



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS**

**“LA CONDUCTA DE ATRACÓN SE VE INFLUENCIADA  
POR LA HORA DE ADMINISTRACIÓN: EFECTOS EN LA  
VÍA MESOLÍMBICA”**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:**

**RODRIGO IVAN OSNAYA RAMIREZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES**

**COMITÉ TUTOR**

**DRA. MILAGROS MENDEZ UBACH**

**INSTITUTO NACIONAL RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ**

**DR. OSCAR PROSPERO GARCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**CIUDAD DE MEXICO, MARZO, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis recibió apoyo del proyecto PAPIIT-UNAM IG- y del CONACyT 239403, ambos asignados a la Dra Carolina Escobar.

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, CONACYT No. de becario. 299096

Los experimentos fueron aprobados por el comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina UNAM con el número 141/2014.

## Indice

RESÚMEN.....	1
Abstract.....	2
<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>3</b>
1.1. TRASTORNO DE ATRACÓN .....	4
1.2. EL SISTEMA HOMEOSTÁTICO Y HEDÓNICO PARA LA INGESTIÓN DE ALIMENTOS .....	5
1.3. MODELOS ANIMALES DEL TRASTORNO DE ATRACÓN .....	7
1.4. CAMBIOS EN EL SISTEMA NERVIOSO OBSERVADOS EN MODELOS DE CA.....	8
1.5. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO Y GLUTAMATÉRGICO EN EL ATRACÓN A SACAROSA ..	11
1.6. EFECTOS DE LA HORA DE ALIMENTACIÓN EN LA CA .....	13
1.7. EL SISTEMA CIRCADIANO .....	14
1.8. EL SISTEMA CIRCADIANO Y SU RELACIÓN CON EL SISTEMA MESOCORTICOLÍMBICO .....	15
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>20</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
3.1. OBJETIVOS PARTICULARES .....	21
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>21</b>
4.1. HIPÓTESIS PARTICULARES .....	21
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
5.1. ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES .....	22
5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	22
5.3. EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA DE ATRACÓN, INGESTIÓN DE ALIMENTO Y AGUA .....	25
5.4. MONITOREO DE LOS RITMOS DIARIOS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA .....	25
5.5. MONITOREO DE LA TEMPERATURA CORPORAL .....	26
5.6. OBTENCIÓN DE TEJIDO E INMUNOHISTOQUÍMICA.....	27
5.7. CONTEO CELULAR .....	28
5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
6.1. LA CA PARA SACAROSA O ALIMENTO ESTÁNDAR ES DEPENDIENTE DE LA HORA DE ACCESO.....	30
6.2. ESCALAMIENTO EN LA CONDUCTA DE ATRACÓN .....	35
6.3. ACTIVIDAD ANTICIPATORIA AL ACCESO DE SACAROSA Y/O ALIMENTO.....	36
6.4. ANTICIPACIÓN EN LA TEMPERATURA CENTRAL AL ACCESO AL ALIMENTO O A SACAROSA .....	37
6.5. LAS CÉLULAS TH-POSITIVAS EN EL ATV NO MOSTRARON CAMBIOS DESPUÉS DEL ACCESO A ALIMENTO Y SACAROSA TANTO DURANTE EL DÍA COMO DURANTE LA NOCHE.....	40
6.6. LA DENSIDAD ÓPTICA DEL RECEPTOR D <sub>1</sub> EN EL NA CORE AUMENTO EN LOS GRUPOS CON ARA+SAC ...	40
6.7. EL NÚMERO DE CÉLULAS GLUR <sub>1</sub> POSITIVAS NO SE MODIFICÓ EN RESPUESTA A LAS MANIPULACIONES EXPERIMENTALES .....	42
6.8. EVALUACIÓN DE LOS SIGNOS DE CA EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES .....	43
<b>7. DISCUSION .....</b>	<b>44</b>
7.1. LA CA PARA SACAROSA Y ALIMENTO ESTÁNDAR MUESTRA CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES.....	44
7.2. LA CA PARA LA COMIDA Y SACAROSA ESTÁ INFLUENCIADA POR EL CICLO DIA-NOCHE .....	45
7.3. EFECTOS DE LA CA EN LA VÍA MESOLÍMBICA .....	48
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>9. ANEXOS Y TABLAS .....</b>	<b>53</b>
<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>55</b>



## ABREVIATURAS

AA	Actividad de anticipación
ANOVA	Análisis de varianza
ARA	Acceso restringido al alimento
ATV	Área Tegmental Ventral
BN	Bulimia nerviosa
CA	Conducta de atracón
CPF	Corteza prefrontal
CTRL	Control
D	Manipulación durante el día
D1	Receptor de Dopamina D1
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
GLUR1	Subunidad glur1 del receptor AMPA
HL	Hipotálamo lateral
KO	Knock out
LD	Luz-oscuridad
MR	Medidas repetidas
N	Manipulación durante la noche
NA	Núcleo Accumbens
NPY	Neuropéptido Y
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
PB	Buffer fosfatos
PKA	Proteína cinasa A
SAC	Sacarosa
TA	Trastorno de atracón
TCA	Trastornos de la conducta alimentaria
TH	Tirosina hidroxilasa
ZT	Zeitgeber, Tiempo circadiano

## RESUMEN

El trastorno de atracón es un problema de la conducta alimentaria que conduce al sobrepeso y la obesidad. En los modelos animales, la conducta de atracón (CA) se define como el consumo excesivo en un intervalo breve de tiempo y en animales experimentales se desarrolla como un aumento progresivo de la ingesta de alimento durante el intervalo restringido a lo largo de los días. Puede ser desencadenado por el acceso restringido al alimento estándar o a alimentos apetitosos y se sugiere que la liberación de dopamina del Área Tegmental Ventral (ATV) al Núcleo Acumbens (NA) estimula esta conducta. Diversos componentes del sistema dopaminérgico, así como la ingesta de alimento presentan en su función diferencias día-noche (circadianas), lo que sugiere una regulación por parte del sistema circadiano.

**Objetivos:** Este estudio exploró si la CA exhibe un patrón día-noche, si la CA a sacarosa requiere combinarse con una restricción de alimento. Se exploró si los cambios conductuales asociados a la CA están asociados con las células productoras de dopamina que contienen tirosina hidroxilasa (TH) en el ATV y con la expresión de los receptores D1 y GLUR1 en el NA.

**Resultados:** Se observó que la CA a la comida depende directamente de una condición de restricción, mientras que la CA para la sacarosa depende solamente del acceso restringido a sacarosa y no requiere de asociarse a la restricción de alimento. Ambos tipos de CA fueron independientes entre sí y ambos mostraron un patrón día-noche con mayor intensidad durante la noche, que es la fase de actividad en la rata. La CA fue precedida por actividad de anticipación, excepto para el grupo ARA-noche. No se observó una asociación entre la CA y el número de células positivas a TH en el ATV, ni a GLUR1 en el NA. Se encontró un aumento de la densidad óptica de los receptores D1 en animales expuestos a la combinación de ARA y sacarosa.

**Conclusión:** Los resultados señalan la importancia de los horarios para comer, resaltando una mayor vulnerabilidad al desarrollo de CA durante la fase de actividad.



## **ABSTRACT**

Binge eating behavior (BEB) is an eating disorder leading to overweight and obesity. In animal models, BEB is defined as overconsumption in a brief time interval and it develops as a progressive increase in food intake during the interval of food access along the days. It is triggered by restricting access to regular chow or to palatable food and is associated with dopamine release from the Ventral Tegmental Area (VTA) to Nucleus Accumbens (NA). Dopamine function, as well as food intake exhibit day-night differences, suggesting regulation by the circadian system.

**Objectives:** This study explored whether BEB exhibits a day-night pattern and whether BEB to sucrose required to be associated with restricted food access. This study also explored whether behavioral changes are associated with TH cells in the VTA, with the expression of D1 and GLUR1 receptors in the NA.

**Results:** Present data indicate that BEB for chow is directly dependent on restricted food access, while BEB for sucrose depends on restricted access to sucrose. Both types of BEB were independent of each other and both exhibited a day-night pattern with increased intensity during the active phase (the night for Wistar rats). BEB was preceded by anticipatory activation, except for the RFA during the day. No effects associated with BEB were observed in the number of positive cells to TH in the VTA, nor to GLUR1 in the NA. Increased optical density for D1 receptors was found in animals exposed to the combination of RFA and sucrose.

**Conclusion:** Present results point out the importance of time schedules to eat, highlighting an increased vulnerability to developing BEB during the active phase.

## 1. Introducción

Los trastornos de la conducta alimentaria son un problema de salud pública, su etiología puede ser variable y pueden desencadenar problemas graves de salud y psicológicos. El trastorno alimenticio más recurrente es el trastorno de atracón (TA), presentándose en aproximadamente 5% de la población en los Estados Unidos y en el 1% de la población a nivel mundial. El TA se caracteriza por el consumo de grandes cantidades de alimento en un periodo breve de tiempo, regularmente acompañado por sentimientos de pérdida de control y de culpa ante el evento.

Diversos factores han sido descritos en la literatura como posibles desencadenantes del TA; eventos tempranos durante el desarrollo, exposición a eventos estresantes, acceso a alimento altamente energético/apetitoso y la restricción de alimento producida por periodos de dieta. Es por esto que se ha tratado de modelar experimentalmente en animales el TA a través de la conducta de atracón (CA) para poder dilucidar las posibles causas y consecuencias, así como los mecanismos neurobiológicos que le subyacen, para así poder generar nuevas alternativas de prevención y tratamiento.

Se ha descrito ampliamente en la literatura la relación entre la CA y dos sistemas cerebrales, el sistema homeostático (hipotalámico) de ingestión de alimentos y el sistema hedónico (vía mesocorticolímbica). Se propone que ambos sistemas podrían estar influyendo sobre la CA, por una parte el sistema hipotalámico de la regulación de alimento podría influir sobre el sobreconsumo de alimento tras largos periodos de restricción de alimento, mientras que el sistema mesocorticolímbico a través de la neurotransmisión dopaminérgica podría estar involucrado en los mecanismos de deseo/búsqueda (*“wanting”*) y reforzamiento (*“liking”*).

Otro factor que debe ser tomado en cuenta es que ambos sistemas mencionados anteriormente se encuentran bajo la influencia del sistema circadiano, siendo resultado de esto que la mayor parte la ingestión de alimentos se da principalmente durante el periodo de actividad en los animales, en este mismo intervalo de tiempo es cuando los animales muestran más conductas dirigidas a obtener reforzadores naturales y artificiales.

El presente trabajo explora el efecto del acceso restringido al alimento y de los horarios de administración de sacarosa sobre la conducta de atracón, así como los efectos en la vía mesocorticolímbica a nivel de los receptores de dopamina D1

(DR1) y en la subunidad GLUR1 del receptor a glutamato (AMPA) y de la proteína tirosina hidroxilasa (TH).

### **1.1. Trastorno de atracón**

Los trastornos de la conducta alimentaria (TCA) son un problema de salud pública de gran interés tanto para investigadores de ciencia básica como para los clínicos. La etiología de los TCA puede ser variable, en donde los factores psicológicos, sociales y biológicos pueden tener una gran influencia para promover su desarrollo.

Los TCA se caracterizan por la alteración de los hábitos alimenticios y la preocupación de la imagen corporal, lo cual puede resultar en problemas clínicamente significativos en la salud y la funcionalidad psicosocial (Fairburn and Harrison, 2003). Dentro de los trastornos alimenticios más comunes, se encuentra la anorexia nerviosa (AN), la bulimia nerviosa (BN) y el trastorno por atracón (TA). La prevalencia del TA de acuerdo a un estudio de Kinzl et al. (1997) es de 3.3% para la población femenina mientras que para la población masculina la prevalencia es de 0.8% (Kinzl et al., 1999). En la población estadounidense se ha demostrado que el TA es 1.5 veces más común en las mujeres que en hombres (Hudson et al., 2008), resultados similares se han obtenido en otras poblaciones (Kjelsås et al., 2004).

El TA se caracteriza por episodios recurrentes de ingestión de una gran cantidad de alimentos en un periodo corto de tiempo en comparación con el consumo habitual. Dichos episodios suelen estar acompañados de un sentimiento de pérdida de control (American Psychiatric Association, 2013). Una persona que padece TA consume rápidamente alimentos independientemente de la saciedad, expresan sentimientos de culpa y pérdida de control, para ser diagnosticado con TA, el paciente debe presentar episodios al menos una vez a las semana en un periodo de tres meses.

La importancia de estudiar el TA radica en que el 76% de los adultos y el 85% de los adolescentes con TA presentan también otros desórdenes psiquiátricos

como ansiedad, trastornos del estado de ánimo y abuso de sustancias (Hudson et al., 2008). Aproximadamente 35% de la población que padece de TA es obesa (Hudson et al., 2008) y pueden presentar mayor riesgo a padecer de hipertensión, dislipidemia, o diabetes tipo 2 (Marcus and Wildes, 2009) (Hudson et al., 2010).

La evidencia sugiere que la aparición del TA es inducida por la restricción alimenticia acompañada de estados afectivos negativos, como estrés, ansiedad etc., de tal forma que un sujeto con historial de periodos de dieta aunado a un ambiente estresante es más propenso a desarrollar TA (Wolff et al., 2000) (Stice et al., 2000). De acuerdo a lo anterior se propone que la recurrente restricción de alimentos es el predictor más consistente del sobreconsumo de alimentos en respuesta a estresores.

Un aspecto crítico del TA en humanos es la notable preferencia que se tiene hacia los alimentos altos en grasas y azúcares (Weltzin et al., 1991).

## **1.2. El sistema homeostático y hedónico para la ingestión de alimento**

La ingestión de alimentos está guiada principalmente por la necesidad de mantener un balance energético. Las señales que desencadenan la búsqueda de alimento se originan tanto a nivel del sistema nervioso central: en núcleos hipotalámicos, como a nivel de la periferia con hormonas como leptina y grelina (Lutter and Nestler, 2009). En el caso de las hormonas antes mencionadas, la leptina es secretada por el tejido adiposo para suprimir la ingestión de alimento (Zigman and Elmquist, 2003), mientras que la grelina es un péptido liberado por el estómago ante un balance energético negativo, estimulando así la ingestión de alimento y el almacenamiento de energía (Zigman and Elmquist, 2003).

