas antes del acceso al chocolate (Ver Figura 4 A). La prueba estadística ANOVA de dos vías de medidas repetidas indicó diferencias significativas para el factor tiempo [$F(6, 54) = 10.65$], $P < 0.0001$ y para la interacción de ambos factores: tiempo y condición [$F(18, 162) = 7.521$, $P < 0.0001$], sin embargo, no indicó diferencias para el factor condición [$F(3, 27) = 0.7645$, $P = 0.5239$]. La prueba *post-hoc* de comparaciones múltiples de Tukey indicó diferencias para el grupo CH-SINC con respecto a todos los grupos en los puntos temporales: 7:00 am, 8:00am, 9am y 10 am, $p < 0.05$. La ingestión diaria y programada de 5gr de chocolate (CH-SINC) indujo un incremento inmediato y breve de la temperatura corporal a la hora de acceso (13:00) mostrando diferencias significativas con respecto a todos los grupos $p < 0.05$.

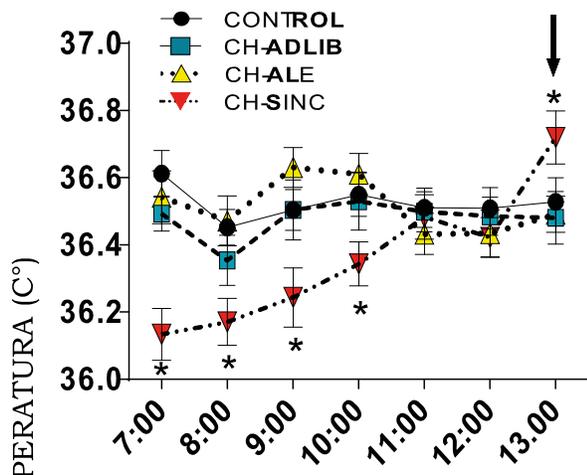
Con el objetivo de analizar semanalmente el decremento anticipatorio de la temperatura en la fase de luz como respuesta al chocolate, se realizó un análisis de la diferencia de temperatura con respecto a la línea base (Δ) para cada grupo, encontrando diferencias estadísticamente significativas en la tercera semana de acceso en el grupo que recibía diariamente 5 gr de chocolate programado a la misma hora (CH-SINC) (Ver Figura 4 B). La prueba ANOVA de una sola vía de medidas repetidas no indicó diferencias en comparación con la línea base para los grupos control, CH-ADLIB y CH-ALE, pero indicó diferencias significativas para el grupo CH-SINC [$F(2.032, 18.29) = 6.385$], $p = 0.0077$.

Con el objetivo de analizar el decremento anticipatorio de temperatura en respuesta al acceso restringido a 5 gr de chocolate se realizó un análisis de la actividad en el último día de acceso para los grupos CH-SINC y CH-ALE en el cual ambos grupos recibieron el chocolate a las 13:00 horas durante el penúltimo día (Figura 4C). El análisis estadístico ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró diferencias para el factor condición [$F(7, 49) = 10.03$], $p < 0.0001$ y para la interacción de los factores tiempo y condición [$F(7, 49) = 4.793$], $p = 0.0004$; no indicó diferencias significativas para el factor tiempo; confirmando el decremento

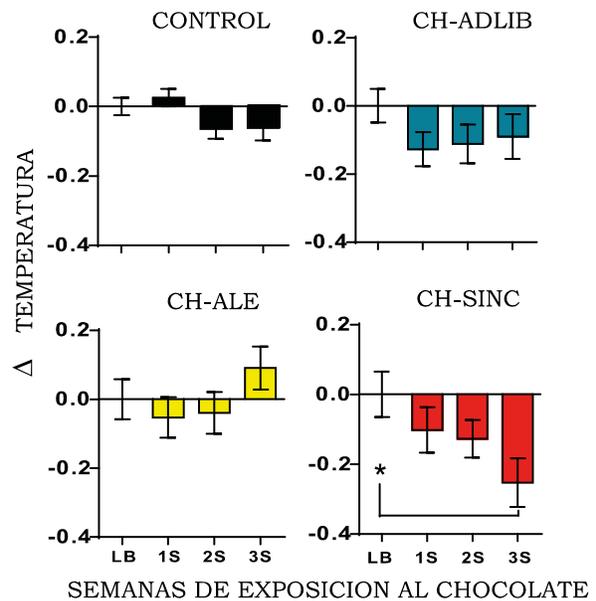
de la temperatura corporal previo al acceso al chocolate del grupo CH-SINC en comparación con el grupo CH-ALE que recibió la misma cantidad diaria, pero en horarios aleatorios. No se mostraron diferencias al momento del acceso en respuesta a la ingestión de chocolate: 13:00 y 14:00 horas.

ANTICIPACION TEMPERATURA CORPORAL

A Anticipación al chocolate 3 semana



B Temperatura Fase de Luz



C Ultimo dia de acceso 13:00 h

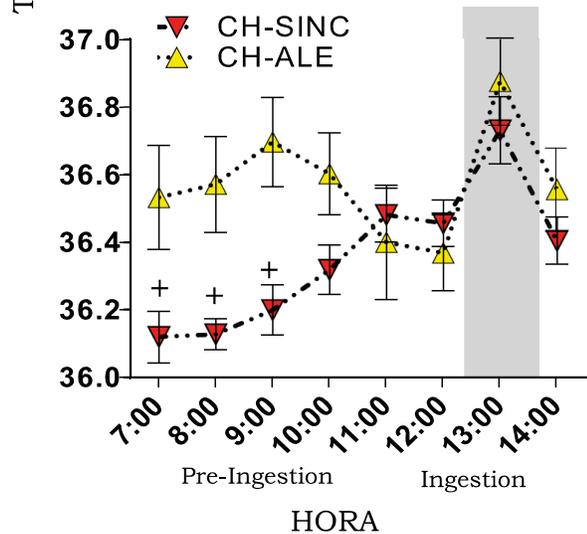


Figura 4. Respuesta de la temperatura corporal al chocolate. **(A)** Promedio de la temperatura corporal 6 h antes de las 13:00; la flecha negra indica el momento de acceso al chocolate para el grupo CH-SINC. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por una ANOVA seguidas una prueba post-hoc Tukey: *Diferencias significativas con respecto a todos los grupos $p < 0.05$; $M \pm SEM$. **(B)** Diferencia del promedio de temperatura con respecto a la línea base 6 horas antes de las 13 h. *Diferencia estadística con respecto a la línea base $p < 0.05$ $M \pm SEM$. **(C)** Promedio de la temperatura para el día 21 de acceso al chocolate; la barra gris indica el momento de acceso para el grupo CH-RDA Y CH-SINC. Diferencia estadística entre los grupos $+p < 0.01$ $M \pm SEM$.

PRUEBA CONDUCTUAL: ESFUERZO Y MOTIVACION POR OBTENER EL CHOCOLATE

Categoría Interacción Activa

El análisis realizado para la evaluación de las conductas de esfuerzo por obtener el chocolate se realizó mediante la diferencia del número de eventos (Δ) observados en la fase de exposición a la caja de malla vacía versus la caja de malla que contenía 5 gr de chocolate.

Los grupos control y CH-ADLIB mostraron pocas conductas (número total de conductas obtenidas en cada indicador) de esfuerzo/motivación dirigidas a la obtención del chocolate en comparación con los grupos restringidos a 5 gr de chocolate: CH-ALE y CH-SINC, que mostraron niveles significativamente más altos y no hubo diferencias entre ellos (Figura 5A). El análisis estadístico indicó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos [$H(3) = 27.75$] $p < 0.0001$. El grupo control y chocolate *ad libitum* desplegaron pocos eventos para la conducta “empujar caja”, en cambio, ambos grupos con acceso restringido a 5 gr de chocolate (CH-ALE y CH-SINC) mostraron un mayor número de conductas de empujar caja dirigidas a la obtención del chocolate (Figura 5B). El análisis estadístico Kruskal-Wallis indicó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos [$H(3) = 20.66$] $p < 0.001$.

Para el indicador conductual de girar la caja los grupos control y CH-ADLIB mostraron pocas conductas de empujar la caja para la obtención del chocolate mientras que los grupos CH-ALE y CH-SINC mostraron niveles significativamente más altos que los demás grupos experimentales (Figura 5C). El análisis estadístico indicó una diferencia estadísticamente significativa entre grupos [$H(3) = 25.98$], $p < 0.0001$. Los grupos control y CH-ADLIB, mostraron pocas conductas de morder la caja (dirigidas a la obtención del chocolate), mientras que el grupo CH-ALE y CH-SINC mostraron niveles significativamente más altos para este indicador, sin embargo, no hubo diferencias entre ambos grupos (Figura 5D). El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre grupos [$H(3) = 30.10$] $p < 0.0001$.