A pesar de que los receptores de grelina y de leptina se encuentran expresados en gran parte del cuerpo y del sistema nervioso central, el núcleo Arqueado del hipotálamo es un sitio de principal interés, por encontrarse en un área libre de barrera hematoencefálica, lo cual le permite ejercer un papel relevante en la regulación de la alimentación y el metabolismo ante las señales hormonales de

los órganos de la periferia (Saper et al., 2002). El núcleo arqueado establece un circuito de interacción con otras estructuras hipotalámicas que también están involucradas en la ingestión de alimento, tales como: Hipotálamo lateral, Hipotálamo Dorsomedial y el Hipotálamo Ventromedial (Saper et al., 2002). Este circuito determina los estados de hambre/saciedad y coordina el metabolismo energético, para procurar el adecuado balance entre ingestión de alimento y saciedad, recibe señales de diversas hormonas y péptidos secretados en la periferia: Insulina, Péptido similar al glucagón y adiponectina (Méquinion et al., 2013).

Además del sistema hipotalámico (homeostático), el sistema hedónico, principalmente la vía mesocorticolímbica, participa en la regulación de la alimentación. Las hormonas leptina y grelina ejercen sus efectos directamente sobre áreas encargadas de la motivación para obtener alimento. Diversos estudios han demostrado en ratas que ante el consumo de alimento, la leptina liberada ante el consumo, disminuye la liberación basal de dopamina del Área Tegmental Ventral (ATV) así como la liberación de dopamina hacia el Núcleo Accumbens (NAc) (Krügel et al., 2003), mientras que otras investigaciones sugieren que la liberación de dopamina en el NAc podría estimularse por la administración de grelina (Abizaid et al., 2006).

La relevancia de la dopamina para estimular la alimentación se ha puesto en evidencia con un estudio reciente que demostró que los animales *knock-out* (KO) de TH (con incapacidad de sintetizar dopamina) mueren rápidamente por la falta de ingestión de alimentos y que la restauración en la producción de dopamina mediante terapia génica restablece la alimentación (Szczyepka et al., 2001).

El mecanismo a través del cual el NAc influye directamente sobre la alimentación aún no es bien entendido. Se ha descrito que el NAc tiene interacciones recíprocas con el Hipotálamo Lateral (HL), del cual se ha comprobado su papel en la conducta de alimentación (Phillipson and Griffiths, 1985). Por otra parte se ha demostrado que la transmisión Dopaminérgica en el núcleo Accumbens

puede cumplir un papel fundamental en los aspectos instrumentales que llevan a la búsqueda de alimento, si bien la depleción de Dopamina en el NAc no disminuye ni la ingestión de alimento ni la búsqueda de alimento, si disminuye la motivación por conseguirlo, esto demostrado a través de pruebas operantes (Salamone et al., 2003).

### **1.3. Modelos animales del Trastorno de atracón (conducta de atracón).**

Los modelos animales de conducta de atracón (CA) ofrecen una oportunidad para elucidar la etiología y mecanismos de este tipo de desorden alimenticio con la finalidad de encontrar tratamientos clínicos. Un factor de gran importancia en la etiología y modelos de la CA es la privación de alimento generada por periodos de dieta. Por ello, en la literatura se ha explorado la privación de alimento y la pérdida de peso que le acompaña, como factores inductores de la búsqueda de estímulos apetitivos (Carr, 2002).

En un estudio de Cottone y cols. (Cottone et al., 2008) se propone que el acceso restringido a alimento altamente apetecible (durante 10 minutos) lleva a la disminución en el consumo de alimento estándar de laboratorio (hipofagia) e incrementa el consumo del alimento apetitivo (hiperfagia), llevando a los animales a consumir hasta un 40% de las kilocalorías diarias en un periodo de 10 minutos.

Avena y cols. (Avena et al., 2009) utilizan otro modelo de restricción de alimento para generar CA en rata, en este protocolo las ratas son sometidas durante 21 días a 12 horas de privación de alimento seguidas de 12 horas de acceso a una solución de sacarosa al 10% acompañada de alimento estándar de laboratorio. Han encontrado que aquellas ratas con el régimen de privación de alimento aunado a sacarosa, presentan un atracón a sacarosa desde los primeros días del protocolo. Con este modelo Avena reporta efectos a nivel neuroquímico del sistema nervioso central, que se mencionaran más adelante.

En un estudio de nuestro grupo (Ángeles-Castellanos et al., 2007) enfocado a la sincronización por alimento, se encontraron características similares a las

encontradas en los modelos antes mencionados de atracón. Se realizó un protocolo de sincronización al alimento, con privación de alimento de 22 horas y acceso al alimento estándar solo dos horas a la mitad de la fase de luz durante 21 días, encontrando que ante este protocolo las ratas llegaban a consumir hasta 22 gramos de dieta estándar en dos horas (lo cual equivale aproximadamente al 50-60% de su consumo total diario (Nistiar et al., 2012)).

Por otra parte Chausse y cols. (Chausse et al., 2014) desarrollaron un protocolo de privación intermitente de alimento, en donde a lo largo de 21 días los animales fueron expuestos a ciclos de privación-realimentación para posteriormente retirarles el alimento por completo durante 1 día y al siguiente día se les regresaba. Encontraron que aquellos animales bajo la condición de ciclos de privación-realimentación consumían hasta 14 gramos (aproximadamente al 40% de su consumo total diario) de alimento estándar en una hora, cuando el alimento les era entregado.

#### **1.4. Cambios en el sistema nervioso observados en modelos de CA**

Con el modelo de restricción de alimento y acceso a sacarosa de Avena (Avena, 2010) se han reportado cambios en diversos procesos del sistema de regulación hedónica:

- Incremento en la liberación de Dopamina (DA) en el Núcleo Accumbens (NAc) (Rada et al., 2005; Avena et al., 2006).
- Incremento en la unión a ligando de receptores D1 en el NAc (ligando usado [<sup>3</sup>H]SCH23390) (Colantuoni et al., 2001).
- Decremento en la unión a ligando de receptores D2 en el estriado (ligando usado [<sup>125</sup>I] Iodosulpride) [34].

Koban y cols. (Koban et al., 2008) describieron en un modelo de CA un incremento en los niveles de ARNm de neuropeptido Y (NPY) en el núcleo arqueado, es bien sabido el papel del NPY en la regulación del balance energético y el apetito. Confirmando que en la CA pueden intervenir tanto en los aspectos

hedónicos o motivantes del alimento, así como los procesos homeostáticos que controlan la conducta de ingestión de alimento, y que ambos sistemas podrían estar regulando la CA.

Previos estudios de nuestro grupo han explorado los efectos del acceso restringido a alimento apetitoso sobre ambos sistemas (homeostático y hedónico). Mendoza et al. (2005) en un protocolo de sincronización al alimento, administraron 5 gr. de chocolate a ratas de forma diaria durante 21 días a la mitad de la fase de descanso, reportaron un incremento de la proteína c-Fos en el NAc en su región shell y core, en la corteza prefrontal y en la amígdala central previo a la hora de la entrega del chocolate. Esta activación neuronal persistió hasta por 7 días posteriores a la interrupción de la entrega del chocolate. Cabe destacar que las 45 kilocalorías correspondientes a los 5 gramos que consumía la rata en un intervalo breve, equivalen al 50% de su consumo diario, representando así un evento de atracón.

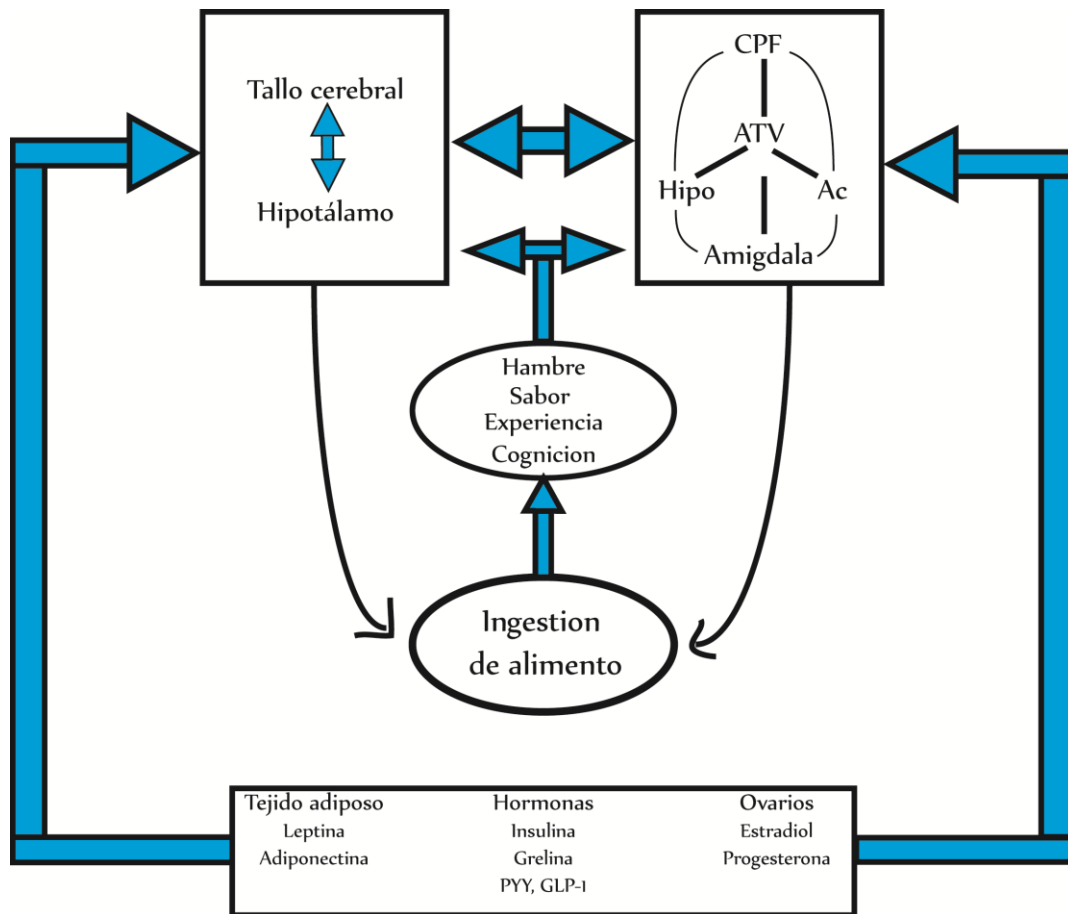
Además Ángeles-Castellanos en 2008 realizó la medición de genes reloj que intervienen en la maquinaria molecular que informa acerca del tiempo en las células y en áreas del sistema de recompensa, en el mismo modelo usado por Mendoza en 2005, encontrando que los ciclos diarios de expresión de la proteína PER1 se sincronizan a la hora de la entrega del chocolate, lo cual sugiere que este componente del reloj molecular podría tener un papel en el atracón a chocolate que se observa en este modelo. Los datos obtenidos por nuestro laboratorio sugieren que tanto el alimento apetitoso, sin necesidad de privación de alimento, como la privación de alimento por si sola son factores inductores de la CA, y que ambos sistemas (homeostático y hedónico) podrían tener una participación en el trastorno.

En un estudio de Johnson y Kenny en 2010 (Johnson and Kenny, 2010) se encontró que el número de receptores de dopamina D2 en NAc correlacionaba negativamente con el índice de masa corporal de las ratas que habían sido sometidas a un protocolo de acceso a dieta apetitosa. Además los animales con historia de acceso a dieta apetitosa mostraban un mayor umbral de reforzamiento



en una prueba de estimulación intracraneal, demostrando que el consumo de dietas apetitosas puede influir sobre el sistema dopaminérgico, incrementando el umbral de reforzamiento en estructuras como el NAc.

Los modelos animales de atracón a pesar de explorar aspectos diferentes de los trastornos muestran ciertas características en común; como las alteraciones a nivel hipotalámico y a nivel del circuito de recompensa en especial en la vía mesocorticolímbica (ATV-NAc-CPF). Mequinion et al (Méquinion et al., 2013) recopilaron información con respecto a los trastornos alimenticios y la neurobiología detrás de estos trastornos, lo cual se muestra en la figura 1. Se puede observar de forma resumida los factores secretados en la periferia por ciertos órganos o glándulas que pueden tener impacto tanto sobre el sistema homeostático y el sistema hedónico, y que ambos sistemas son capaces de generar las señales de hambre-saciedad, la experiencia de palatabilidad de cierto alimento, e incluso los estados de ánimo intervienen en la percepción que se puede tener de hambre.



**Figura 1. Esquema que muestra las relaciones entre el sistema homeostático de alimentación y el sistema hedónico involucrados en la CA.** El cerebro “hedónico” está conformado principalmente por el sistema mesocorticolímbico, el cual incluye al Área Tegmental Ventral, el Nucleo Acumbens y la Corteza prefrontal (ATV, Ac, CPF). Las hormonas de la periferia que vienen del tejido adiposo, el tracto gastrointestinal, o los ovarios alcanzan estas áreas ya sea de forma directa o indirecta para activar tanto el sistema de balance energético (cerebro homeostático) como el hedonismo asociado a la ingestión de alimentos (cerebro hedónico), la información que llega a estos centros se asociara con hambre, saliencia de los alimentos, procesos de aprendizaje, estado de ánimo, o niveles de estrés. Ante un balance energético negativo la información de la periferia llevara a la ingestión de alimentos, una vez que se satisface la necesidad energética se comenzaran a producir las señales de saciedad tanto a nivel periférico como central, que reducirán el consumo de alimento. Modificado de Mequinion et al. 2013.

### 1.5. Participación del sistema dopaminérgico y glutamatérgico en el atracón a sacarosa

Dado que el factor en común para la mayoría de los protocolos de atracón es la privación de alimento, vale la pena resaltar el posible mecanismo neuronal a través del cual podría estar generando mayor susceptibilidad al consumo de dietas apetitosas como en el caso de la sacarosa.

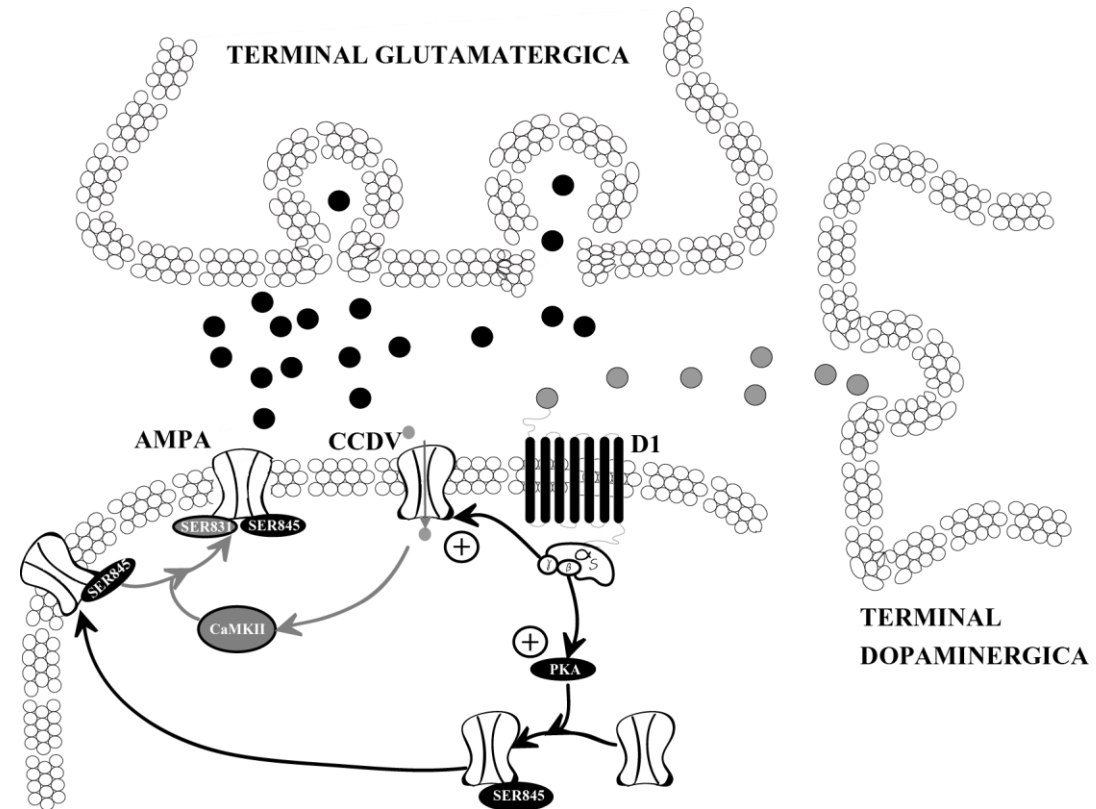
En un estudio pionero, Pothos y cols (1995), demostraron que exponer a ratas a privación de alimento hasta que perdieran un 25% de su peso corporal llevaba a una disminución en los niveles basales de dopamina en el NAc de hasta de un 50% comparados con el grupo control. De esta forma, la privación de alimento llevó a reducción de la síntesis de dopamina, a través de la inhibición de la actividad de la Tirosina Hidroxilasa (TH) (Pan et al., 2006).

Otro estudio sugirió que el sistema glutamatérgico podría estar interviniendo para modificar la actividad de las neuronas dopaminérgicas en el NAc. Carr y cols. (Carr, 2002) exploraron el papel del sistema glutamatérgico en las sinapsis dopaminérgicas del NAc. A un grupo de ratas sometidas a privación de alimento se les administró un agonista dopaminérgico de receptores DR1 (SKF-82958) o sacarosa y se determinaron los niveles de la proteína GluR1 (subunidad de los receptores AMPA) en el NAc. Dicha subunidad se encontraba incrementada en los animales que habían tenido privación de alimento y el agonista a D1, el mismo efecto se encontró a los animales que habían consumido sacarosa, lo cual sugiere que ambos sistemas de neurotransmisión podrían estar impactando a nivel de la post-sinapsis en una forma similar. (Carr et al., 2010).

En un estudio posterior de Tukey y cols. (Tukey et al., 2013), se pudo demostrar que el acceso a sacarosa promueve mayores niveles de la proteína GLUR1 de los receptores AMPA, y que el incremento en dicha subunidad es dependiente del consumo de sacarosa, el hecho de que esta proteína esté presente en la sinapsis, está relacionado con mayor probabilidad de que el canal AMPA se abra y pueda llevar a cambios neuronales que promuevan formación de nuevas sinapsis entre neuronas.

Los estudios antes descritos sugieren que en una sinapsis glutamatérgica-dopaminérgica del NAc, ante la liberación de dopamina del ATV (dado por sustancias de abuso o reforzadores naturales, como en el caso de sacarosa) se podrá observar un incremento de la fosforilación de la subunidad GluR1 que le permitirá al receptor AMPA anclarse a la membrana, y que esto a su vez podría

llevar a cambios neuroplásticos similares a los observados en la potenciación a largo plazo (Figura 2).



**Figura 2. Esquema que ejemplifica el modelo mediante el cual el receptor de Dopamina (D1R) facilita la fusión de los receptores AMPA a glutamato a la membrana celular.** 1. La estimulación de los D1R facilita el tráfico de los receptores AMPA (del citoplasma a la membrana) a través de la fosforilación mediada por la proteína cinasa PKA (sobre la serina 845) (flechas negras en el esquema). 2. La actividad prolongada de los receptores D1R incrementa la actividad de los canales de Calcio tipo L y promueve así la fosforilación mediada por CaMKII facilitando el anclaje de los receptores AMPA a la membrana (flechas grises). Modificado de Hudson et al. 2013.

## 1.6. Efectos de la hora de alimentación en la CA

En la literatura se propone que la liberación de dopamina, de glutamato y diversos componentes de estos sistemas de neurotransmisión podrían tener un patrón circadiano de actividad (Castaneda and Prado, 2004), es decir que los niveles de estos neurotransmisores varían a lo largo del día con ciclos aproximados de 24hrs. Además de que ha sido demostrado que diversas conductas relacionadas con la búsqueda de reforzadores tanto naturales como artificiales son

dependientes del momento del día en el cual los animales sean expuestos a los reforzadores (Abarca et al., 2002; Webb et al., 2009; Bainier et al., 2017). Por otra parte se ha demostrado que alteraciones del sistema circadiano son capaces de generar mayor susceptibilidad a desarrollar trastornos del estado de ánimo, problemas metabólicos y déficits cognitivos. Esto sugiere una regulación rítmica de los procesos antes mencionados, regulada de forma directa por el sistema circadiano.

### **1.7. El sistema circadiano**

El sistema circadiano está formado por un reloj central y osciladores, centrales y periféricos. El sistema circadiano le da la capacidad a cada individuo de expresar ciclos en su conducta y fisiología, con una temporalidad de aproximadamente 24 horas (Anders, 1982).

En los mamíferos el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ) es el reloj biológico que genera los ritmos circadianos, y transmite señales de ritmicidad a los demás osciladores para mantenerlos acoplados y oscilando en sincronía. El NSQ se sincroniza principalmente al ciclo luz-oscuridad (LD), lo que se conoce como sincronización fótica (Herzog et al., 1998). La sincronización se define como el proceso biológico en el cual el tiempo endógeno del reloj circadiano se ajusta al de una señal periódica externa (Roenneberg et al., 2015). Además del ciclo luz-oscuridad otros eventos cíclicos pueden influir sobre el sistema circadiano, entre ellos ciclos de temperatura, de alimentación y de actividad. Al ejercer su influencia sobre el reloj biológico se les considera sincronizadores no-fóticos.

Para transmitir la ritmicidad al resto del organismo, el NSQ proyecta hacia diversos núcleos hipotalámicos sobre los que impone ritmos de actividad neuronal y de actividad endocrina y de esta forma generar los ritmos circadianos endócrinos, neuroendócrinos y autonómicos (Buijs et al., 2003). Estudios neuroanatómicos han demostrado que las proyecciones del NSQ tienen como objetivo principalmente una

zona limitada de núcleos hipotalámicos, siendo uno de estos principales objetivos el núcleo paraventricular del hipotálamo, el área preóptica medial y el núcleo dorsomedial del hipotálamo. Diversas de las funciones fisiológicas reguladas por el NSQ están bajo el control de las proyecciones de dichos núcleos hacia neuronas del sistema nervioso simpático y parasimpático (Pfaff, 2013) y a través de procesos neuroendocrinos dependientes de estos núcleos.

La capacidad de las células del NSQ y de otras regiones hipotalámicas para oscilar depende de un sistema de genes reloj que interactúan para formar una actividad rítmica circadiana. Este sistema posee asas de retroalimentación positivas y negativas para la regulación de la expresión de diversos genes “reloj” (Dardente and Cermakian, 2007). El ciclo se inicia con las proteínas producto de los genes reloj Clock y Bmal1 que se unen formando complejos heterodiméricos y que estimulan la transcripción de los genes Periodo (Per1-3) y Criptocromo (Cry1-2). Los complejos formados por las proteínas de estos genes (PER y CRY) se acumulan en el núcleo de la célula para inhibir su propia transcripción a través de una acción en los complejos formados por CLOCK y BMAL1. La reactivación de Clock y Bmal1, para reiniciar un nuevo ciclo, ocurre horas más tarde después de que PER y CRY han sido degradados en el núcleo (Reppert and Weaver, 2002).

### **1.8. El sistema circadiano y su relación con el sistema mesocorticolímbico.**

Como ya se mencionó la respuesta hacia estímulos reforzantes presenta variaciones circadianas, siendo la fase de actividad en la que se encuentra una mayor respuesta hacia estos estímulos, ya sean reforzadores naturales (Webb et al., 2009; Bainier et al., 2017) o artificiales (Falcón and McClung, 2009; Webb et al., 2009; Parekh et al., 2015). Sleipness (Sleipness et al., 2007) propone un término llamado “recompensa potencial”, en el cual habla de una respuesta diferencial hacia estímulos recompensantes dependiendo de la hora del día, por ejemplo, la

respuesta es mayor en la noche para los animales nocturnos y durante el día para los animales diurnos.

Apoyando el concepto de recompensa potencial, Webb et al. 2009 demostraron que existía un patrón aparentemente circadiano en el condicionamiento de preferencia de lugar hacia reforzadores naturales (hembra receptiva) y no naturales (anfetaminas), encontrando que el mayor condicionamiento de preferencia de lugar se veía hacia la mitad de la fase de oscuridad, mientras que para anfetaminas se observaban dos picos, uno en la mitad de la fase de oscuridad y justo a la mitad de la fase de luz.

En un estudio realizado por Angeles-Castellanos et al. 2007, se realizó un protocolo de sincronización a alimento apetecible, el cual consistía en administrar 5 gr. de chocolate durante 21 días a un grupo de ratas experimentales. Se pudo observar que los animales que habían sido expuestos a acceso restringido a chocolate desarrollaban actividad de anticipación a la llegada del chocolate hasta 15 minutos previos a la entrega. Además de los efectos conductuales encontrados Angeles-Castellanos et al. 2007 demostró que la expresión de c-Fos se encontraba incrementada en áreas del sistema nervioso central, relacionadas con la recompensa; NAc, Amígdala central y Corteza Prefrontal (CPF) y que los ritmos diarios de la proteína PER1 se sincronizaban a la entrega del chocolate en las áreas antes mencionadas (Ángeles-Castellanos et al., 2007). Lo cual sugiere que un alimento apetecible es capaz de modificar no solo la actividad locomotora, sino también la actividad y los marcadores de temporalidad en áreas del circuito de recompensa.

Por otra parte, Baltazar et al. 2013, aportaron más evidencias acerca de los ritmos diarios de actividad en estas áreas del circuito de recompensa. En su estudio cuantificó la proteína c-Fos en NAc, ATV y CPF, encontrando que estas tres estructuras presentaban un patrón de expresión de c-Fos dependiente de la hora del día, con el punto más alto de esta proteína hacia la fase de oscuridad.

Baltazar describió que al lesionar la CPF se perdían estos ritmos diarios de la proteína c-Fos en el NAc, pero no en el ATV, lo cual abre la posibilidad de que la temporalidad del NAC dependa de su interacción con la CPF mientras que el ATV reciba información de forma directa o indirecta del NSQ.

Como se mencionó anteriormente una eferencia del reloj central, el NSQ, es hacia el tálamo paraventricular, y que este a su vez podría estar regulando la actividad rítmica del hipocampo, la amígdala, el septum, la corteza del cíngulo y el Nac, generando de esta forma los ritmos circadianos relacionados con la motivación, recompensa, algunos procesos cognitivos y la integración motora asociada a conductas motivadas. Otras posibles eferencias del NSQ hacia estructuras límbicas son el área pre-óptica medial, el hipotálamo dorsomedial y la habénula lateral (Moore et al., 2002).