CONDUCTAS DE ESFUERZO

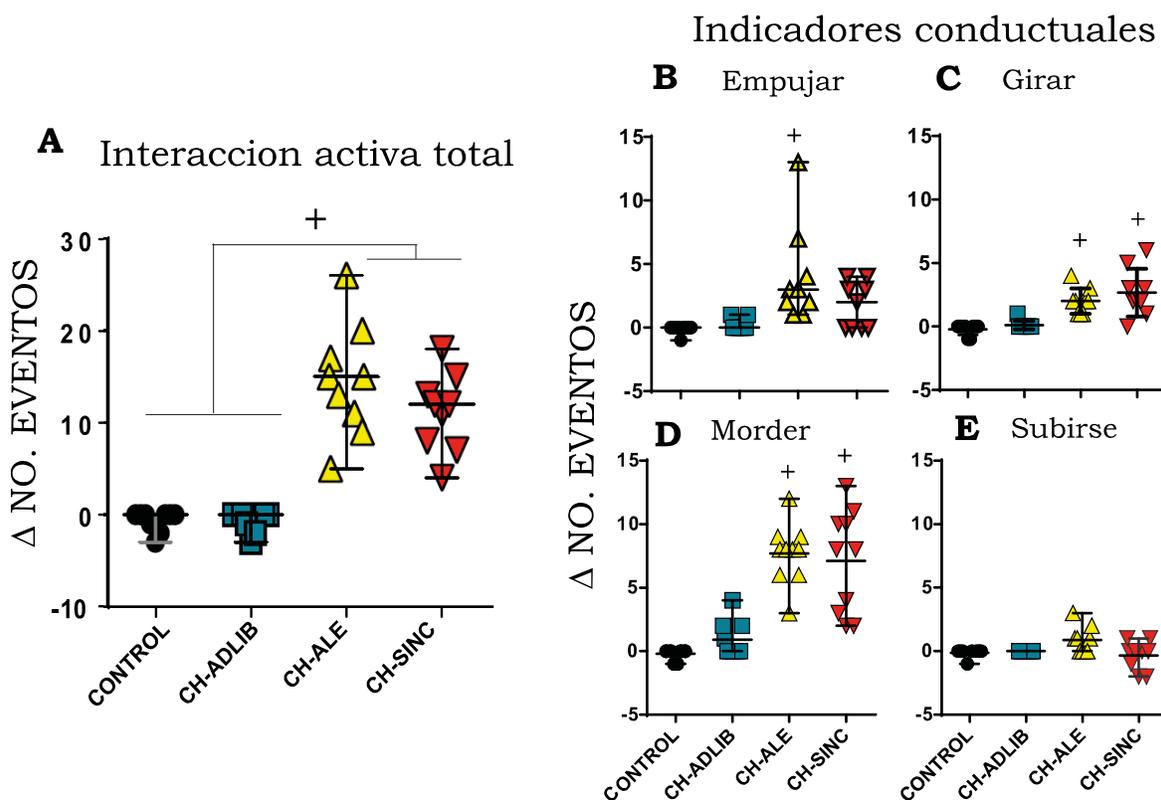


Figura 5. Indicadores conductuales de la categoría de interacción activa con la caja. Se representa el cambio del número de eventos ante la exposición de la caja vacía y caja con chocolate en la semana 3. (A) Diferencia del total de todos los indicadores de interacción activa en la caja vacía versus la caja con chocolate. El eje de las ordenadas representa el grupo experimental y el eje de las abscisas representa el número de eventos en 5 min. Los rangos están representados por el primer y tercer cuartil de la distribución mientras que la línea en el centro representa la mediana, y cada uno de los símbolos representa a un sujeto experimental. (B) Medianas de la diferencia del número de eventos en la caja llena versus la vacía para la conducta de empujar la caja, (C) girar la caja, (D) morder la caja y (E) subirse a la caja. La prueba Dunn de comparaciones múltiples indicó diferencias significativas con respecto al grupo control y CH-ADLIB $^*p < 0.01$.

No se observaron conductas de subirse a la caja dirigidas a la obtención del chocolate para los grupos control y CH-ADLIB y los grupos restringidos a 5 gr de chocolate: CH-ALE y CH-SINC mostraron niveles bajos de dicha conducta (Figura 5E). La prueba estadística no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos [$H(3) = 9.405$].

Categoría Interacción Pasiva

Para el total de conductas obtenidas con cada indicador de interacción pasiva, todos los grupos mostraron niveles similares (Figura 6). La prueba estadística no indicó diferencias significativas para el total de las conductas [$H(3) = 2.176$], $p < 0.5367$, para el contacto con las patas [$H(3) = 1.059$], $p = 0.78$ y para olfatear la caja.

No hubo diferencias para el indicador de contacto con las patas. Todos los grupos mostraron pocas conductas de contacto con las patas (Figura 6B), la prueba estadística de Kruskal-Wallis no indicó diferencias significativas entre grupos.

De igual manera, en el indicador olfatear caja todos los grupos mostraron valores similares (Figura 6C), así mismo, la prueba estadística no arrojó diferencias significativas entre grupos [$H(3) = 4.033$], $p = 0.257$.

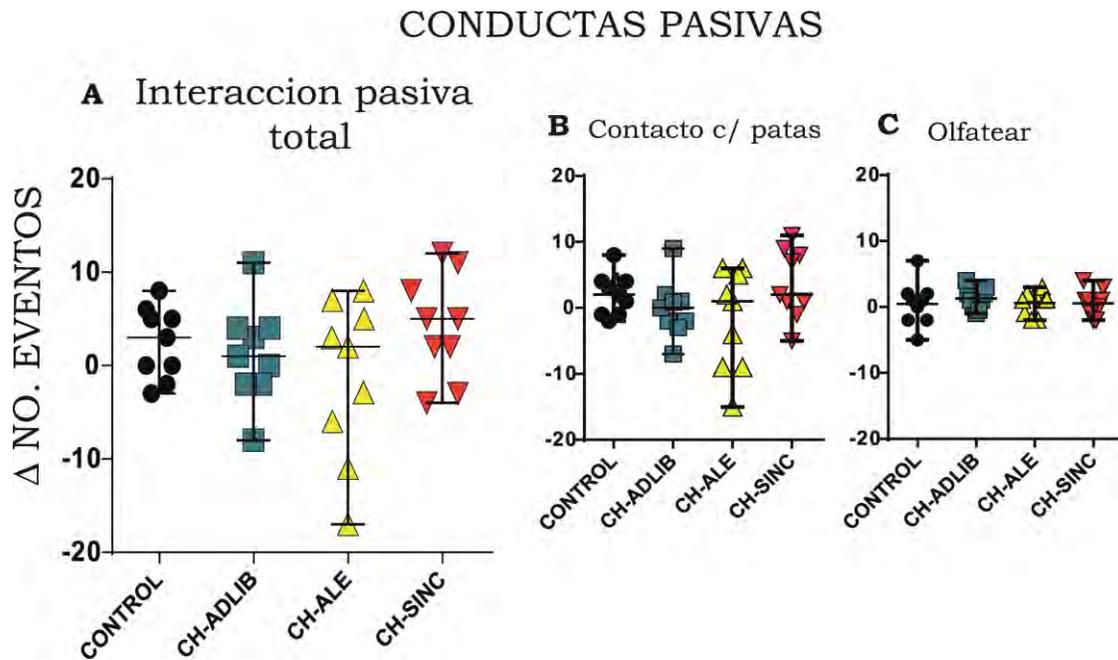


Figura 6. Indicadores conductuales de la categoría interacción pasiva. Se representa la diferencia del número de eventos ante la exposición de la caja vacía y caja con chocolate (Δ) en la semana 3. (A) Las medianas de la diferencia de los indicadores de interacción pasiva indicaron valores similares para todos los grupos. (B) Diferencia del número de eventos en 5 min para el indicador contacto con las patas y (C) olfatear la caja. El eje de las ordenadas representa el grupo experimental y el eje de las abscisas representa el número de eventos en 5 min. Los rangos están representados por el primer y tercer cuartil de la distribución mientras que la línea en el centro representa la mediana, y cada uno de los símbolos representa a un sujeto experimental.

Categoría de Ansiedad

El número total de conductas obtenidas en los indicadores de ansiedad fue similar para todos los grupos (Figura 7A). No se observaron efectos por el tratamiento y la prueba estadística no indicó diferencias significativas entre los grupos [$H(3) = 5.244$], $p=0.231$.

CONDUCTAS DE ANSIEDAD

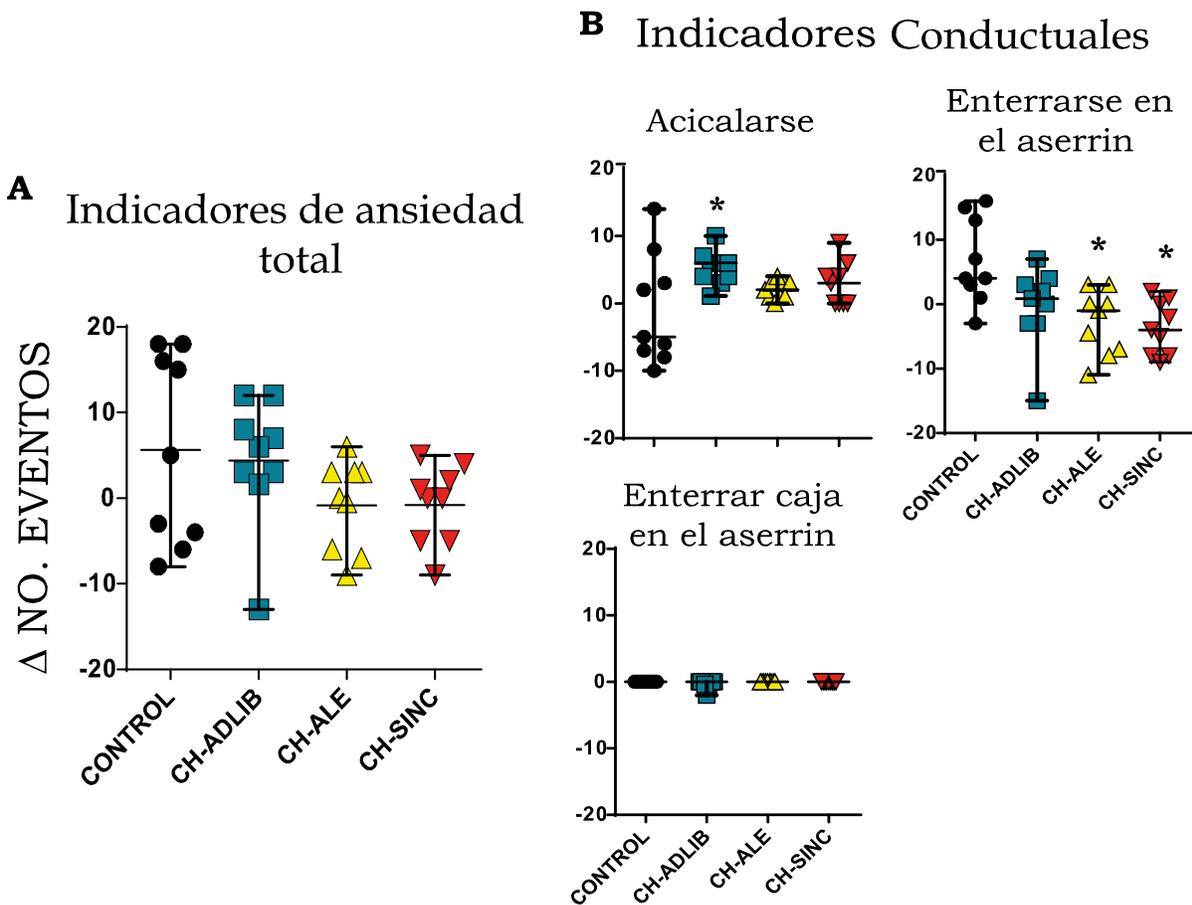


Figura 7. Indicadores conductuales de la categoría de ansiedad. Se representa la diferencia del número de eventos ante la exposición de la caja vacía versus caja con chocolate (Δ) en la semana 3. (A) Diferencia del total de eventos para los indicadores de ansiedad en la caja llena versus la vacía para cada uno de los grupos. El eje de las ordenadas representa el grupo experimental y el eje de las abscisas representa el número de eventos en 5 min. Los rangos están representados por el primer y tercer cuartil de la distribución mientras que la línea en el centro representa la mediana, y cada uno de los símbolos representa a un sujeto experimental. (B) Diferencia del número de eventos para cada indicador de ansiedad en la caja llena versus la vacía, El *post-hoc* de Dunn mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control $*p<0.05$.

Para el indicador acicalarse se observó una mayor variabilidad en el grupo control y los grupos expuestos al chocolate tendieron a obtener valores positivos lo que sugiere que presentaron un mayor número de conductas de acicalamiento durante la presentación de la caja con chocolate, sin embargo, solamente el grupo CH-ADLIB fue estadísticamente distinto del grupo control $p < 0.05$ (Ver Figura 7 B). La prueba estadística Kruskal-Wallis indicó diferencias entre grupos [$H(3) = 8.170$], $p < 0.05$.

Para el indicador enterrarse en el aserrín, los grupos control y CH-ADLIB mostraron pocas conductas de enterramiento mientras que los grupos CH-ALE y CH-SINC presentaron valores negativos indicando un nivel más bajo que en la fase de “caja vacía”. El análisis estadístico indicó una diferencia significativa entre grupos [$H(3) = 13.55$], $p = 0.0036$.

El *post-hoc* de comparaciones múltiples indicó diferencias entre los grupos CH-SINC y CH-ALE en comparación con el grupo control $p < 0.05$.

El indicador enterrar caja en el aserrín no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos [$H(3) = 5.24$], $p = 0.1548$.

Categoría Exploración

El análisis del total de los indicadores de exploración no mostró diferencias significativas para el indicador caminar [$H(3) = 7.253$], $p = 0.0643$, ni para el indicador pararse en dos patas [$H(3) = 6.659$], $p = 0.0836$, ni para el indicador olfateo horizontal [$H(3) = 2.367$], $p = 0.4998$ (Figura 8). Así mismo, no se encontraron diferencias para la sumatoria del número de conductas obtenidas en cada indicador de exploración [$H(3) = 6.908$], $p = 0.0749$, todos los grupos mostraron niveles similares.

CONDUCTAS DE EXPLORACIÓN

Indicadores Conductuales

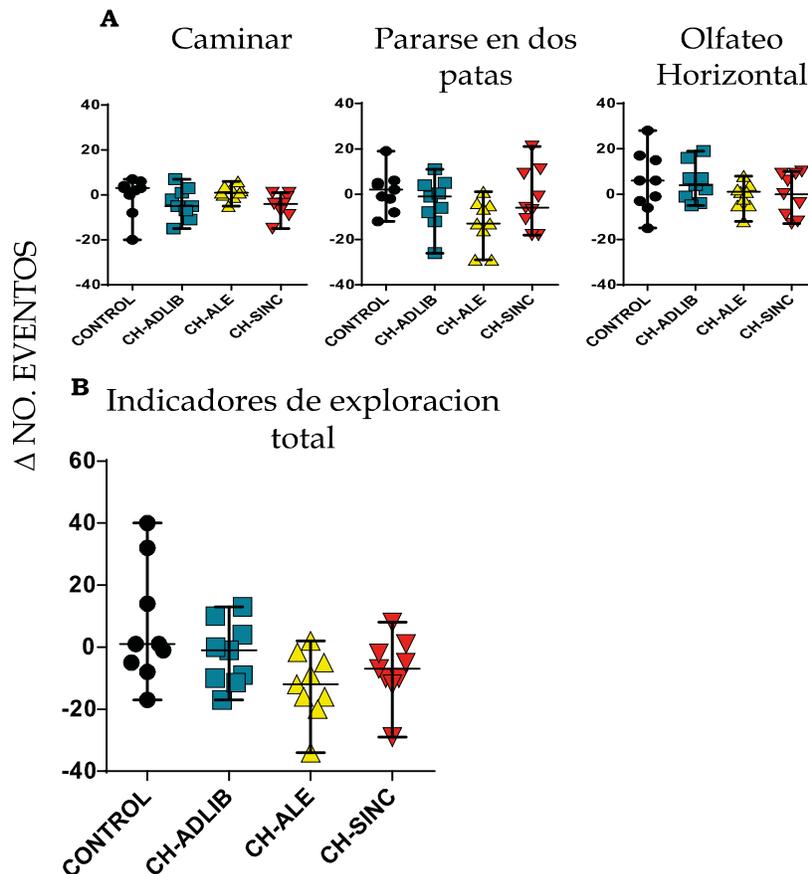


Figura 8. Indicadores conductuales de la categoría de exploración. Diferencia del número de eventos ante la exposición de la caja vacía versus la caja con chocolate (Δ) en la semana 3. El eje de las ordenadas representa el grupo experimental y el eje de las abscisas representa la diferencia en el número de eventos en 5 min. Los rangos están representados por el primer y tercer cuartil de la distribución mientras que la línea en el centro representa la mediana, y cada uno de los símbolos representa a un sujeto experimental. (A) Diferencia de los eventos en 5 min para cada uno de los indicadores de exploración en la caja vacía versus la caja con chocolate (Δ). (B) Delta de la sumatoria de los indicadores de exploración para cada uno de los grupos.

Consumo y ganancia de peso

Durante la línea base todos los grupos se mantuvieron con pesos similares entre los 260 y 270 gr. En contraste, los grupos con diferentes accesos a chocolate mostraron una mayor ganancia de peso con respecto al grupo control a lo largo de las semanas de exposición (Figura 10A). El análisis estadístico mostro diferencias significativas para el factor condición: $[F(3, 21) = 248.1 P < 0.0001]$ y para el factor tiempo: $[F(3, 21) = 6.831 P = 0.0022]$, así como en la interacción de ambos

factores: [F (9, 63) = 2.880 P = 0.0065]. La prueba *post hoc* indico que las diferencias se encontraban entre los grupos con acceso a chocolate y el grupo control desde la primera semana, P<0.05.

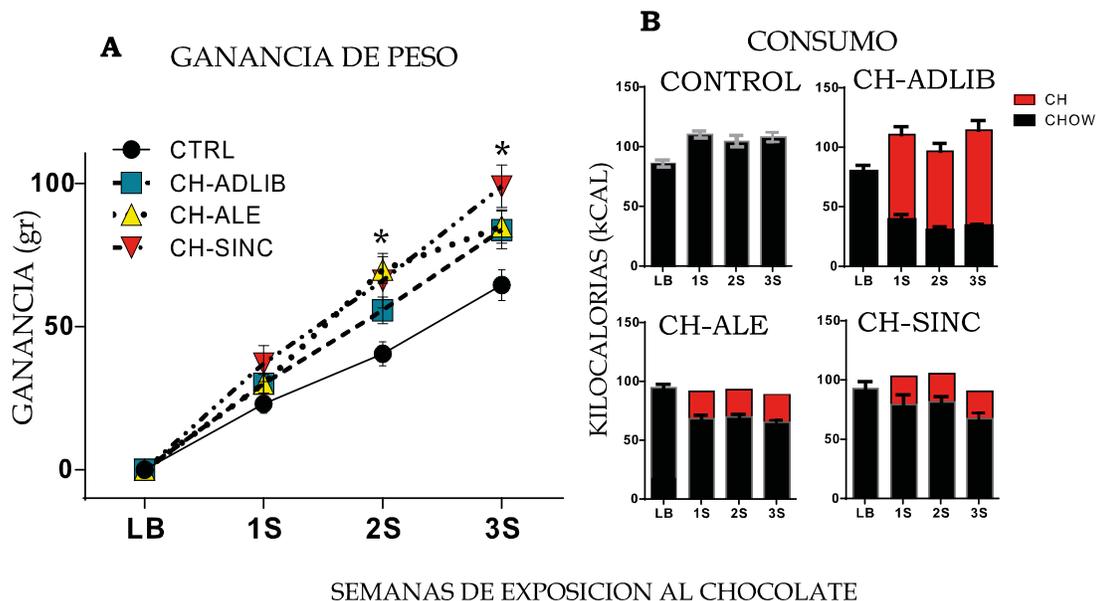


FIGURA 10. Ganancia de peso y consumo kilocalórico. (A) Ganancia de peso durante las semanas de exposición al chocolate con respecto a la línea base (LB). *Diferencias estadísticas entre los grupos con acceso a chocolate y el grupo control p<0.05 y (B) consumo diario kilocalórico promedio durante cada una de las semanas del protocolo para cada uno de los grupos experimentales.

A lo largo de las semanas del protocolo, todos los grupos consumieron en promedio 100 kilocalorías diarias (Figura 10B). Sin embargo, el grupo CH-ADLIB mostro una disminución en el consumo kilocalórico de alimento chow y un aumento en el consumo kilocalórico de chocolate. Un efecto similar fue observado en los grupos con restricción a 5 gr de chocolate: CH-ALE y CH-SINC quienes disminuyeron el consumo kilocalórico de alimento chow, compensando dicha disminución con el aporte kilocalórico del chocolate.