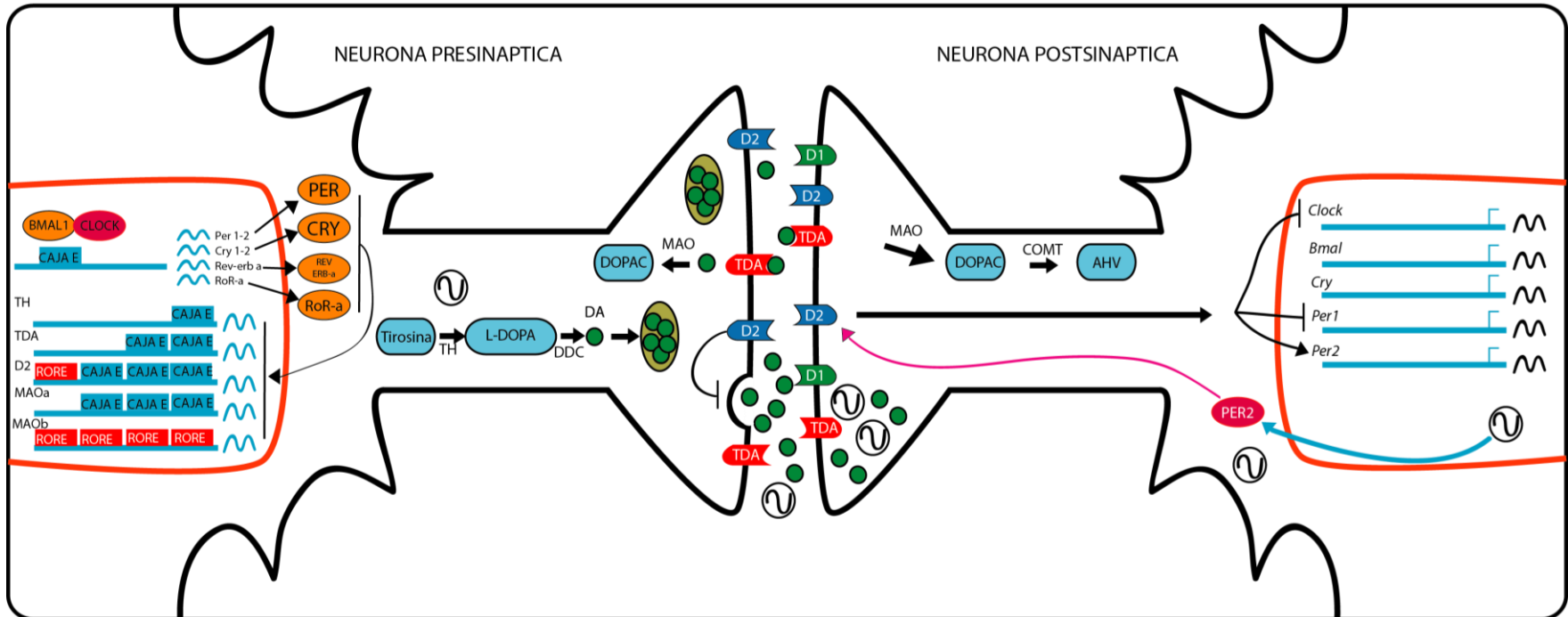
Es importante destacar que no sólo los genes y proteínas relacionados con el NSQ muestran una expresión rítmica y/o sincronizada a la recompensa, en un estudio de Castaneda & Prado 2004, mostraron en un modelo en rata, que los neurotransmisores dopamina y glutamato presentaban un patrón circadiano de liberación tanto en el estriado como en el NAc, y que estos ritmos son dependientes de los cambios en la iluminación ambiental. Por una parte, en el estriado la dopamina, parece verse influida por, sin embargo en el NAc presentan un ritmo circadiano incluso en condiciones de oscuridad constante.

Sleipness et al. en 2007 demostraron que la lesión del NSQ provocaba una disminución en los niveles del transportador de dopamina y TH en NAc y el estriado, estos resultados sugieren una dependencia del sistema dopaminérgico de la actividad del reloj central. Previamente se había demostrado que el pegado a receptores dopaminérgicos en NAc presentaba una variación a lo largo del día, incluso en ausencia de sincronizadores ambientales (Naber et al., 1982).



En el estudio previamente descrito de Webb et al. (Webb et al., 2009) encontraron que los niveles de la proteína TH en NAc y ATV presentaban una variación a lo largo del día que coincidía con lo encontrado en las pruebas conductuales de condicionamiento de preferencia de lugar, con niveles más altos durante el día en el ATV, mientras que en NAc el nivel más alto de expresión se encontró durante la noche. Estos resultados sugieren que existen ciertos puntos del día en los que un estímulo apetitivo podría ser más reforzante y que esta variación a lo largo del día podría estar mediada por las variaciones diurnas de dopamina en la vía mesocorticolímbica que a su vez podría estar controladas de forma directa o indirecta (vía NSQ) por la oscilación de genes reloj y la exposición al ciclo LD.

Hampp et al. en 2008 demostraron que la MAOa (la enzima de degradación de las catecolaminas) puede ser regulada por los genes reloj, en especial por la proteína PER2. Hampp et al utilizaron un mutante de PER2, incapaz de producir dicha proteína, y se encontró que el ritmo de MAOa se veía abolido en el ATV y en el NAc. Al mismo tiempo los niveles de liberación de dopamina se mantuvieron más altos a lo largo del día ante dicha mutación. Golombek et al (Golombek et al., 2014) proponen que también otros componentes del sistema dopaminérgico presentan una dependencia de los genes reloj, tal es el caso de la tirosina hidroxilasa, el transportador de dopamina, los receptores DR2 y la MAOb. Estos resultados sugieren que el sistema dopaminérgico involucrado en la CA presenta características circadianas, que a su vez podrían inducir a un organismo a consumir más alimento y aumentar la vulnerabilidad a la CA en cierto momento del día (Figura 3).



**Figura 3. Componentes moleculares del reloj biológico y su relación con el sistema dopaminérgico.** Se ejemplifica la interrelación entre las proteínas PER1-2, CRY 1-2 y CLOCK-BMAL1 con componentes del sistema dopaminérgico, en donde se describe que las proteínas del reloj molecular podrían iniciar la transcripción de las proteínas tirosina hidroxilasa (TH), transportador de dopamina (DAT), receptor a dopamina 2 (D2) y la monoamino oxidasa a y b (MAOa y MAOb), así como también se observa la posible influencia del sistema dopaminérgico sobre la actividad de las proteínas del reloj. Modificado de Golombek 2014

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La conducta de atracción (CA) puede ser inducida a través de la exposición a alimentos con alto contenido energético y/o a través del acceso restringido al alimento estándar. La CA depende parcialmente del sistema dopaminérgico y a su vez la síntesis, liberación, recaptura y degradación de dopamina está altamente ligada a la acción de los genes reloj y el sistema circadiano. Igualmente la conducta de atracción, así como diversas conductas dirigidas a la búsqueda de reforzadores naturales y artificiales presentan un patrón circadiano.

Por lo antes expuesto y con la finalidad de comprender las características tanto conductuales y fisiológicas de la CA, decidimos explorar la influencia del acceso intermitente al alimento y a sacarosa en el desarrollo de la CA, así como la posible interacción de estos factores con el sistema circadiano. De esta forma pretendemos aportar información que pueda ser útil para el estudio futuro de la CA así como para la comprensión y aplicación de este conocimiento en posibles tratamientos.

### **3. OBJETIVO PRINCIPAL**

- Determinar la contribución diferencial del acceso restringido al alimento y del acceso a alimento apetitoso o la combinación de ambos sobre la CA.

#### **3.1. Objetivos particulares**

- a) Determinar si la hora de acceso a sacarosa y/o alimento es determinante para la CA.
- b) Determinar si el acceso restringido al alimento es un factor inductor de la CA.
- c) Describir si la CA modifica la actividad locomotora y el ritmo de temperatura.
- d) Comparar la expresión de D1 y GLUR1 en NAc y TH en El ATV entre los grupos con diferentes horarios de acceso a sacarosa y/o alimento.

### **4. HIPÓTESIS**

- H1. La hora de acceso a sacarosa y/o alimento estándar será determinante en la expresión y magnitud de la CA.
- H2. El acceso restringido al alimento será un factor determinante para el desarrollo y la expresión del CA.
- H3. Las ratas expuestas a horarios restringidos al alimento normal o apetecible mostrarán actividad locomotora en anticipación al acceso al alimento/sacarosa y un incremento de la actividad locomotora durante su consumo.
- H4. Los grupos experimentales que presenten TA mostrarán mayor expresión de D1 y GluR1 en el NAc y de TH en el ATV dependientemente de la hora de acceso a sacarosa/alimento.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Animales y condiciones experimentales

Para estos experimentos se utilizaron rata macho de la cepa Wistar con un peso inicial de 150-180 gramos. Los animales fueron alojados en cajas individuales de acrílico (45x30x35cm), colocadas dentro de estantes con flujo de aire y temperatura controlados ( $22^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Se mantuvo a los animales en un ciclo de luz/ oscuridad 12:12, con horario de encendido de las luces a las 11:00 horas, dicho punto se definió como ZT0 (ZT0 corresponde al encendido de las luces). Se mantuvo a los animales con agua y alimento estándar (Rodent Laboratory Chow 5001; Purina, St. Louis, MO, USA) *ad libitum*, a menos de que la condición experimental especifique otro esquema. Las ratas fueron aclimatadas a las condiciones del bioterio por al menos una semana antes de iniciar la línea base.

Este proyecto fue aprobado por el comité de investigación y ética de la Facultad de Medicina de la UNAM (141/2014); el manejo de los animales fue realizado de acuerdo a la guía nacional para el cuidado y uso de animales de experimentación de la Ciudad de México. El número de animales usado fue minimizado y se tomaron todas las medidas para evitar el sufrimiento de los animales.

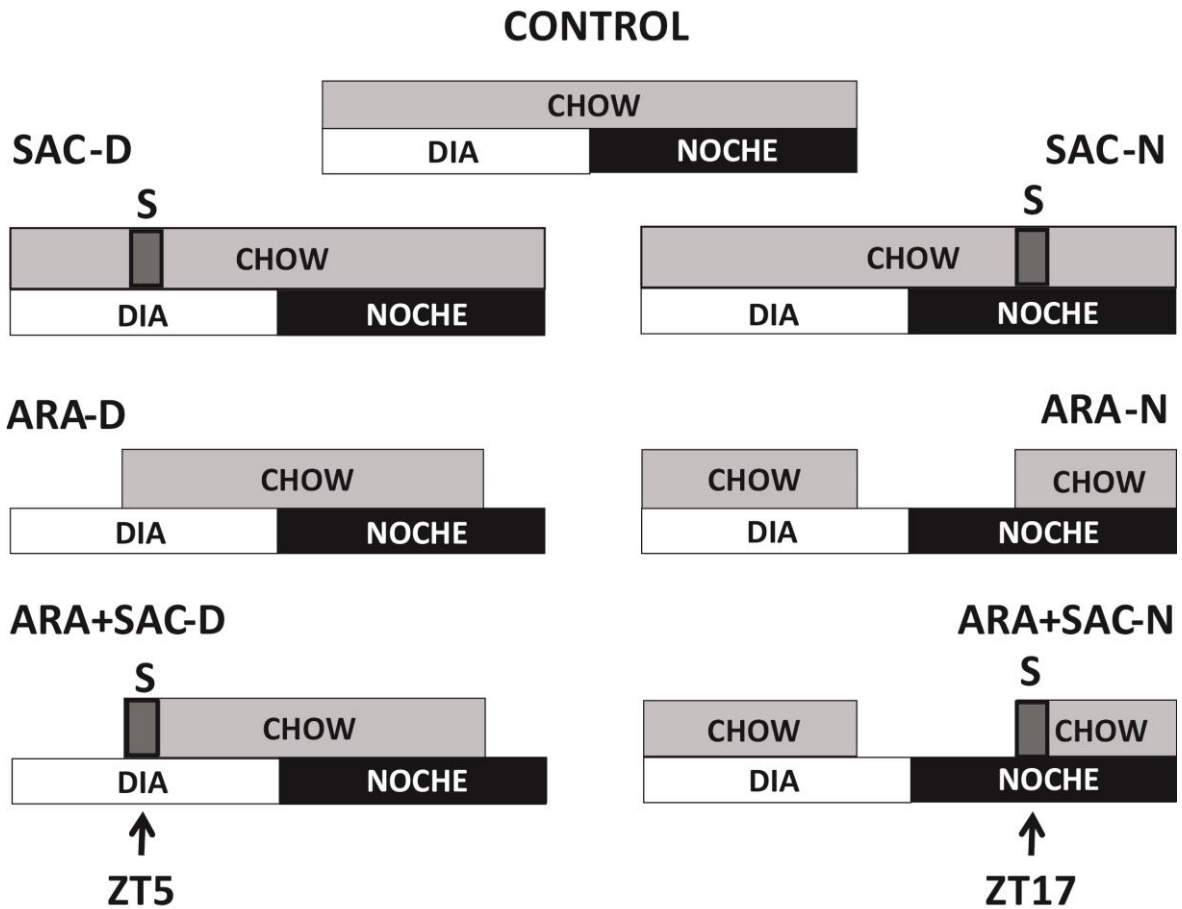
### 5.2. Diseño experimental

El protocolo tuvo una duración de 42 días (6 semanas), de los cuales los primeros 7 días sirvieron como línea base, a partir de la segunda semana los animales fueron asignados aleatoriamente a una de las siguientes 7 condiciones experimentales durante 5 semanas (ver Figura 4):

- Control (CTRL): Se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum* durante 5 semanas.
- Sacarosa a la mitad del día (SAC-D): Durante 5 semanas de lunes a sábado se les dio acceso a 50 ml. de una solución de sacarosa al 10% a la mitad del día (ZT 5 = 5 horas después del encendido de las luces), durante todo el protocolo tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*.

- Sacarosa a la mitad de la noche (SAC-N): Durante 5 semanas de lunes a sábado se les dio acceso a 50 ml. de una solución de sacarosa al 10% a la mitad de la noche (ZT17= 5 horas después del apagado de las luces), durante todo el protocolo tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*.
- Acceso restringido al alimento con administración de sacarosa a la mitad del día (ARA+SAC-D): Durante 5 semanas de lunes a sábado se les retiró el alimento 8 horas previas a dar acceso a 50 ml. de una solución de sacarosa al 10%, la cual se entregó en ZT5, durante todo el protocolo tuvieron agua *ad libitum*.
- Acceso restringido al alimento con administración de sacarosa a la mitad de la noche (ARA+SAC-N): Durante 5 semanas de lunes a sábado se les retiró el alimento 8 horas previas a dar acceso a 50 ml. de una solución de sacarosa al 10%, la cual se entregó en ZT17, durante todo el protocolo tuvieron agua *ad libitum*.
- Acceso restringido al alimento durante el día (ARA-D): Durante 5 semanas, de lunes a sábado, se les retiró el alimento 8 horas previas al acceso al alimento estándar el cual se entregó en ZT5. Durante todo el protocolo tuvieron agua *ad libitum*.
- Acceso restringido al alimento durante la noche (ARA-D): Durante 5 semanas, de lunes a sábado, se les retiró el alimento 8 horas previas al acceso al alimento estándar el cual se entregó en ZT17. Durante todo el protocolo tuvieron agua *ad libitum*.

A lo largo del protocolo se realizaron diversas mediciones; actividad locomotora, temperatura, peso de los animales, ingestión de alimento, ingestión de agua, e ingestión de sacarosa.