Medición de atracón (binge eating)

Durante el último día de cada semana del protocolo, todos los grupos fueron expuestos de forma *ad libitum* a una barra de chocolate (21 gr/118 kcal) por una hora. El análisis del consumo de chocolate, no mostró diferencias significativas para el grupo control que se mantuvo por debajo del 20% del consumo kilocalórico

diario, se observaron resultados similares para el grupo CH-ADLIB. Los grupos restringidos a 5 gr de chocolate diariamente, mostraron un consumo kilocalórico mayor al 20% en 1hr y la cantidad de chocolate ingerido fue incrementándose progresivamente con el transcurso de las semanas de exposición. Los porcentajes de consumo kilocalórico de chocolate fueron calculados a partir del promedio de consumo kilocalórico correspondiente a cada semana. El grupo CH-SINC alcanzó el porcentaje más alto con relación al CH-ALE (Figura 11).

CONSUMO KILOCALORICO EN 1HR

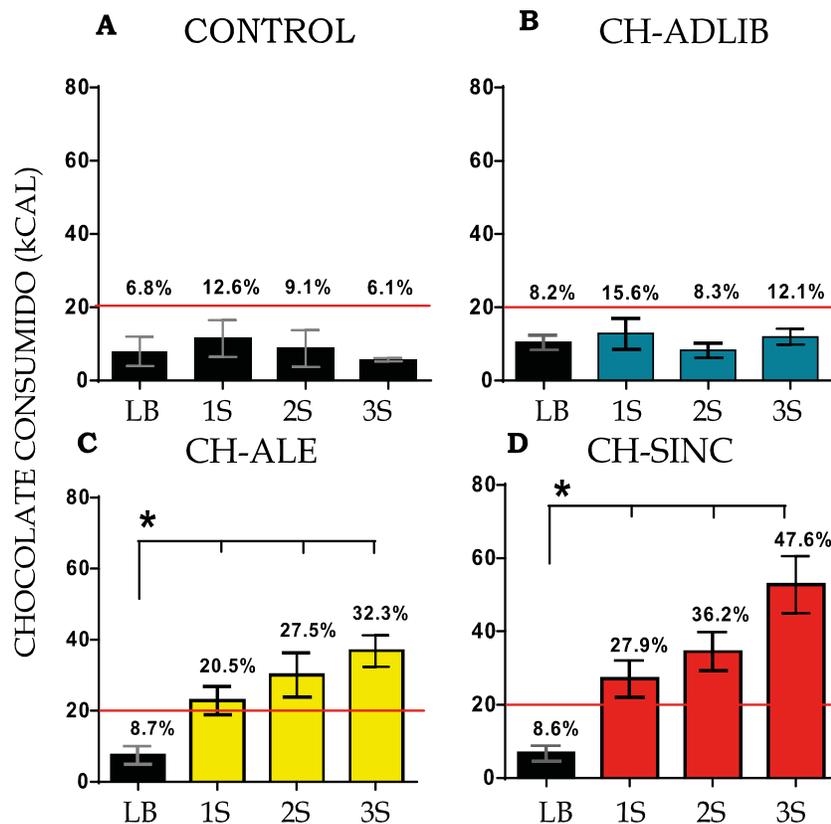


Figura 11. Porcentaje y consumo kilocalórico de chocolate en una hora de acceso *ad libitum*. El eje de las ordenadas representa el consumo kilocalórico de chocolate y el eje de las abscisas representa las semanas (S) de exposición a chocolate; la línea roja representa el promedio de kilocalorías consumidas en 1 hrs (20%) de alimento chow durante la línea base. Cada porcentaje sobre la barra indica la proporción del consumo de chocolate en relación a su consumo kilocalórico diario. (A) Consumo para el grupo control (B) CH-ADLIB, (C) CH-ALE y (D) CH-SINC; La prueba *post-hoc* de Tukey indicó diferencias significativas con respecto a la Línea Base * $p < 0.05$.

El análisis estadístico ANOVA de una sola vía de medidas repetidas no indicó diferencias significativas a lo largo de las semanas para el grupo CTRL: [F (2.149, 15.05) = 0.4122], $p = 0.6835$, ni para el grupo CH-ADLIB: [F (1.639, 11.47) =

1.426], $p=0.2749$, en comparación con la línea base. La prueba ANOVA de una sola vía indicó diferencias estadísticamente significativas a lo largo de las semanas para el grupo CH-ALE: [F (2.231, 15.62) = 7.095] $p=0.0064$, y para el grupo CH-SINC: [F (1.971, 13.80) = 10.83], $p=0.0015$, en comparación con la línea base.

Resultados del análisis neuronal

Después de 21 días en los distintos protocolos de acceso a chocolate, se obtuvieron los cerebros y se procesaron para inmunohistoquímica para el anticuerpo Δ FosB y GFAP. La figura 12 muestra el número de células inmunopositivas para Δ FosB en la Corteza prefrontal, Accumbens Core, Accumbens Shell y Amígdala Basolateral.

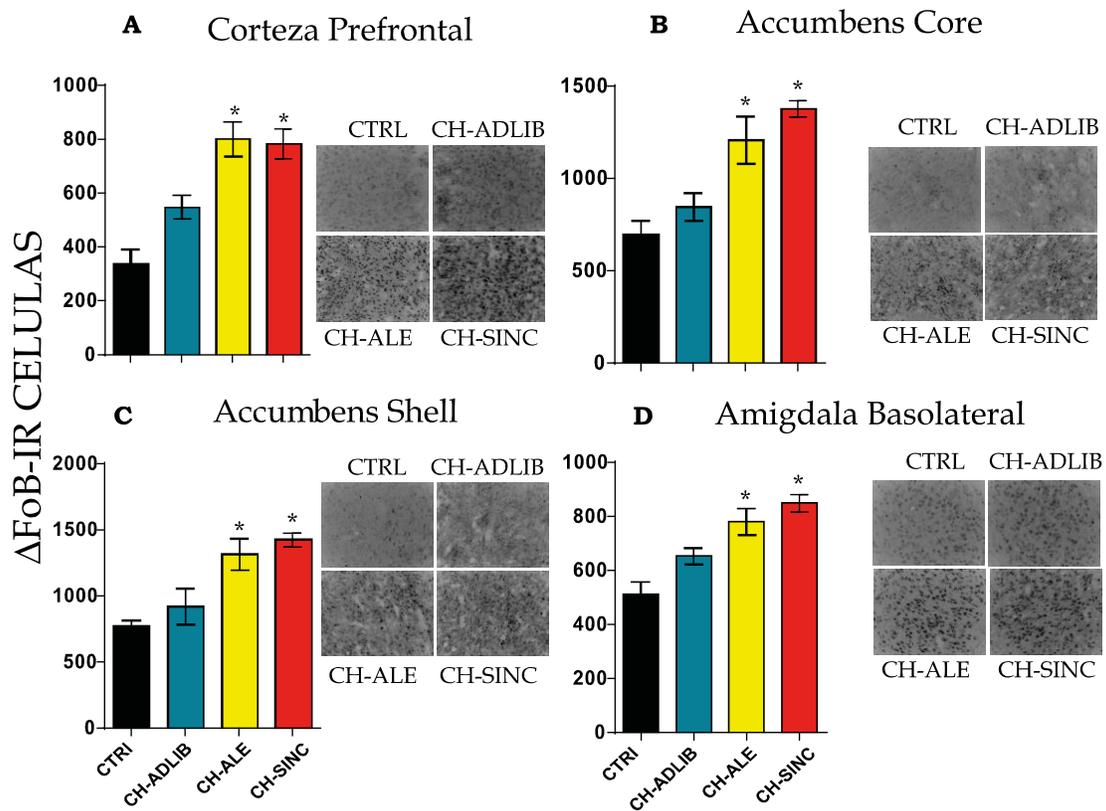


Figura 12. Número de células inmunoreactivas a Δ FosB en: (A) Corteza prefrontal, (B) Accumbens Core, (C) Accumbens Shell y (D) Amígdala Basolateral. En el eje de las abscisas se encuentran los grupos y en el eje de las ordenadas el número de células inmunopositivas en el día 21 de exposición al chocolate para todos los grupos. Los símbolos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control y CH-ADLIB * $p < 0.05$.

grupos con acceso restringido a 5 gr de chocolate se observaron niveles significativamente mayores (Figura 12 A, B, C y D). La prueba ANOVA de una sola vía indicó diferencias estadísticas entre los grupos en la corteza prefrontal [F (3, 28) = 15.70], $p < 0.0001$, en la región Core [F (3, 23) = 11.94], $p < 0.0001$, en la región Shell [F (3, 23) = 7.509], $p = 0.0011$ y en la amígdala basolateral [F (3, 22) = 11.60], $P < 0.0001$.

Al día 21 de acceso a las diferentes exposiciones de chocolate se evaluó la expresión de la proteína GFAP en la Corteza prefrontal, Accumbens Core y Accumbens Shell. Este marcado permitió visualizar los astrocitos y sus prolongaciones (Figura 13).

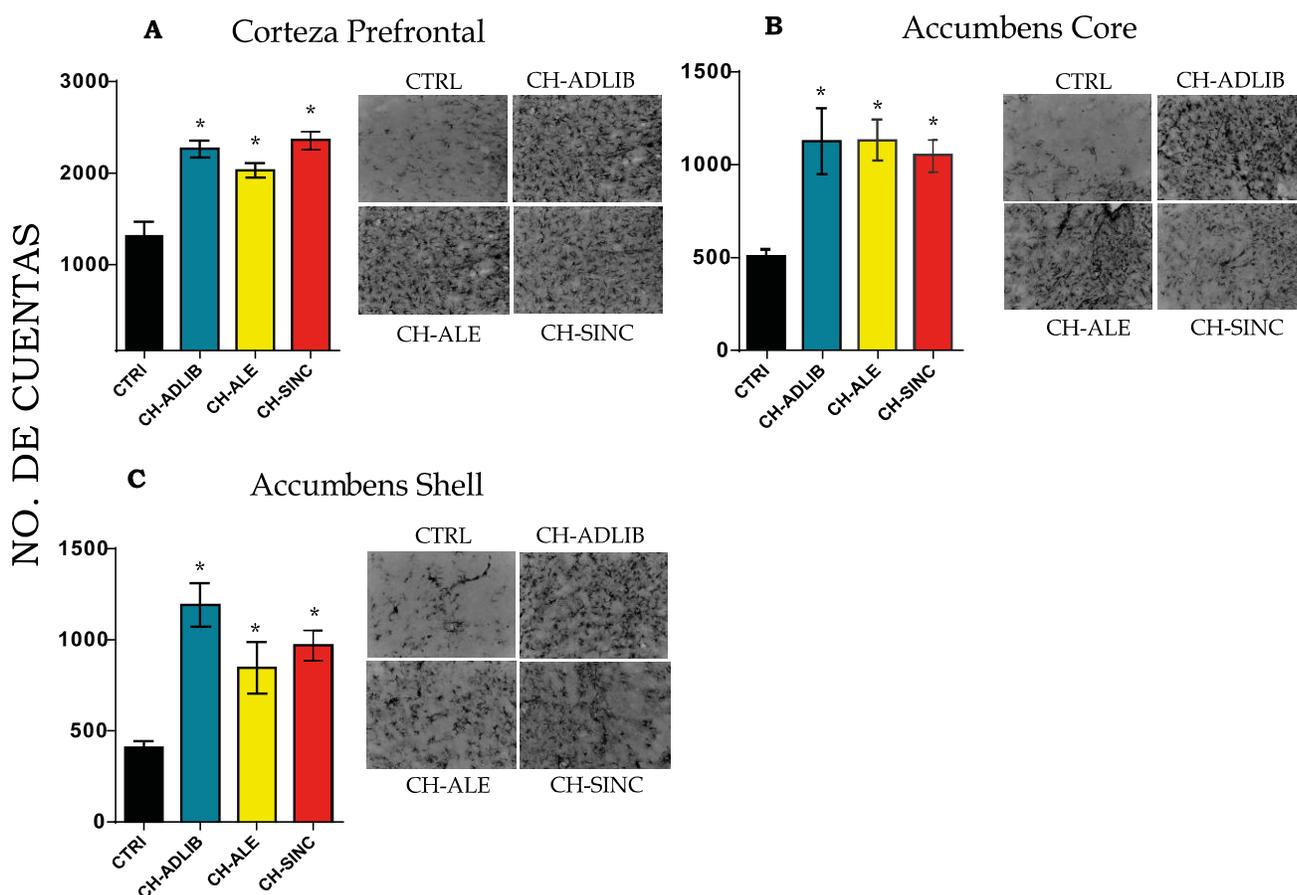


Figura 13. Promedio del número de cuentas para células positivas a GFAP en (A) Corteza Prefrontal, (B) Accumbens Core y (C) Accumbens Shell. El eje de las abscisas representa al grupo y el eje de las ordenadas el número de cuentas para GFAP en el día 21 de exposición al chocolate para todos los grupos. Los símbolos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control * $p < 0.05$.

La cuantificación indicó un menor número de células inmunoreactivas a la proteína GFAP en el grupo control en las 3 estructuras, mientras que los grupos con acceso a chocolate CH-ADLIB, CH-ALE y CH-SINC mostraron un mayor número, en comparación con el grupo control, con valores similares entre ellos (Figura 13 A, B y C). El análisis estadístico ANOVA de una sola vía indicó diferencias entre los grupos para la corteza prefrontal [F (3, 20) = 18.33], $p < 0.0001$, para el Core del Accumbens [F (3, 19) = 6.891], $p = 0.0025$ y para la subregión Shell de núcleo Accumbens F (3, 20) = 10.27, $P = 0.0003$.

DISCUSION

Los resultados obtenidos indican que el acceso restringido a un pedazo de chocolate, que es un alimento alto en grasa y azúcar, promueve conductas de esfuerzo y atracón. A nivel de sistema nervioso promueve un incremento en el número de células inmunoreactivas a la proteína Δ FosB en estructuras corticolímbicas y un aumento en el número de células inmunoreactivas a la proteína GFAP. La magnitud de los cambios plásticos refleja la intensidad de las conductas de esfuerzo y atracón. Además, cuando a la restricción se le sumó el factor temporal los animales pudieron anticipar con activación conductual locomotora y cambios de temperatura, el acceso al alimento. Estos hallazgos indican que el acceso restringido al chocolate desencadena cambios conductuales y neuronales similares a los reportados por el consumo de drogas de abuso.

Actividad locomotora y Temperatura corporal

En el presente trabajo, todos los grupos se encontraban en condiciones de acceso *ad libitum* al alimento chow, por lo cual se puede descartar que las respuestas observadas se deban a un estado metabólico negativo, es decir, a la restricción calórica. A pesar de ello, el chocolate ejerció un efecto importante sobre la conducta, la temperatura y la plasticidad neuronal, lo cual sugiere un efecto como estímulo reforzante y como sincronizador circadiano.

El proceso de anticipación se considera como la base del *craving* por ser la búsqueda y expectancia del estímulo placentero (Rogers, 2017), que en este caso fue el chocolate. Esta activación conductual fue observada únicamente en el grupo

con acceso diario restringido y programado a la misma hora, siendo gradual su incremento a lo largo de las semanas. La anticipación en la actividad general inició 1 hora antes del acceso al chocolate seguida de una disminución de la actividad posterior a la ingestión. Los resultados son concordantes con previos trabajos realizados en el grupo de la Dra. Escobar, en los cuales se reportan 15 minutos a 2 horas de anticipación cuando se restringe el acceso al chocolate (García, 2013; Ángeles-Castellanos, Salgado-Delgado, Rodríguez, Buijs, & Escobar, 2008; Mendoza, Angeles-Castellanos, & Escobar, 2005). En contraste, el grupo con acceso restringido y aleatorio al chocolate no mostró anticipación locomotora previa al acceso. De igual forma, se ha reportado que ante el acceso restringido a alimento chow en horarios aleatorios, los roedores, aun bajo un estado metabólico negativo, no desarrollan actividad anticipatoria (Escobar, Martínez-Merlos, Angeles-Castellanos, Del Carmen Miñana, & Buijs, 2007).

Estos datos indican que para desarrollar anticipación a una recompensa es necesario que el estímulo sea predecible para el sujeto, lo cual requiere de temporalidad y regularidad de presentación del estímulo para permitir una estimación temporal (Blancas et al., 2014; Escobar et al., 2011). Estudios realizados con restricción de alimento sugieren la participación de un sistema de estimación de tiempo que se sincroniza al estímulo energético, también se ha sugerido que es un proceso dependiente de aprendizaje asociativo (Mistlberger 2004).

En el grupo con acceso *ad libitum* al chocolate, se observó un incremento de la actividad locomotora durante la fase de luz, repercutiendo en la actividad locomotora nocturna. Estos resultados son similares a lo reportado en protocolos experimentales de acceso a dietas altas en grasa, en los cuales se observa un aumento en la actividad diurna disminuyendo la amplitud del ritmo de actividad locomotora (Mendoza, Pévet, & Challet, 2008; Bravo et al., 2014). Además, se ha observado que el acceso *ad libitum* a dietas altas en grasa reduce la amplitud del ritmo de la conducta de ingesta distribuyéndose a lo largo de la fase de luz y de obscuridad (Pendergast et al., 2013; Kohsaka et al., 2007). Esta baja amplitud de

la conducta de ingesta, es decir, el incremento en el consumo diurno se asocia con la obesidad, ya que cuando la dieta se restringe únicamente a la fase oscura se observa una menor ganancia de peso (Hatori et al., 2012; Chaix, Zarrinpar, Miu, & Panda, 2014; Branecy, Niswender, & Pendergast, 2015). Estos hallazgos sugieren que los animales bajo condiciones *ad libitum* consumieron el chocolate (o una parte del chocolate) durante su fase de descanso aumentando la actividad locomotora diurna. Se necesitan más estudios para determinar lo anterior.

En lo que respecta a la temperatura corporal, únicamente se observaron cambios en el grupo sincronizado al chocolate. Este grupo desarrolló una conducta anticipatoria que consistió en la disminución de la temperatura (de hasta 0.5C°) 4-6 horas previas al acceso al chocolate, seguido de un incremento durante la última hora previa al acceso al chocolate (13:00 h). La disminución de temperatura también se ha observado en roedores con acceso restringido y programado a una solución de sacarosa y de alimento chow durante la fase de luz (Carneiro, Fernandes, Medeiros, Diniz, & Araujo, 2012) lo que sugiere que la disminución de la temperatura puede ser el resultado de una adaptación fisiológica como un proceso homeostático de conservación de la energía ante la restricción programada. Es posible que el organismo requiera de una gran carga energética durante la anticipación y el consumo en su fase de reposo, para lo cual se restringe en el consumo energético horas antes. La disminución en la temperatura también puede ser producida por los efectos reforzantes del chocolate, sin una necesidad calórica o ante un estado metabólico negativo. Así mismo, en el trabajo de Pecoraro, Gomez, Laugero, & Dallman, 2002 también se reportó una disminución en la temperatura corporal ante el acceso restringido a una solución de sacarosa al 32%, durante la fase de luz (fase de reposo) seguido de un aumento en la temperatura corporal en un intervalo de 1-2 horas durante el acceso.

Esfuerzo y motivación por obtener el chocolate

La motivación, así como el esfuerzo y el tiempo invertido por obtener la recompensa ha sido uno de los principales parámetros experimentales para el estudio del uso compulsivo y habitual de drogas, y ahora para el consumo

compulsivo de alimentos altos en grasa y azúcares. Usualmente este parámetro se suele evaluar por medio del condicionamiento operante utilizando un programa de razón progresiva, en el cual el animal debe realizar un mayor número de respuestas de manera progresiva para obtener el reforzador (Venniro et al., 2016). Así mismo, existen modelos invasivos, que además de requerir un entrenamiento, dependen de estímulos aversivos, como un choque eléctrico en las patas de la rata, para demostrar el esfuerzo y motivación para obtener el reforzador a pesar de las consecuencias negativas o adversas (Vanderschuren & Ahmed, 2013).