**Figura 4. Diseño experimental.** Después de una semana de línea base los animales fueron expuestos a una de las siguientes condiciones: CTRL= grupo control, SAC-D= Acceso a sacarosa durante el día, ARA-D= Acceso restringido al alimento durante el día, ARA+SAC-D= Acceso restringido al alimento + sacarosa durante el día, SAC-N= Acceso a sacarosa durante la noche, ARA-N= Acceso restringido al alimento durante la noche, ARA+SAC-N= Accesos restringido al alimento + sacarosa durante la noche. El ciclo de luz-oscuridad (12 horas luz: 12 horas oscuridad) está representado como rectángulos blancos y negros. Los rectángulos grises con la leyenda “alimento” representan la hora en la cual los animales tuvieron acceso al alimento. Los pequeños rectángulos con una “S” sobre ZT5 y ZT17 representan la hora de acceso a sacarosa.

### **5.3. Evaluación de la conducta de atracón, ingestión de alimento y agua**

Una vez por semana (día 3 para la semana 1; día 10 para semana 2, día 17 para semana 3, día 24 para semana 4; día 31 para la semana 5) se realizó la medición de la ingestión de alimento, sacarosa y agua. Durante la hora de acceso a sacarosa y/o alimento se les entregó a los animales 30 gr. de alimento estándar, 50 ml de agua y 50 ml de sacarosa en tubos falcon <sup>TM</sup> de 50ml. Después de la hora de acceso a sacarosa y/o alimento, el alimento sobrante fue pesado en una balanza digital; igualmente se midió el restante de agua y de solución de sacarosa con una probeta de vidrio de 50 ml. Para la administración de sacarosa, se preparó diariamente una solución de agua y sacarosa al 10%.

La conducta de atracón fue definida como un incremento en el consumo de alimento y/o sacarosa que fuera igual o superior al doble del consumo del grupo CTRL para el mismo intervalo de tiempo. Se comparó el consumo del grupo CTRL de ZT5-ZT6 con el consumo de los grupos con manipulación experimental durante el día, el consumo de ZT17-ZT18 fue comparado con el consumo de los animales con manipulación experimental durante la noche. Además, se evaluó el escalamiento como criterio de atracón, el cual se definió como el incremento progresivo en el consumo de sacarosa/chow a través de las 5 semanas del protocolo.

### **5.4. Monitoreo de los ritmos diarios de actividad general**

Las ratas fueron alojadas en estantes con condiciones controladas de iluminación (12 horas de luz; 12 horas de oscuridad). La actividad general fue monitoreada, colectada y digitalizada a través de un sistema de almacenamiento automático, el cual cada minuto registraba los cambios de presión de las placas que se encontraban debajo de las cajas de acrílico que contenían a las ratas. Este registro se realizó de manera automática con una frecuencia de muestreo de 1 minuto. La información de intervalos de 15 minutos fue usada para la construcción de los perfiles de actividad, los cuales muestran el patrón diario de actividad de un



ciclo de 24 horas. Para cada rata se construyeron actogramas de tipo *double-plot* con el uso del programa SPAD 9 (Omniaiva SA, México), un software con base en Matlab. Las cuentas de movimiento fueron normalizadas para obtener un porcentaje de actividad por hora. La intensidad de la actividad de anticipación (AA) se evaluó durante la hora previa a la llegada de sacarosa y/o alimento, la actividad locomotora de la semana 5 se comparó con la actividad locomotora esperada a la misma hora de la línea base.

### **5.5. Monitoreo de la temperatura corporal**

Una semana previa al inicio de la línea base se realizaron las cirugías de implantación de termistores iButtons™. (iButton Sensor-Temperature Logger; Maxim Integrated Products, Dallas, Semiconductor, USA). Previamente, los I-buttons fueron programados para coleccionar muestras de temperatura corporal en intervalos de 30 min. durante las cinco semanas del protocolo.

Para realizar la cirugía se limpió el área de trabajo con benzal y alcohol, después se procedió a anestesiar a las ratas con una combinación de ketamina+xilazina (Procin 0.01ml/100g de peso corporal+ Inoketam 0.02 ml/100g de peso corporal) a través de una inyección intramuscular. Una vez anestesiado el animal se rasuro el área de la cavidad torácica en donde se realizó la incisión. Se recostó a la rata sobre la mesa de cirugía con la cavidad torácica hacia arriba para realizar una incisión vertical de 7 cm. de longitud en el peritoneo, mediante esta incisión se expuso la piel y músculo abdominal, una vez expuesta la cavidad peritoneal se procedió a insertar un I-button previamente desinfectado, se procedió a suturar músculo y piel con hilo triple 0 absorbible (catgut). Una vez cerrada el área se desinfectó con isodine, posteriormente se regresó a las ratas a sus cajas en los estantes, para un periodo de recuperación de 1 semana, en donde constantemente se le mantuvo en observación para evitar complicaciones post-operatorias.

## 5.6. Obtención de tejido e inmunohistoquímica

Al final de las seis semanas del protocolo se obtuvieron los cerebros en uno de cuatro puntos temporales, con 6 horas de diferencia entre cada uno: iniciando a las 10hrs (ZT23, ZT5, ZT11, ZT17). Las ratas se anestesiaron con una dosis letal de pentobarbital monosódico (Pisabental 63mg/ml) inyectado de forma intraperitoneal. Una vez que la rata no presentaba reflejos en las extremidades inferiores se procedió a perfundirla por vía intracardiaca con 250 ml de solución salina 0.09% seguido de 250 ml. de paraformaldehído en PB al 4% (PB; 0.1M, Ph 7.2). Posteriormente se extrajo el cerebro de cada animal y se colocó en paraformaldehído para posfijación por 24 horas seguido de crioprotección en una solución de sacarosa al 30% por 3 días.

Los cerebros se congelaron y se cortaron a  $-18^{\circ}\text{C}$  con un criostato (Leica CM1850, capacidad de congelación a  $-40^{\circ}\text{C}$ ) a  $40\ \mu\text{m}$ . Las secciones se colectaron en 4 series organizadas de anterior a posterior en pozos con solución de buffer fosfatos al 0.1 M y Ph 7.2 + 0.9% NaCl (PBS). Una serie fue incubada para el anticuerpo para GLUR1 hecho en conejo (1:1000; Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA) una segunda serie fue incubada en un anticuerpo para D1 hecho en ratón (1:1000; NovusBio, Littleton USA), una tercera serie fue incubada para TH con un anticuerpo hecho en ratón (1:3000; Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA), los anticuerpos fueron diluidos en una solución de PBS pH 7.2, 0.25% gelatina y 0.5% de tritón (T-100 Sigma; PBSGT).

Para el procedimiento de inmunohistoquímica se seleccionaron las secciones que contuvieran el Área Tegmental Ventral y el núcleo Accumbens. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante 48 horas. Después de la incubación en el anticuerpo primario, las secciones fueron incubadas por 2 horas con un anticuerpo secundario biotilnado (anti-conejo para GLUR1, anti-ratón para TH y D1; Vector Laboratories) en PBSGT a 5:1000, posteriormente se incubaron con el complejo avidina-biotina 9:1000 diluido en PBSGT por 2 horas a

temperatura ambiente (Vectastain Elite ABCkit; Vector Labs, USA). El tejido fue lavado 3 veces durante 10 minutos con PBS. La reacción fue visualizada con diaminobenzidina (0.05mg/10ml, en un buffer Trizma con pH 7.2) al agregar peróxido de hidrogeno ((35µl/ 100ml).

Los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, cada portaobjetos fue marcado con las características respectivas del sujeto. Los portaobjetos se deshidrataron en una serie de alcoholes y xilol, para posteriormente ser cubiertos con un medio de montaje para microscopía; Entellan (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), posteriormente fueron visualizados al microscopio.

### **5.7. Conteo celular**

Con la finalidad de cuantificar la inmunoreactividad para GLUR1, D1 y TH, se seleccionaron secciones del cerebro de acuerdo al atlas estereotaxico para ratas (Paxinos and Watson, 2009), una sección anterior a bregma (bregma 1.20) fue seleccionada para analizar el NAc para D1 y GLUR1, el cual posteriormente fue subdividido en dos subregiones Core y Shell, una magnificación de 10x fue usada para evaluar D1, mientras una magnificación de 20x fue usada para evaluar GLUR1 y TH, en el NAc y ATV respectivamente, las células positivas para TH fueron evaluadas en una sección posterior a bregma (-5.80). Las imágenes de las secciones fueron obtenidas usando un microscopio de luz Nikon (Nikon Eclipse E600; Nikon, Tokyo, Japan) acoplado a una cámara Evolution LC y al software de análisis de imágenes Meta Vue series 4.5, Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA.

Las células positivas para GLUR1 y TH fueron contadas con la herramienta *multi-point* del software ImageJ, mientras que la inmunoreactividad para D1 fue evaluada a través de la medición de la densidad óptica (D.O.). Un solo examinador realizó todos los conteos, sin conocimiento de la condición de los sujetos experimentales para evitar sesgos.

## 5.8. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (e.e.) / grupo. Para comparar la ingesta de alimentos y sacarosa entre grupos se utilizó un ANOVA de dos vías con los días como variable de medidas repetidas (MR). Esto fue seguido por la prueba post-hoc de Tukey. La ingesta total media se comparó con un ANOVA de dos vías para los factores tiempo de acceso a sacarosa/chow versus condición (dieta). La temperatura y la actividad general están representados como patrones temporales diarios, la actividad general durante la hora de anticipación y la hora de acceso a sacarosa y/o chow se comparó contra la línea base (intra-grupo) utilizando la prueba T de Student. Las células inmunopositivas para TH, GLUR1 y la densidad óptica del receptor D1 para cada región se clasificaron por grupo y se presentan como media  $\pm$  e.e. Los datos de D1 y GLUR1 se compararon con un ANOVA de una vía seguido de un análisis post-hoc. Para el TH se utilizó un ANOVA de 2 vías para comparar la expresión entre cada grupo y cada punto temporal. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism para Windows versión 6.

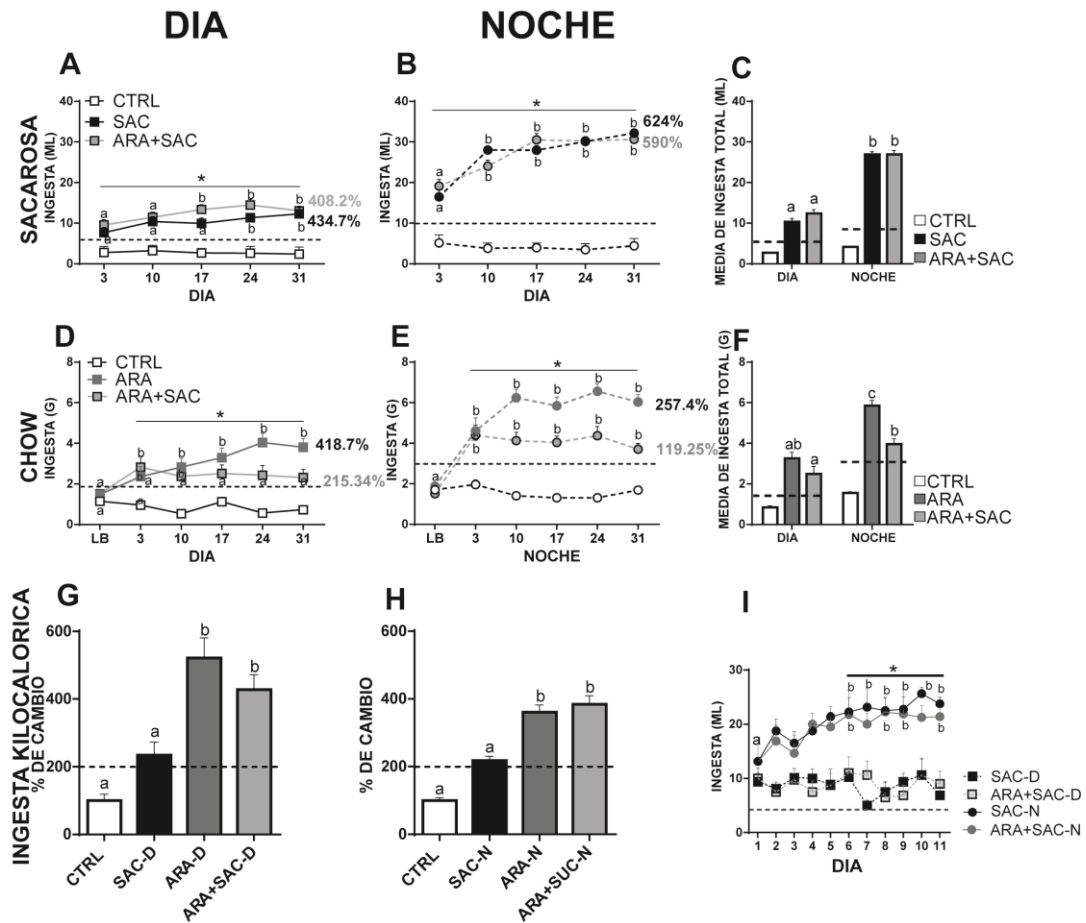
## 6. RESULTADOS

### 6.1. La CA para sacarosa o alimento estándar es dependiente de la hora de acceso

Los grupos con acceso programado a sacarosa en el día (SAC-D y ARA+SAC-D) consumieron grandes cantidades de sacarosa en una hora y esta cantidad no fue influenciada por el ARA (Figura 2A). En ambos grupos en el día 3, el volumen de solución de sacarosa consumido por las ratas superó el doble de la cantidad de agua consumida por el grupo CTRL (línea punteada en figura 2A) alcanzando el criterio para la conducta de atracón. El ANOVA de dos vías para medidas repetidas indicó efectos significativos en la interacción de los factores condición x días experimentales ( $F(8,272) = 2.307, P = 0.02, n=23-24$ ). Se encontró un efecto similar para los grupos que ingerían sacarosa durante la noche, SAC-N y ARA+SAC-N consumieron grandes cantidades de sacarosa, sin efectos del ARA (Figura 2B). Ambos grupos superaron el doble criterio de CA el día 3 en comparación con el grupo de CTRL. El ANOVA de dos vías indicó una interacción significativa de los factores grupo x día ( $F(8, 276) = 14.73, P < 0.0001, n=23-24$ ). La CA para la sacarosa alcanzó valores más altos durante la noche en comparación con los grupos con acceso a la sacarosa durante el día (Figura 2C;  $F(1, 137) = 349, P < 0.0001$ ). El volumen total de líquido bebido por los grupos con acceso a sacarosa (tanto en la noche como en el día) fue mayor cuando se comparó con el volumen de líquido ingerido por el grupo control (Tukey pos hoc test  $P < 0.05$ ; Figura 2C). El ANOVA indicó una interacción significativa para la interacción de los factores día-noche x grupos ( $F(2, 137) = 67.01, P < 0.0001, n=23-24$ ).