En trabajos previos en el laboratorio de la Dra. Escobar se desarrolló un prueba basada en un caja de malla que contiene 5 gr de chocolate, permitiendo al animal ver y oler el chocolate y permite evidenciar las conductas relacionadas con la motivación y esfuerzo por obtener el chocolate, sin la necesidad de un entrenamiento previo o aversivo (Blancas et al., 2014).

Con esta prueba se observó que los grupos con acceso restringido al chocolate presentaron un mayor número de conductas de esfuerzo por obtener el chocolate, principalmente en los indicadores de empujar, girar y morder; sin embargo, el indicador subirse a la caja no fue sensible para medir este parámetro. En contraste las ratas que tenían acceso libre al chocolate no mostraron conductas de esfuerzo. Estos resultados indican que la restricción de un alimento apetecible puede producir una mayor motivación por consumirlo u obtenerlo, similar a lo reportado ante el consumo de drogas de abuso. Además, en el grupo sincronizado al chocolate se observó una menor variabilidad en los resultados, lo cual puede ser debido a que los animales se encontraban anticipando a la llegada del chocolate al momento de realizar la prueba. Este efecto fue específico de las conductas de esfuerzo, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las demás categorías mostrando que la presencia de la caja no resultó aversiva para los roedores.

Estas observaciones confirman que la estrategia propuesta por el grupo de la Dra Escobar, fue lo suficientemente sensible para evidenciar conductas de esfuerzo

hacia una caja de malla de alambre y diferenciar claramente dichas conductas de una caja vacía y una caja con chocolate.

Consumo y ganancia de peso

Los grupos con acceso al chocolate presentaron una mayor ganancia de peso, con respecto al grupo control, independientemente del tipo de acceso, ya que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. De forma interesante, los grupos con acceso restringido a 5 gr de chocolate alcanzaron los mismos valores que el grupo *ad libitum*, que en general, consumió más chocolate a lo largo del día. Sin embargo, todos los grupos se mantuvieron con un consumo kilocalórico cercano a las 100 kcal a lo largo de las semanas del protocolo. Estos resultados pueden deberse a que los roedores consumían el chocolate en su fase de descanso (fase de luz). Se ha reportado que el consumo de alimento durante la fase de descanso conlleva a problemas metabólicos, así como a una mayor ganancia de peso, concordando con los resultados obtenidos. (Pendergast et al., 2013; Salgado-Delgado et al., 2013; Salgado-Delgado, Angeles-Castellanos, Buijs, & Escobar, 2008).

Medición de atracón

En la prueba realizada para la medición de atracón, se observó que la restricción a un alimento apetecible, como lo es el chocolate, puede desencadenar un sobreconsumo en un corto periodo de tiempo, sin una necesidad calórica o un estado metabólico negativo. Ambos grupos con acceso restringido mostraron un mayor consumo de chocolate durante este periodo de tiempo en comparación con el grupo control y chocolate *ad libitum*. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Corwin, Avena, & Boggiano, 2011, quienes bajo un paradigma de acceso limitado (1-3 horas) a un alimento sabroso observan un incremento en el consumo a lo largo de 4 semanas.

Nuestros resultados concuerdan con la definición de atracón de acuerdo al DSM-V que lo refiere como un sobreconsumo en corto periodo de tiempo (1-2 horas)

significativamente mayor al que se consumiría en un periodo de tiempo similar (American Psychiatry Association, 2014).

Este efecto fue más pronunciado en el grupo sincronizado al chocolate (el cual podía predecir la llegada del estímulo placentero), lo que sugiere que el factor temporal es una variable fundamental que puede contribuir al desarrollo de atracón, mediante la expectancia y anticipación. Esto confirma que el sistema circadiano puede contribuir significativamente para preparar al individuo y promover la búsqueda de alimento cuando se presenta en un horario fijo. La conjunción del sistema motivacional con la temporalidad mostró tener la mayor potencia para inducir la búsqueda y promover el atracón.

Por otro lado, el grupo bajo condiciones *ad libitum* de chocolate no mostro este sobreconsumo en un corto periodo de tiempo, lo cual puede ser debido a la disponibilidad continua de chocolate. Sin embargo, otros trabajos han demostrado que después de la retirada, o privación forzada, de una dieta alta en grasa en condiciones *ad libitum* los sujetos muestran una mayor motivación y búsqueda por la dieta, así como episodios de atracón (Sirohi et al., 2016).

ΔFosB como factor de transcripción de cambios plásticos en el sistema de recompensa

La expresión de la proteína Δ FosB en regiones cerebrales involucradas con el procesamiento de la recompensa, se ha relacionado directamente con cambios plásticos neuronales ante el consumo de casi cualquier droga de abuso, dichos cambios también son relacionados directamente con los cambios conductuales subyacentes (Madsen et al., 2011; Robinson & Kolb, 2004). El aumento de Δ FosB en áreas corticolímbicas, en los grupos con acceso restringido al chocolate, confirma que la restricción de un alimento apetecible tiene la capacidad de desencadenar cambios plásticos neuronales, similares a los reportados ante el consumo compulsivo de drogas de abuso. La magnitud de los cambios conductuales en los grupos con acceso restringido reflejó la magnitud de la expresión de la proteína Δ FosB.

Los astrocitos como apoyo estructural en los cambios plásticos

Los astrocitos han demostrado ser una pieza importante en la plasticidad sináptica, a través de la liberación de factores de crecimiento y otras moléculas relacionadas (Barker & Ullian, 2010). Sin embargo, también se han relacionado con una respuesta inflamatoria y de deterioro neuronal ante el consumo de dietas altas en grasa, asociados a un decremento en el número de espinas dendríticas en la corteza prefrontal como resultado del estrés oxidativo producido (Dutheil et al., 2015). Nuestros resultados indicaron un mayor número de células inmunoreactivas a la proteína GFAP, con respecto al grupo control, independiente del tipo de acceso a chocolate ya que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Por lo cual nuestros resultados pueden ser el reflejo de ambas funciones de los astrocitos. Por un lado, podrían estar apoyando cambios plásticos neuronales, pero también podrían ser resultado de un proceso inflamatorio y de estrés oxidativo como se ha observado con dietas altas en grasa. Esto último podría ser el caso del grupo con acceso *ad libitum*. No obstante, esta es una hipótesis y nuestros resultados no pueden del todo sustentarla, por lo que se requerirá de otras mediciones, como podría ser el marcaje de proteínas involucradas con el estrés oxidativo, el deterioro neuronal y la inflamación.

Los resultados del presente trabajo demuestran que el acceso restringido a 5 gr de chocolate puede desencadenar un proceso de anticipación conductual y en la temperatura corporal, si es presentado diariamente y a la misma hora. Así mismo, el acceso restringido es suficiente para inducir conductas de esfuerzo y atracón, las cuales pueden ser de mayor magnitud si el individuo puede predecir el acceso al chocolate.

El acceso restringido a 5 gr de chocolate fue un estímulo con la capacidad de inducir cambios plásticos neuronales en estructuras corticolímbicas, la magnitud de estos cambios reflejo la intensidad de las conductas de esfuerzo y atracón. Así mismo el consumo de chocolate promovió una mayor ganancia de peso.

Factores promotores de la conducta compulsiva al alimento apetecible

En esta investigación se demostró que el consumo *per se* de chocolate, debido a sus propiedades reforzantes, promueve cambios en el patrón de alimentación, ya que en todas las condiciones y especialmente en condiciones *ad libitum* se incrementa su ingesta, disminuyendo el consumo de alimento chow. Este sobreconsumo no fue suficiente para desencadenar conductas de esfuerzo y atracón debido a la disponibilidad continua de chocolate. De igual forma a nivel de sistema nervioso central, no mostraron cambios plásticos en áreas corticolímbicas, pero si un incremento en la expresión de GFAP, el cual puede estar relacionado con un proceso inflamatorio o de estrés oxidativo (John Lin et al., 2017).

Por otro lado, el acceso restringido *per se* de chocolate mostró ser el factor para promover conductas de esfuerzo y atracón induciendo cambios plásticos en estructuras corticolímbicas relacionadas con el procesamiento de la recompensa. Además, si el acceso restringido es presentado de manera temporal y regular promueve un incremento en magnitud de la conducta de atracón, mediante la expectancia y la anticipación. Indicando que el sistema circadiano aunado a la restricción puede contribuir al desarrollo y mantenimiento de dicha conducta.

CONCLUSIONES

Con este estudio comprobamos que son varios los factores que llevan a desarrollar una conducta compulsiva al alimento similar a la adicción. Por un lado, el alimento rico en grasa y azúcar *per se* mostró ser suficiente para modificar los patrones y preferencias de alimentación. En segundo término, la restricción en el acceso al alimento apetecible mostró ser el factor desencadenante de conductas de esfuerzo y búsqueda, además de promover el atracón. Finalmente, la combinación con un horario predecible y fijo, incrementó estos efectos y permitió el desarrollo de conductas de anticipación.

Estos datos sugieren que son varios los factores que contribuyen a detonar una conducta compulsiva y que su contribución se puede disecar y observar diferencialmente. Además, indican que los cambios descritos por otros grupos

para el desarrollo de estas conductas tienen origen en los distintos factores que se conjuntan.

Estos resultados resaltan a la complejidad de los factores que pueden contribuir al establecimiento y mantenimiento una adicción a los alimentos altos en grasas y azúcares. Así como, de las posibles intervenciones para sujetos que presentan una ingesta compulsiva, contribuyendo a la obesidad, y que desean modificar sus hábitos alimenticios.