El acceso restringido al alimento, tanto de día como de noche, indujo un aumento de la ingesta de alimentos durante la primera hora de acceso, en comparación con el grupo CTRL (Figura 2D; ANOVA de dos vías,  $F(3,69) = 35.45, P < 0.0001$ ). Para los grupos ARA-D y la ARA+SAC-D así como para los grupos ARA-N y ARA+SAC-N el aumento en la ingesta de comida estándar alcanzó una

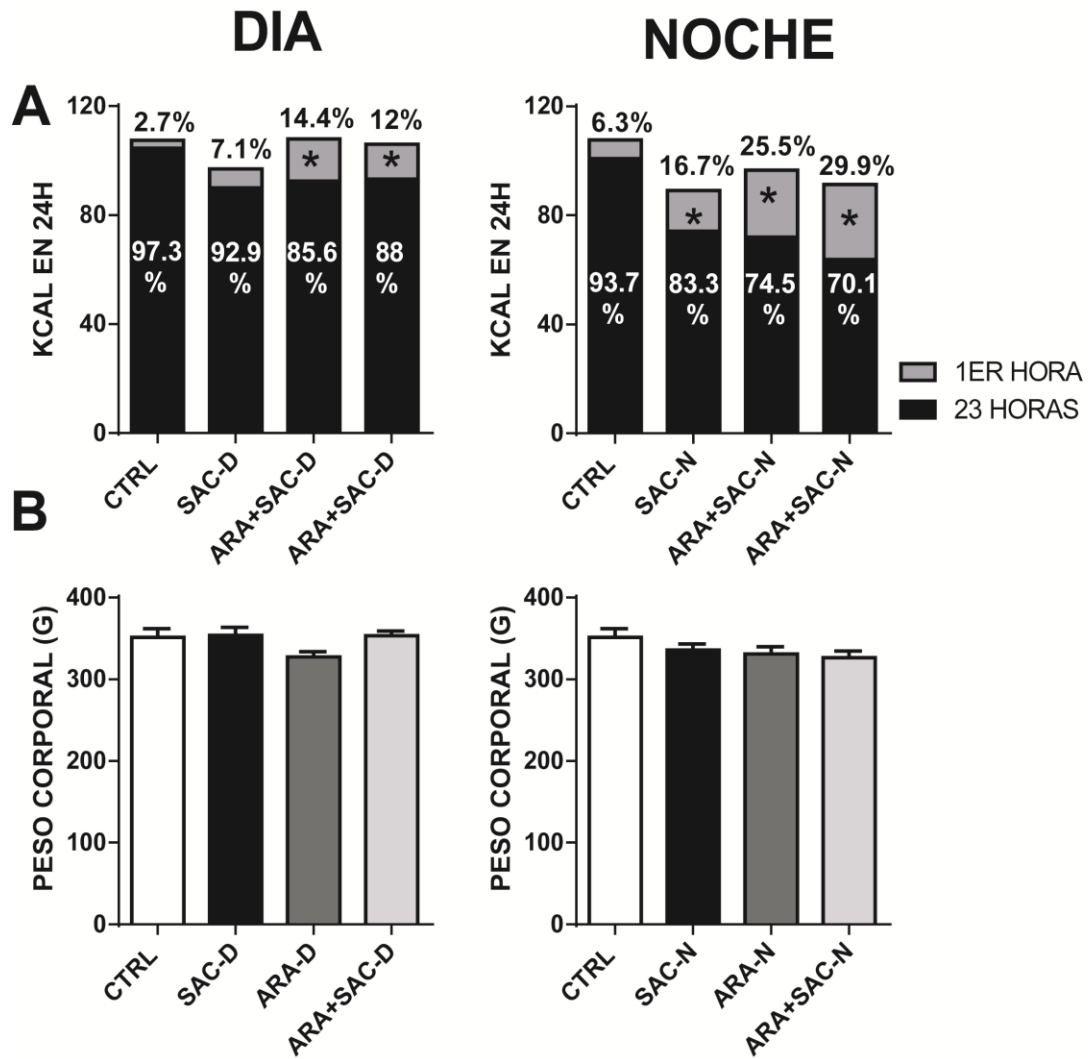
diferencia estadística con respecto al CTRL hacia el día 3 (para los grupos con acceso en el día: 2 way RM ANOVA, grupos X tiempo:  $F_{(15,345)} = 4.082$ ,  $P < 0.0001$ , grupos con acceso en la noche:  $F_{(15,345)} = 10.26$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 23-24$ ; Figura 2D y 2E). La CA para alimento chow fue significativamente mayor durante la noche en comparación con el día (Figura 2F; ANOVA de dos vías, grupos de interacción X tiempo ( $F_{(1,133)} = 60.88$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 23-24$ ).



**Figura 2. Efecto de la hora de acceso restringido a alimento y/o sacarosa en la CA.** A y B) Muestra la media  $\pm$  error estándar (e.e.) de la ingesta de sacarosa (mL) durante 1 h a lo largo de los días experimentales, (agua para el grupo CTRL). C) Ingesta media de sacarosa durante 1 h de acceso a través de los días experimentales comparando los grupos de día vs noche ( $\pm$  e.e.). D y E, ingesta de comida (media  $\pm$  e.e.) durante las primera hora de acceso a lo largo de los días experimentales del protocolo y F) Media ( $\pm$  e.e.) de ingesta de comida durante las primera hora de acceso en los días experimentales. G y H) media ( $\pm$  e.e.), proporción de kilocalorías consumidas durante una hora de acceso a la comida y/o a la sacarosa en comparación con el grupo CTRL (representado como 100%). I) escalamiento en la ingesta de sacarosa durante los primeros 11 días del protocolo. Las diferencias se obtuvieron con una prueba post hoc de Tukey,  $p < 0.05$  y se muestran con letras (diferentes letras representan grupos estadísticamente diferentes). En A, B, D y E \* = diferencias estadísticas del CTRL,  $P = 0,05$ ; en C y F \*\*\*  $P = 0,001$  y \*\*\*\*  $P = 0,0001$ . CTRL= Grupo de control, SAC-D= Acceso a la

sacarosa durante el día, ARA-D= Acceso restringido a los alimentos durante el día, ARA+SAC-D= Acceso restringido a alimento durante el día + sacarosa durante el día, SAC-N= Acceso a sacarosa durante la noche, ARA-N = Acceso restringido a alimento durante la noche, ARA+SAC-N= Acceso restringido a alimento durante la noche + sacarosa durante la noche. Las líneas de puntos representan el umbral para considerar la ingesta como CA (dos veces la ingesta media del grupo CTRL), n=23-24.

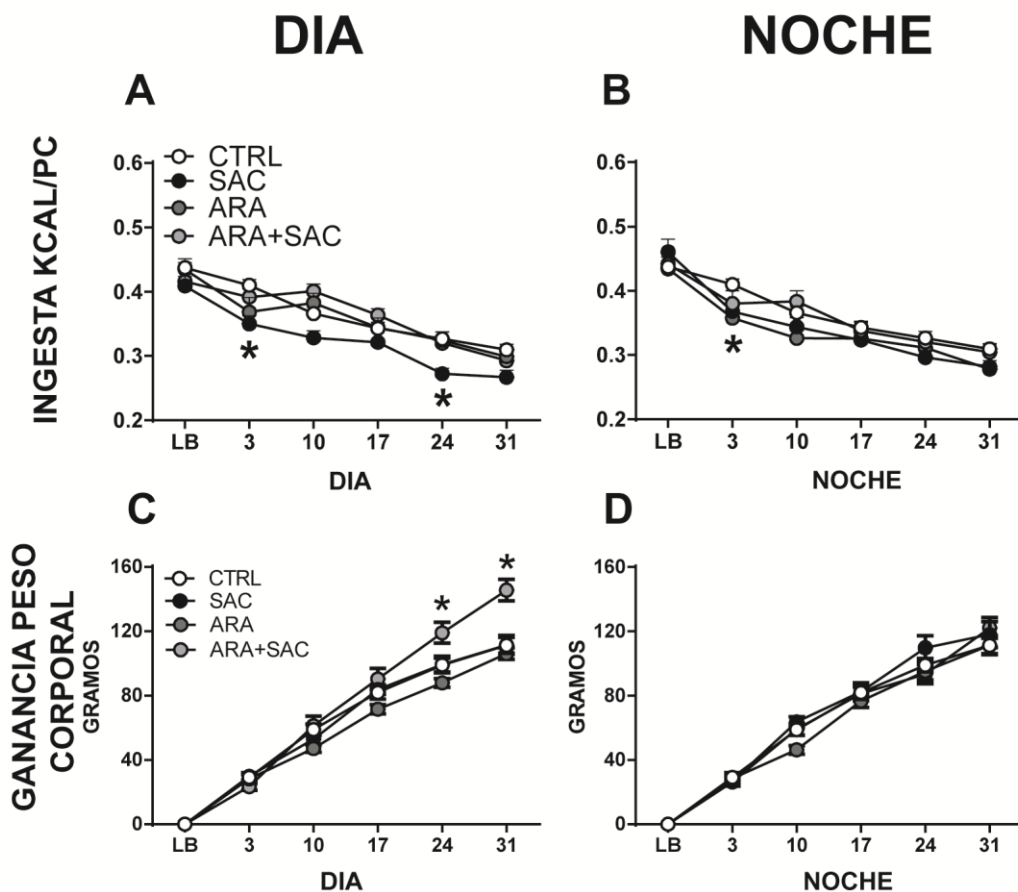
La proporción de kilocalorías consumidas durante la hora de acceso a sacarosa y/o a la comida fue mayor en los grupos de ARA en comparación con el grupo control y con los grupos de sacarosa en el día (1 way ANOVA I:  $F(3,92)=19.47$ ,  $p<0,0001$ , Tukey post hoc:  $p <0,05$ ; Figura 2G) se observó el mismo efecto en los grupos con acceso restringido al alimento durante la noche ( $F(3,92) = 52,23$ ,  $p<0,0001$ , Tukey post hoc:  $p <0,05$ ; n=23-24; Figura 2H). Durante el episodio de atracón, la ingesta de kcal para el grupo SAC-D representó el 7,1%, para el grupo ARA-D la ingesta de kcal representó el 14,4% y para ARA+SAC-D el 12% de la ingesta diaria total de kcal (Figura 3A, izquierda). El ANOVA de 1 vía indicó una diferencia significativa entre los grupos ( $F(3,92)=18,03$ ,  $p<0,0001$ , n=23-24) Para los grupos con acceso durante la noche, la ingesta de kcal durante el episodio de atracón representó el 16,7% para el grupos SAC-N, el 25,5% para el ARA-N y el 29,9% para el grupo ARA+SAC-N de la ingesta diaria total (Figura 3A, derecha). El ANOVA de 1 vía indicó una diferencia significativa entre los grupos ( $F(3,92)=77,22$ ,  $p<0,0001$ , n=23-24). Es importante destacar que la ingesta total de kilocalorías durante 24 horas fue similar para todos los grupos con manipulación en el día (Figura 3A), mientras que para los grupos con acceso a sacarosa durante la noche (ARA-N y ARA+SAC-N) se observó una reducción en la ingesta total de 24 horas en kcal ( $F(3,60)=4,35$ ,  $p<0,0077$ , n=23-24). No se encontró ninguna diferencia en el peso corporal entre los grupos en la semana 5 del protocolo (Figura 3B).



**Figura 3. Ingestión kilocalorie en 24h y peso corporal.** En la fila A, se muestra la ingesta de kilocalorías durante las 24 horas para los grupos con inicio de acceso a la comida/sacarosa durante el día (izquierda) y durante la noche (derecha), las barras apiladas representan la ingesta de chow (en negro) y la primera hora de acceso a chow/sacarosa (barras grises), se muestran los porcentajes para cada tipo de ingesta. En la fila B se muestra el peso corporal en la semana experimental 5 para los grupos con inicio de acceso a la comida/sacarosa durante el día (izquierda) y durante la noche (derecha). CTRL= Grupo de control, SUC-D= Acceso a la sacarosa durante el día, RFA-D= Acceso restringido a la comida con inicio en el día, RFA+SUC-D= Acceso restringido a la comida con inicio en el día + sacarosa durante el día, SUC-N= Acceso a la sacarosa durante la noche, RFA-N= Acceso restringido a la comida con inicio en la noche, RFA+SUC-N= Acceso restringido a la comida con inicio en la noche + sacarosa durante la noche. \* En la fila A se indican las diferencias en la primera hora de acceso frente al grupo CTRL. n= 16



Se calculó la proporción de ingesta diaria de kilocalorías/peso corporal para excluir un posible efecto del peso corporal en la ingesta de comida y sacarosa (Figura 4). Tanto los grupos con manipulación en el día y en la noche mostraron una disminución de la ingesta de kilocalorías/ peso corporal a lo largo del tiempo (Figura 4A y 4B), posiblemente debido al aumento constante del peso corporal. El ANOVA-MR de 2 vías indicó efectos significativos a lo largo de los días experimentales para los grupos con manipulación en el día ( $F(5,295)=114.3$ ,  $p<0.001$ ) y para los grupos con manipulación en la noche ( $F(5,300)=96.28$ ,  $p<0.001$ ). Todos los animales mostraron un aumento de peso corporal semanal, el ANOVA-MR de dos vías indicó efectos estadísticos para la interacción de los factores grupos x semanas ( $F(15.290) = 9,41$ ,  $P< 0,0001$ ,  $n=16$ /grupo) para los grupos con manipulación en el día (Figura 4C) y ( $F(15.300) = 2,08$ ,  $P=0,01$ ,  $n=16$ ) para los grupos con manipulación en la noche (Figura 4D).



**Figura 4. Relación entre la ingestión y la ganancia en peso corporal.** A) y B) muestran la relación Kcal/peso corporal para los grupos diurnos y nocturnos respectivamente, a lo largo de los días experimentales. L y M) muestran la ganancia de peso corporal a lo largo de los días experimentales para los grupos diurnos y nocturnos. Las diferencias significativas del grupo CTRL se obtuvieron con un test post hoc de Tukey,  $p < 0.05$  se muestran con asteriscos. CTRL= Grupo de control, SUC-D= Acceso a la sacarosa durante el día, RFA-D= Acceso restringido al alimento con inicio en el día, RFA+SUC-D= Acceso restringido al alimento + sacarosa con inicio en el día, SUC-N= Acceso a la sacarosa durante la noche, RFA-N= Acceso restringido al alimento con inicio en la noche, RFA+SUC-N= Acceso restringido al alimento + sacarosa con inicio en la noche.

## 6.2. Escalamiento en la CA

Un segundo criterio para evaluar el TA fue el aumento de la ingesta de sacarosa a lo largo del tiempo. Todos los grupos con acceso a sacarosa aumentaron progresivamente la ingesta de sacarosa a lo largo del tiempo en comparación con su línea base ( $F_{(4,272)} = 5.42$ ,  $P < 0.001$ ; grupos de día and  $F_{(4,276)} = 39.17$ ,  $P < 0.001$ ,  $n=23-24$ ; grupos de noche). Observamos un incremento en el

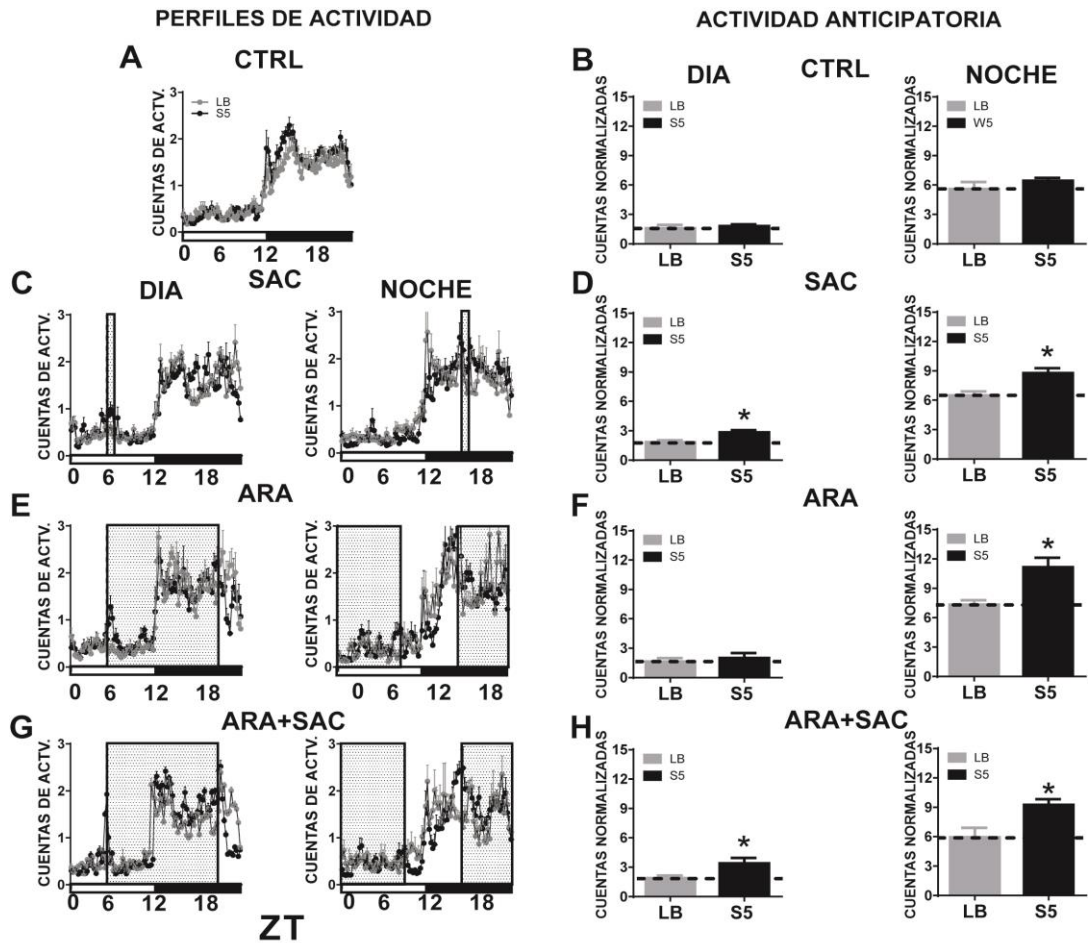
consumo de sacarosa en los grupos que consumían sacarosa en la noche; las diferencias estadísticas fueron evidentes a partir del día 6 (Figura 2-I) ( $F_{(10,120)} = 3.2$ ,  $P = 0.0001$ ,  $n=23-24$ ). Para los grupos con acceso a sacarosa durante el día no se observó escalamiento durante los primeros 11 días. El análisis post-hoc de los datos de la figura 2A reveló que para el grupo SAC-D sólo había diferencias significativas a partir del día 17 y para el grupo ARA+SAC-D en el día 24 en comparación con el día 1.

### **6.3. Actividad de anticipación al acceso de sacarosa y/o alimento**

La actividad general fue monitoreada continuamente, el análisis de la línea base para cada grupo demostró diferencias estadísticas entre los valores promedio del día vs la noche, esto fue observado para todos los grupos (Tabla 2; Figura 5 A, C, E, G), con altos valores de actividad predominantemente durante la fase de actividad (noche) y bajos durante el día. Es importante destacar que los grupos que recibieron alimento restringido en ZT17, mostraron un retraso en el inicio de la actividad nocturna (Figura 3E, G derecha). La actividad general asociada a la actividad de anticipación se evaluó una hora antes del acceso a sacarosa y/o a la comida (ZT4-ZT5).

En la semana 5, no se encontró actividad de anticipación para el grupo CTRL cuando se comparó la semana 5 vs la línea base ( $t=0.60$ ,  $p=0.55$ ,  $n=9$ ), la actividad de anticipación (AA) que precede al acceso al alimento/sacarosa en los grupos con acceso en el día se observó en el grupo SAC-D ( $t= 3.364$ ,  $p= 0.004$ ) y ARA+SAC-D ( $t= 2.543$ ,  $p= 0.02$ ) pero no en el grupo ARA-D en comparación con la línea de base ( $t= 0.88$ ,  $p= 0.40$ ) (Figura 5D, F, H, gráficos de la derecha).

Para los grupos con manipulaciones experimentales durante la noche, se observó actividad de anticipación antes del acceso al alimento/sacarosa (ZT16-17) en los grupos SAC-N ( $t= 3.54$ ,  $p= 0.002$ ), ARA-N ( $t= 2.93$ ,  $p= 0.009$ ) y ARA+SUC-N ( $t= 3.62$ ,  $p= 0.002$ ) en comparación con su línea de base (Figura 5D, gráficas de la derecha de F,H).

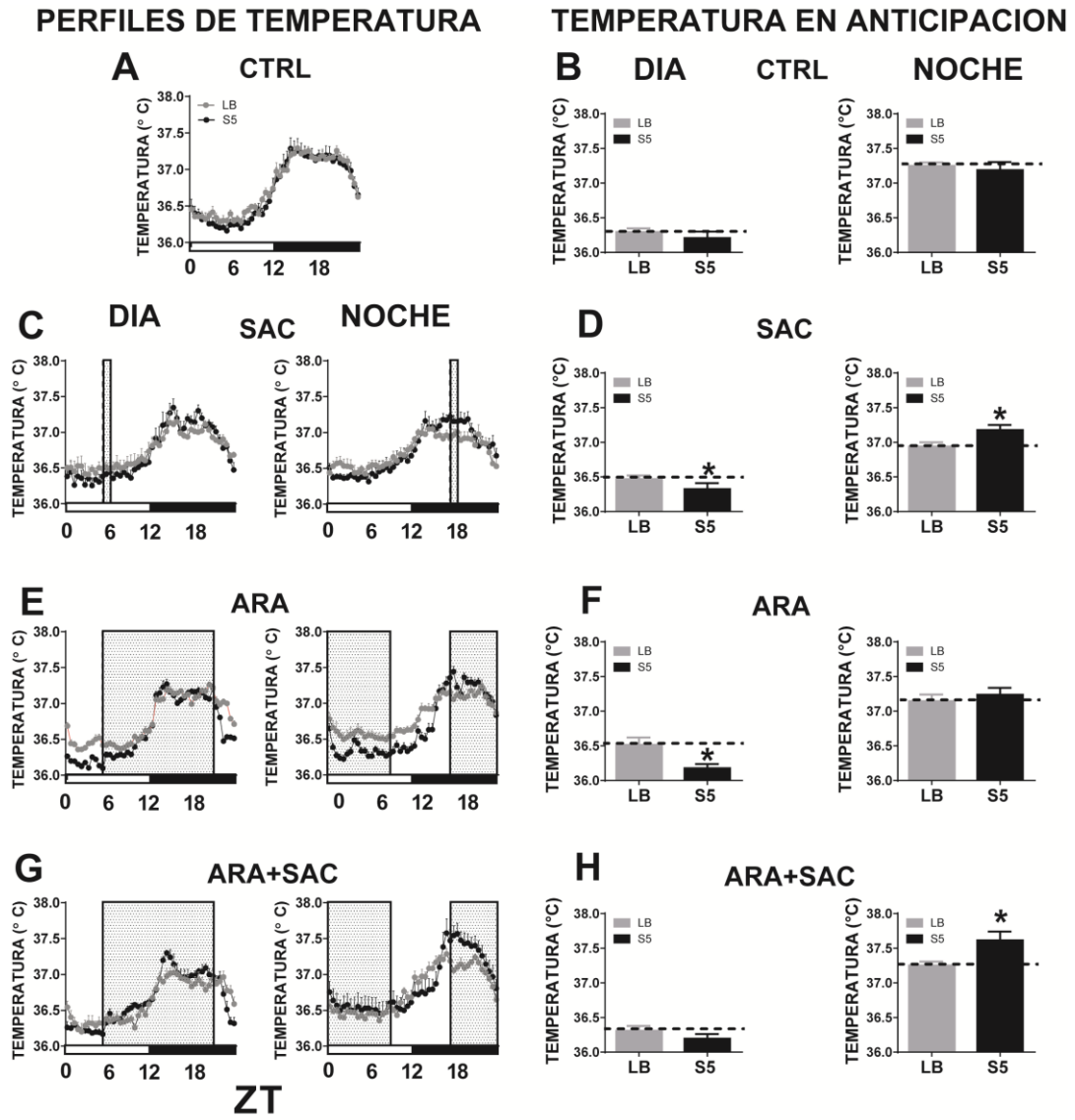


**Figura 5. Actividad general diaria y anticipación al alimento y/o sacarosa.** Las figuras A, C, E y G muestran los perfiles de actividad diaria de cada grupo durante la línea de base (línea gris) y la semana 5 (línea negra); Los rectángulos grises en C, E y G indican el intervalo de tiempo cuando la sacarosa/comida estaban disponibles. B, D, F y H) muestran la media ( $\pm$ e.e.) de la actividad general durante una hora antes (ZT4-ZT5 en grupos con acceso en el día y ZT16-ZT17 en grupos con acceso en la noche). Las cuentas normalizadas para el total de la actividad durante 24 horas para la línea de base (barras grises) y para la semana 5 (barras negras). Los valores de la línea de base se fijaron en 100% y se representan como líneas punteadas horizontales. Se hicieron comparaciones intragrupo entre la línea de base y la semana 5 para cada grupo. El asterisco indica la diferencia estadística entre la semana 5 y la línea de base para la AA (ZT4-ZT5 y ZT16-ZT17). SAC= Sacarosa, ARA= Acceso restringido a los alimentos ARA+SAC= Acceso restringido a los alimentos y sacarosa, n=8-9.

#### 6.4. Anticipación en la temperatura central al acceso al alimento o a sacarosa

En la línea de base se encontraron diferencias estadísticas entre los valores promedio de la temperatura durante el día y la noche, encontramos valores más altos de temperatura durante la fase d actividad (Tabla 3; figura 6 A, C, E, G).

No se observaron cambios en anticipación en la temperatura corporal en el grupo de CTRL tanto durante el día ( $t(7) = 1,37, p = 0,21$ ) como durante la noche ( $t(7) = 0,48, p = 0,48$ ) (Figura 6B). Para los grupos con manipulaciones en el día ( $n=6-8$ ) y con manipulaciones durante la noche ( $n=6-8$ ); los grupos con acceso a sacarosa mostraron anticipación, se observó una disminución de la temperatura central para el grupo SAC-D ( $t(5) = 3,30, p = 0,02$ ) y un aumento de la temperatura central para el grupo SAC-N ( $t(4) = 4,76, p = 0,008$ ) (Figura 6D). En la hora anterior al acceso a los alimentos se observó una reducción de la temperatura central para el grupo ARA-D ( $t(7) = 4,077, p = 0,004$ ), no se encontraron efectos significativos en el grupo ARA-N ( $t(5) = 1,19, p = 0,28$ ) (Figura 6F). Para los grupos con manipulaciones experimentales durante la noche, se observó un aumento en anticipación de la temperatura que precede al acceso a los alimentos/sacarosa (ZT16-17) en el grupo ARA+SAC-N en comparación con la línea de base ( $t = 2,42, p = 0,03$ ) (Figura 6H), no se encontraron efectos significativos en el grupo ARA-D ( $t(5) = 2,011, p = 0,11$ ), no obstante se observó una tendencia hacia la reducción (Tabla 4).