REFERENCIAS

- Alonso-Alonso, M., Woods, S., Pelchat, M., Grigson, P., Stice, E., Farooqi, S., Beauchamp, G. (2015). Food reward system: Current perspectives and future research needs. *Nutrition Reviews*, 73(5), 296–307. <http://doi.org/10.1093/nutrit/nuv002>
- American Psychiatry Association. (2014). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V)* (5th ed.). American Psychiatric Association; 1000 Wilson Boulevard; Arlington, VA 22209-3901; www.psych.org.
- Angeles-Castellanos, M., Aguilar-Roblero, R. & Escobar, C. (2004). c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(1), R158–R165. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00216.2003>
- Angeles-Castellanos, M., Mendoza, J., Diaz-Munoz, M. & Escobar, C. (2005). Food entrainment modifies the c-Fos expression pattern in brain stem nuclei of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288(3), R678-84. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00590.2004>
- Angeles-Castellanos, M., Mendoza, J. & Escobar, C. (2007). Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience*, 144(1), 344–355. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.064>
- Ángeles-Castellanos, M., Salgado-Delgado, R., Rodríguez, K., Buijs, R. & Escobar, C. (2008). Expectancy for food or expectancy for chocolate reveals timing systems for metabolism and reward. *Neuroscience*, 155(1), 297–307. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.001>
- Argente-Arizón, P., Guerra-Cantera, S., Garcia-Segura, L., Argente, J. & Chowen, J. (2016). Glial cells and energy balance. *Journal of Molecular Endocrinology*, (November), JME-16-0182. <http://doi.org/10.1530/JME-16-0182>
- Avena, N., Murray, S., & Gold, M. (2013a). Comparing the effects of food restriction and overeating on brain reward systems. *Experimental Gerontology*,

48(10), 1062–1067. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2013.03.006>

Avena, N., Murray, S. & Gold, M. (2013b). Comparing the effects of food restriction and overeating on brain reward systems. *Experimental Gerontology*, 48(10), 1062–1067. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2013.03.006>

Avena, N., Rada, P. & Hoebel, B. (2008). Evidence for sugar addiction: Behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(1), 20–39. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.04.019>

Barker, A. & Ullian, E. (2010). Astrocytes and synaptic plasticity. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 16(1), 40–50. <http://doi.org/10.1177/1073858409339215>

Berner, L., Avena, N. & Hoebel, B. (2008). Bingeing, self-restriction, and increased body weight in rats with limited access to a sweet-fat diet. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 16(9), 1998–2002. <http://doi.org/10.1038/oby.2008.328>

Berridge, K. & Kringelbach, M. (2015). Pleasure Systems in the Brain. *Neuron*, 86(3), 646–664. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.018>

Berridge, K. & Robinson, T. (2016). Liking , Wanting , and the Incentive-Sensitization Theory of Addiction. *American Psychologist*, 71(8), 670–679. <http://doi.org/10.1037/amp0000059>

Blancas, A., Gonzalez, S. D., & Escobar, C. (2014). Progressive Anticipation in Behavior and Brain Activation, 281(September), 44–53. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.036>

Bowers, M. & Kalivas, P. (2003). Forebrain astroglial plasticity is induced following withdrawal from repeated cocaine administration. *European Journal of Neuroscience*, 17(6), 1273–1278. <http://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02537.x>

Braneky, K., Niswender, K. & Pendergast, J. (2015). Disruption of daily rhythms by high-fat diet is reversible. *PLoS ONE*, 10(9), 1–12.

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0137970>

Bravo, R., Cubero, J., Franco, L., Mesa, M., Galan, C., Rodriguez, A., Barriga, C. (2014). Body weight gain in rats by a high-fat diet produces chronodisruption in activity/inactivity circadian rhythm. *Chronobiol Int*, 31(3), 363–370. <http://doi.org/10.3109/07420528.2013.859151>

Buckman, L., Thompson, M., Lippert, R., Blackwell, T., Yull, F., & Ellacott, K. (2015). Evidence for a novel functional role of astrocytes in the acute homeostatic response to high-fat diet intake in mice. *Molecular Metabolism*, 4(1), 58–63. <http://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.10.001>

Bull, C., Freitas, K., Zou, S., Poland, R., Syed, W., Urban, D., Bowers, M. (2014). Rat nucleus accumbens core astrocytes modulate reward and the motivation to self-administer ethanol after abstinence. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(12), 2835–45. <http://doi.org/10.1038/npp.2014.135>

Caprioli, D., Zeric, T., Thorndike, E. & Venniro, M. (2015). Persistent palatable food preference in rats with a history of limited and extended access to methamphetamine self-administration. *Addiction Biology*, n/a-n/a. <http://doi.org/10.1111/adb.12220>

Carneiro, B., Fernandes, D., Medeiros, C., Diniz, N. & Araujo, J. (2012). Daily anticipatory rhythms of behavior and body temperature in response to glucose availability in rats. *Psychology and Neuroscience*, 5(2), 191–197. <http://doi.org/10.3922/j.psns.2012.2.09>

Castro, D., Cole, S., & Berridge, K. (2015). Lateral hypothalamus, nucleus accumbens, and ventral pallidum roles in eating and hunger: interactions between homeostatic and reward circuitry. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9(June), 90. <http://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00090>

Cathelain, S., Brunault, P., Ballon, N., Réveillère, C. & Courtois, R. (2016). Food addiction: Definition, measurement and limits of the concept, associated factors, therapeutic and clinical implications. *Presse Medicale*, 45(12), 1154–

1163. <http://doi.org/10.1016/j.lpm.2016.03.014>

Chaix, A., Zarrinpar, A., Miu, P. & Panda, S. (2014). Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metabolism*, 20(6), 991–1005. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.001>

Colantuoni, C., Rada, P., Mccarthy, J., Patten, C., Avena, N., Chadeayne, A., Hoebel, B. (2002). Evidence that intermittent , excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence. *Obesity*, 10(6), 478–488. <http://doi.org/10.1038/oby.2002.66>

Corsica, J. & Pelchat, M. (2010). Food addiction: true or false? *Current Opinion in Gastroenterology*, 26(2), 165–169. <http://doi.org/10.1097/MOG.0b013e328336528d>

Corwin, R., Avena, N. & Boggiano, M.(2011). Feeding and reward: Perspectives from three rat models of binge eating. *Physiology and Behavior*, 104(1), 87–97. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.041>

Corwin, R. & Babbs, R. (2012). Rodent models of binge eating: are they models of addiction? *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 53(1), 23–34. <http://doi.org/10.1093/ilar.53.1.23>

De Jong, J., Vanderschuren, L., & Adan, R. (2012). Towards an animal model of food addiction. *Obesity Facts*, 5(2), 180–195. <http://doi.org/10.1159/000338292>

Dutheil, S., Ota, K., Wohleb, E., Rasmussen, K. & Duman, R. (2015). High Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation. *Neuropsychopharmacology*, 41(October), 1–30. <http://doi.org/10.1038/npp.2015.357>

Escobar, C., Martinez-Merlos, M., Angeles-Castellanos, M., Del Carmen Miñana, M. & Buijs, R.(2007). Unpredictable feeding schedules unmask a system for daily resetting of behavioural and metabolic food entrainment. *European*

Journal of Neuroscience, 26(10), 2804–2814. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05893.x>

Escobar, C., Salgado, R., Rodriguez, K., Blancas Vazquez, A., Angeles-Castellanos, M. & Buijs, R. (2011). Scheduled meals and scheduled palatable snacks synchronize circadian rhythms: Consequences for ingestive behavior. *Physiology and Behavior*, 104(4), 555–561. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.05.001>

Ferrario, C., Labouebe, G., Liu, S., Nieh, E., Routh, V., Xu, S. & O'Connor, E. (2016). Homeostasis Meets Motivation in the Battle to Control Food Intake. *Journal of Neuroscience*, 36(45), 11469–11481. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2338-16.2016>

Garcia, D. (2013). *El acceso aun bocadillo duce como modelo de adiccion en ratas: evidencias conductuales y nueroadaptativas. Tesis de licenciatura.* Universidad Nacional Autonoma de Mexico.

García Pardo M., Roger Sánchez, C., De la Rubia Ortí, J. (2017). Animal Models of Drug Addiction. *Adicciones.*, 24, 862. <http://doi.org/10.1385/0896032175>

Hatori, M., Vollmers, C., Zarrinpar, A., DiTacchio, L., Bushong, E., Gill, S., Panda, S. (2012). Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metabolism*, 15(6), 848–860. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.019>

Jansen, H., Sergeeva, A., Stark, G., & Sorg, B. (2012). Circadian Discrimination of Reward: Evidence for Simultaneous Yet Separable Food- and Drug-Entrained Rhythms in the Rat. *Chronobiology International*, 29(4), 454–468. <http://doi.org/10.3109/07420528.2012.667467>

John Lin, C., Yu, K., Hatcher, A., Huang, T, Lee, H., Carlson, J.,Deneen, B. (2017). Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nature Neuroscience*, 20(3). <http://doi.org/10.1038/nn.4493>

Johnson, P., & Kenny, P. (2010). Dopamine D2 receptors in addiction-like reward

- dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nature Neuroscience*, 13(5), 635–641. <http://doi.org/10.1038/nn.2519>
- Kohsaka, A., Laposky, A., Ramsey, K., Estrada, C., Joshu, C., Kobayashi, Y., Bass, J. (2007). High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. *Cell Metabolism*, 6(5), 414–421. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.09.006>
- Koob, G. (2014). Frameworks of Alcohol Addiction: Alcohol Addiction as a Reward Deficit and Stress Surfeit Disorder. *Neurobiology of Alcohol Dependence*, 4(August), 3–28. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-405941-2.00001-8>
- Koob, G. & Le Moal, M. (2008). Addiction and the Brain Antireward System. *Annual Review of Psychology*, 59(1), 29–53. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093548>
- Koob, G. & Volkow, N.(2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217–238. <http://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- Koob, G., & Volkow, N. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(8), 760–773. [http://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](http://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Leigh, S., & Morris, M. (2016). The role of reward circuitry and food addiction in the obesity epidemic: An update. *Biological Psychology*. <http://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2016.12.013>
- Leigh, S., & Morris, M. (2016). Epidemic: An update. *Biological Psychology*. <http://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2016.12.013>
- Llc, C.. (2001). *Methods of BEHAVIOR ANALYSIS in NEUROSCIENCE*. New York (Vol. 3). [http://doi.org/10.1016/0005-7916\(93\)90032-R](http://doi.org/10.1016/0005-7916(93)90032-R)
- Lobo, M., Zaman, S., Damez-Werno, D., Koo, J., Bagot, R., DiNieri, J. Nestler, E. (2013). Δ FosB induction in striatal medium spiny neuron subtypes in response

- to chronic pharmacological, emotional, and optogenetic stimuli. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(47), 18381–95. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1875-13.2013>
- Madsen, H., Brown, R. & Lawrence, A. (2012). Neuroplasticity in addiction: cellular and transcriptional perspectives. *Front Mol Neurosci*, 5(November), 99. <http://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00099>
- Madsen, H., Brown, R., Lawrence, A., McClung, C., Nestler, E., Nennig, S., Morales, M. (2013). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Alcohol and Alcoholism*, 12(11), 712–725. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046>
- McClung, C., & Nestler, E. (2003). Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat Neurosci*, 6(11), 1208–1215. <http://doi.org/10.1038/nn1143>
- Mendoza, J., Angeles-Castellanos, M. & Escobar, C. (2005). Entrainment by a palatable meal induces food-anticipatory activity and c-Fos expression in reward-related areas of the brain. *Neuroscience*, 133(1), 293–303. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.01.064>
- Mendoza, J., Pévet, P., & Challet, E. (2008). High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *The Journal of Physiology*, 586(Pt 24), 5901–10. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.159566>
- Meule, A. (2015). Back by Popular Demand : A Narrative, 88, 295–302.
- Mistlberger, R. (2009). Food-anticipatory circadian rhythms: Concepts and methods. *European Journal of Neuroscience*, 30(9), 1718–1729. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06965.x>
- Morin, J., Rodríguez-durán, L., Guzman-ramos, K., Perez-cruz, C., Diaz-Cintra, S., & Pacheco-Lopez, G. (2017). Palatable hyper-caloric foods impact on neuronal plasticity. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11(February), 1–11. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00019>

- Murray, J., Belin-Rauscent, A., Simon, M., Giuliano, C., Benoit-Marand, M., Everitt, B., & Belin, D. (2015a). Basolateral and central amygdala differentially recruit and maintain dorsolateral striatum-dependent cocaine-seeking habits. *Nature Communications*, *6*, 10088. <http://doi.org/10.1038/ncomms10088>
- Murray, S., Kroll, C., & Avena, N. (2015b). Food and addiction among the ageing population. *Ageing Research Reviews*, *20*, 79–85. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2014.10.002>
- Narita, M., Suzuki, M., Kuzumaki, N., Miyatake, M., & Suzuki, T. (2008). Implication of activated astrocytes in the development of drug dependence: Differences between methamphetamine and morphine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1141*, 96–104. <http://doi.org/10.1196/annals.1441.032>
- Nestler, E. (2008). Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *363*(October), 3245–3255. <http://doi.org/10.1098/rstb.2008.0067>
- Oswald, K., Murdaugh, D., King, V., & Boggiano, M. (2011). Motivation for palatable food despite consequences in an animal model of binge eating. *International Journal of Eating Disorders*, *44*(3), 203–211. <http://doi.org/10.1002/eat.20808>
- Pankevich, D., Teegarden, S., Hedin, A., Jensen, C. & Bale, T. (2010). Caloric Restriction Experience Reprograms Stress and Orexigenic Pathways and Promotes Binge Eating. *Journal of Neuroscience*, *30*(48), 16399–16407. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1955-10.2010>
- Pecoraro, N., Gomez, F., Laugero, K., & Dallman, M. (2002). Brief access to sucrose engages food-entrainable rhythms in food-deprived rats. *Behav Neurosci*, *116*(5), 757–776. <http://doi.org/10.1037//0735-7044.116.5.757>
- Pendergast, J., Branecky, K., Yang, W., Ellacott, K., Niswender, K., & Yamazaki, S. (2013). High-fat diet acutely affects circadian organisation and eating behavior. *European Journal of Neuroscience*, *37*(8), 1350–1356.

<http://doi.org/10.1111/ejn.12133>

Perez-Alvarez, A., Navarrete, M., Covelo, A., Martin, E., & Araque, A. (2014). Structural and functional plasticity of astrocyte processes and dendritic spine interactions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *34*(38), 12738–44. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2401-14.2014>

Perrotti, L., Weaver, R., Robison, B., Renthal, W., Maze, I., Yazdani, S. (2009). NIH Public Access, *62*(5), 358–369. <http://doi.org/10.1002/syn.20500>. Distinct

Pirttimaki, T., & Parri, H. (2013). Astrocyte plasticity: implications for synaptic and neuronal activity. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, *19*(6), 604–15. <http://doi.org/10.1177/1073858413504999>

Robinson, T., & Kolb, B. (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse, *47*, 33–46. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.06.025>

Robison, A., & Nestler, E. (2011). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*(11), 623–637. <http://doi.org/10.1038/nrn3111>

Rogers, P. (2017). Food and drug addictions: Similarities and differences. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *153*, 182–190. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.01.001>

Rossi, D. (2012). Astrocytes join the plasticity party. *Nature Neuroscience*, *15*(5), 649–651. <http://doi.org/10.1038/nn.3095>

Russo, S., & Nestler, E. (2014). The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(9), 1–34. <http://doi.org/10.1038/nrn3381>. The

Salgado-Delgado, R., Angeles-Castellanos, M., Buijs, M., & Escobar, C. (2008). Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. *Neuroscience*, *154*(3), 922–931.

<http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.066>

Salgado-Delgado, R., Saderi, N., Basualdo, M., Guerrero-Vargas, N., Escobar, C., & Buijs, R. (2013). Shift Work or Food Intake during the Rest Phase Promotes Metabolic Disruption and Desynchrony of Liver Genes in Male Rats. *PLoS ONE*, 8(4). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0060052>

Sharma, S., Fernandes, M., & Fulton, S. (2013). Adaptations in brain reward circuitry underlie palatable food cravings and anxiety induced by high-fat diet withdrawal. *International Journal of Obesity*, 37(9), 1183–1191. <http://doi.org/10.1038/ijo.2012.197>

Shin, A., Townsend, R., Patterson, L., & Berthoud, H. (2011). “Liking” and “wanting” of sweet and oily food stimuli as affected by high-fat diet-induced obesity, weight loss, leptin, and genetic predisposition. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(5), R1267–R1280. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00314.2011>

Sirohi, S., Van Cleef, A., & Davis, J. (2016). *Patterned feeding induces neuroendocrine, behavioral, and genetic changes that promote palatable food intake. International Journal of Obesity*. Nature Publishing Group. <http://doi.org/10.1038/ijo.2016.235>

Sofroniew, M. & Vinters, H. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <http://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>

Teegarden, S., Nestler, E., & Bale, T. (2008). Delta FosB-Mediated Alterations in Dopamine Signaling Are Normalized by a Palatable High-Fat Diet. *Biological Psychiatry*, 64(11), 941–950. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.06.007>

Teegarden, S., Nestler, E., & Bale, T. (2009). NIH Public Access, 64(11), 941–950. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.06.007>.

Valdes, J. (2010). The histaminergic tuberomammillary nucleus is critical for motivated arousal. *European Journal of Neuroscience*, 31(11), 2073–2085. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07241.x>

- Valtcheva, S. & Venance, L. (2016). Astrocytes gate Hebbian synaptic plasticity in the striatum. *Nature Communications*, 7, 13845. <http://doi.org/10.1038/ncomms13845>
- Van der Vinne, V., Akkerman, J., Lanting, G., Riede, S. J., & Hut, R. (2015). Food reward without a timing component does not alter the timing of activity under positive energy balance. *Neuroscience*, 304, 260–265. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.061>
- Vanderschuren, L., & Ahmed, S. (2013). Animal studies of addictive behavior. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(4), 1–14. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a011932>
- Vanderschuren, L., & Everitt, B. (2004). Drug Seeking Becomes Compulsive After Prolonged Cocaine Self-Administration. *Science*, 305(5686), 1017–1019. <http://doi.org/10.1126/science.1098975>
- Venniro, M., Caprioli, D. & Shaham, Y. (2016). *Animal models of drug relapse and craving: From drug priming-induced reinstatement to incubation of craving after voluntary abstinence. Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 224). Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.08.004>
- Volkow, N., Koob, G., & McLellan, A. (2016). Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *The New England Journal of Medicine*, 374(4), 363–71. <http://doi.org/10.1056/NEJMra1511480>
- Volkow, N., & Morales, M. (2015). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, 162(4), 712–725. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046>
- Volkow, N., Wang, G., Tomasi, D., & Baler, R. (2013). The Addictive Dimensionality of Obesity. *Biological Psychiatry*, 73(9), 811–818. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.12.020>
- Wang, Z., Martin, J., Gancarz, A., Adank, D., Sim, F., & Dietz, D. (2017). Activin A is increased in the nucleus accumbens following a cocaine binge. *Scientific Reports*, 7(January), 43658. <http://doi.org/10.1038/srep43658>

- Webb, I. (2017). Circadian Rhythms and Substance Abuse: Chronobiological Considerations for the Treatment of Addiction. *Current Psychiatry Reports*, 19(2), 12. <http://doi.org/10.1007/s11920-017-0764-z>
- Westwater, M., Fletcher, P., & Ziauddeen, H. (2016). Sugar addiction: the state of the science. *European Journal of Nutrition*, 55(s2), 1–15. <http://doi.org/10.1007/s00394-016-1229-6>
- White, C., Pistell, P., Purpera, M., Gupta, S., Fernandez-Kim, S., Hise, T., Bruce-Keller, A. (2009). Effects of high fat diet on Morris maze performance, oxidative stress, and inflammation in rats: Contributions of maternal diet. *Neurobiology of Disease*, 35(1), 3–13. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.04.002>
- WHO. (2016). Worldwide Obesity and Overweight. World Health Organization. <http://www.who.int/en/>