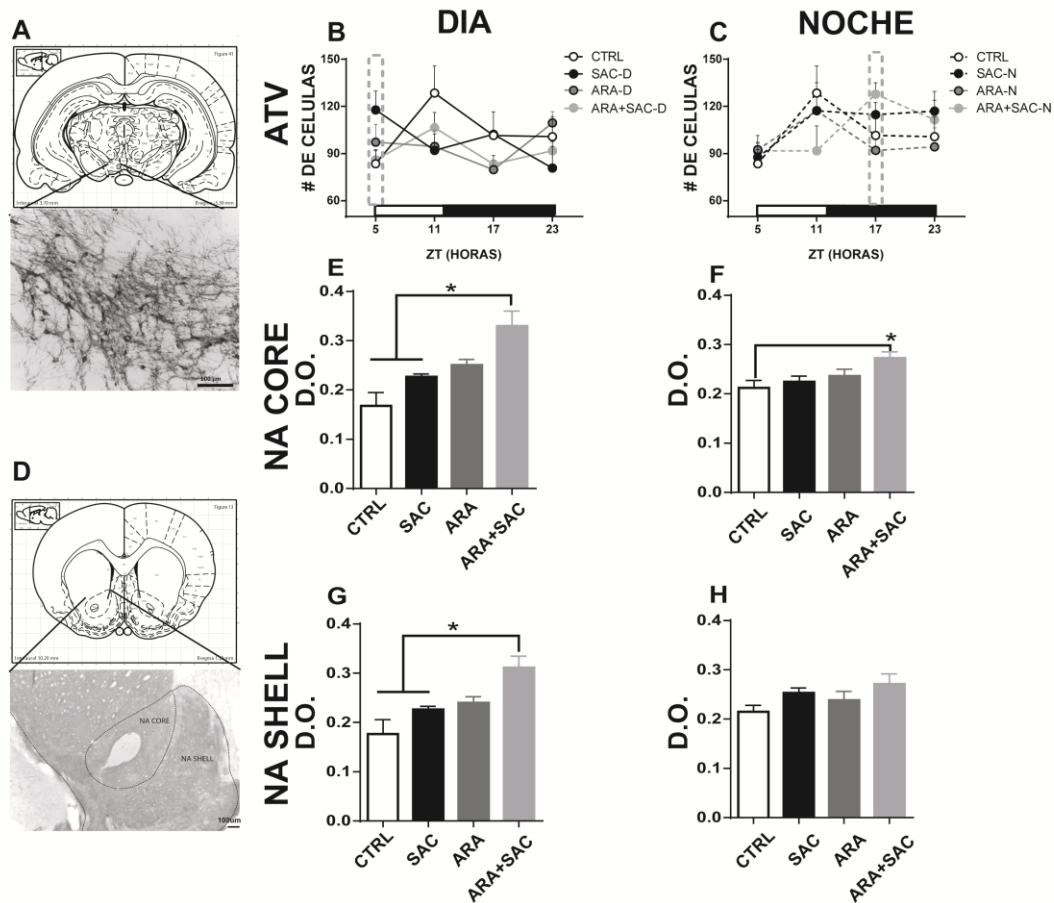
**Figura 6. Perfiles diarios de temperatura corporea, anticipación al alimento y/o sacarosa.** Las figuras A, C, E y G muestran los perfiles de temperatura diarios de la línea base (líneas en gris) y para la semana 5 (líneas negras). Las máscaras rectangulares grises en E y G representan el acceso a los alimentos. B, D, F y H) muestran la media ( $\pm$ e.e.) de la actividad general durante una hora antes (ZT4-ZT5 en grupos con acceso en el día y ZT16-ZT17 en grupos con acceso en la noche). Las barras grises representan valores para la línea base y las barras negras representan valores para la semana 5. Los valores de la línea de base se fijaron en 100% y se representan como líneas punteadas horizontales. Se hicieron comparaciones intragrupo entre la línea de base y la semana 5 para cada grupo. Los asteriscos indican la diferencia estadística entre la semana 5 y la línea base para cada grupo (ZT4-ZT5 y ZT16-ZT17). SAC= Sacarosa, ARA= Acceso restringido a la alimentación, ARA+SAC= Acceso restringido a los alimentos y comienzo de la sacarosa, n=6-8.

### **6.5. Las células TH-positivas en el ATV no mostraron cambios después del acceso a alimento y sacarosa tanto durante el día como durante la noche.**

El número de células positivas para TH (Figura 5 A) se cuantificó en una sección representativa de la ATV en 4 puntos temporales (ZT5, ZT11, ZT17 y ZT23). La figura 7A muestra una microfotografía representativa que contiene el ATV. El análisis estadístico no indicó diferencias significativas en el tiempo para los grupos con manipulaciones en el día ( $F_{(3, 48)} = 1.23$ ,  $p = 0.30$ ,  $n=4$ ) (Figura 7 B) y en la noche ( $F_{(3, 48)} = 3.31$ ,  $p = 0.67$ ,  $n=4$ ) (Figura 7C). No se encontraron diferencias entre grupos en ningún punto temporal tanto para los grupos con manipulaciones en el día como para los grupos con manipulación en la noche.

### **6.6. La densidad óptica del receptor D1 en el NAcCore aumentó en los grupos con acceso restringido a alimento y sacarosa.**

La densidad óptica (D.O.) para los receptores D1 en el NAcCore y NAcShell se determinó en el momento en que las ratas tuvieron acceso a la comida/sacarosa (para el día = ZT5 y para la noche =ZT17). En la Figura 7D se muestra una microfotografía representativa del NA. Se observó un aumento significativo en la D.O. D1 en ambos grupos expuestos a acceso restringido a la comida combinada con sacarosa (ARA+SAC-D y ARA+SAC-N) en el NAcCore (Figura 7E y F; Tukey  $P<0.05$ ) y sólo para el grupo ARA+SAC-D en el NAcShell (Figura 7G; Tukey  $P<0.05$ ). El ANOVA de una vía indicó una diferencia significativa para los grupos con manipulación en el día en el NAcShell ( $F(3,12) = 7,908$ ,  $p = 0,003$ ,  $n=4$  por punto temporal/grupo) y en el NAcCore ( $F(3,12) = 10 .09$ ,  $p = 0,0013$ ); para los grupos con manipulación en la noche únicamente se encontraron diferencias significativas en el NAcCore ( $F(3,12) = 3,802$ ,  $p = 0,03$ ,  $n=4$ ), no se encontraron diferencias para el NAcShell ( $F(3,12) = 2,20$ ,  $p = 0,14$ ) (Figura 7F).

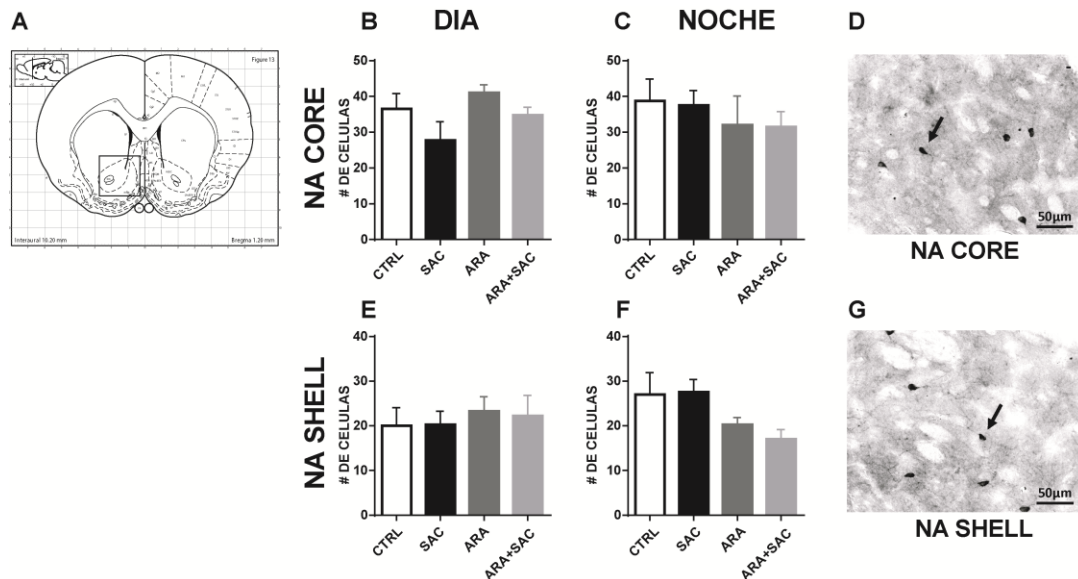


**Figura 7. Número de células TH positivas en el ATV y densidad óptica D1 en el NAcore y el shell.** A) Representación esquemática de una sección que contiene el ATV (arriba) y una microfotografía 20x del ATV (barra de escala 100µm). Media  $\pm$  e.e. del número de células TH-positivas medidas cada 6 horas a lo largo de 24 horas para los grupos con manipulaciones experimentales durante el día (B) o la noche (C). En D) representación esquemática de una sección que contiene el NA (arriba) y una microfotografía 10x del NAcore y el NAsheIl (barra de escala 100µm). E, F) Densidad óptica del receptor D1 en el NAcore (gráfica superior) y G, H) NAsheIl (gráfica inferior) para grupos con acceso en el día (izquierda) y con acceso en la noche (derecha) en el momento del acceso a sacarosa y/o alimento las diferencias estadísticas entre los grupos fueron obtenidas con una prueba post hoc de Tukey,  $p < 0.05$ . CTRL= grupo control, SAC-D= Acceso a sacarosa durante el día, ARA-D= Acceso restringido al alimento durante el día, ARA+SAC-D= Acceso restringido al alimento + sacarosa durante el día, SAC-N= Acceso a sacarosa durante la noche, ARA-N= Acceso restringido al alimento durante la noche, ARA+SAC-N= Accesos restringido al alimento + sacarosa durante la noche. Los asteriscos representan diferencias estadísticas entre los grupos indicados  $P < 0,05$ ,  $n = 4$  animales por punto temporal.



## 6.7. El número de células GLUR1-positivas no se modificó en respuesta a las manipulaciones experimentales.

Se seleccionaron secciones representativas del Núcleo Accumbens a una distancia del bregma de  $1 \text{ mm} \pm 0,2$ , de acuerdo con estudios previos. Un esquema representativo de estas secciones se muestra en la Figura 8A. El número de células positivas para GLUR1 fue cuantificado en el NAcCore (Figura 8 B y C), y en el NAcShell (Figura 8 E y F). Las células positivas del GLUR1 no mostraron diferencias tanto para los grupos con manipulación en el día (Figura 8B-E) como para los grupos con manipulaciones en la noche (Figura 8C-F) tanto para el NAcCore ( $F(3,12) = 2.156$ ,  $p = 0.14$ ; grupos de día,  $F(3,12) = 0.39$ ,  $p = 0.75$ ; grupos de noche) ni para el NAcShell ( $F(3,12) = 0.17$ ,  $p = 0.91$ ; grupos día,  $F(3,12) = 2.65$ ,  $p = 0.09$ ; grupos noche). Las microfotografías representativas se muestran en las figuras 8D y G.



**Figura 6. Número de células GLUR1 positivas en el NA.** A) Representación esquemática del NA, B y E) Media  $\pm$  e.e del número de células GLUR1 durante el día (ZT5) o durante la noche (ZT17) en ratas que esperan sacarosa y/o chow en el NAcCore (B y C) y NAcShell (E y F;  $n=4$ ). D y G) muestran microfotografías a 40x representativas del NAcCore y NAcShell respectivamente (barra de escala 50µm). CTRL= grupo control, SAC-D= Acceso a sacarosa durante el día, ARA-D= Acceso restringido al alimento durante el día, ARA+SAC-D= Acceso restringido al alimento + sacarosa durante el día, SAC-N= Acceso a sacarosa durante la noche, ARA-N= Acceso restringido al alimento durante la noche, ARA+SAC-N= Accesos restringido al alimento + sacarosa durante la noche.  $n=4$  por punto temporal/grupo

## 6.8. Evaluación de los signos de CA en los grupos experimentales

La tabla 1 muestra un resumen de los resultados obtenidos, en esta tabla se puede visualizar cada uno de los parámetros evaluados en nuestro modelo: presencia de CA, escalamiento, actividad de anticipación (AA), cambios en el ritmo de temperatura corporal, expresión de TH, D1 y GLUR1 en el ATV y NA. El grupo que mostró mayor cantidad de signos relacionados a la CA fue el ARA+SAC-N, seguido del resto de grupos con manipulación durante la noche SAC-N, ARA-N y del grupo ARA+SAC-D, estos resultados sugieren que la CA y los signos asociados a este se presentan con mayor facilidad cuando el acceso a alimento estándar y apetitoso se da durante la noche, pero también deja claro que cuando ambas variables están presentes (acceso restringido a alimento y acceso a sacarosa) durante el día, el TA se puede presentar con una magnitud significativa.

Grupo	TA	Escalamiento	AA	Temperatura	TH	D1	GLUR1
CTRL	-	-	-	-	-	-	-
SAC-D	↑	↑	↑	-	-	-	-
ARA-D	↑	↑	-	↓	-	-	-
ARA+SAC-D	↑	↑	↑	-	-	↑	-
SAC-N	↑	↑	↑	↑	-	-	-
ARA-N	↑	↑	↑	↑	-	-	-
ARA+SAC-N	↑	↑	↑	↑	-	↑	-

**Tabla 1. Signos relacionados con CA evaluados en nuestro modelo.** Cada columna representa uno de los signos que se evaluaron, cada fila representa cada uno de los grupos evaluados: CTRL= grupo control, SAC-D= Acceso a sacarosa durante el día, ARA-D= Acceso restringido al alimento durante el día, ARA+SAC-D= Acceso restringido al alimento + sacarosa durante el día, SAC-N= Acceso a sacarosa durante la noche, ARA-N= Acceso restringido al alimento durante la noche, ARA+SAC-N= Accesos restringido al alimento + sacarosa durante la noche. El grupo que mostró más signos de CA fue el ARA+SAC-N (5 de 7). La dirección de la flecha indica si hubo un aumento o una disminución de la variable evaluada, una línea recta indica que no hay diferencias significativas.

## 7. DISCUSION

Los resultados indican que el acceso restringido al alimento o a la sacarosa produce CA de manera diferencial. La intensidad de ambos tipos de CA fue influenciada por la hora de acceso, con una mayor CA durante la noche. Otros comportamientos asociados con la CA (anticipación y escalamiento) también mostraron una mayor intensidad durante la noche. Ambos grupos expuestos a el acceso combinado de alimentación restringida + sacarosa (día y noche) mostraron un aumento en la densidad óptica de los receptores D1 en el NAcCore y el NAcShell. Sin embargo, no se observaron cambios en el número de células TH positivas en el ATV ni en el número de neuronas inmunopositivas GLUR1 en el NA. Los datos indican que el acceso a la comida/sacarosa durante la fase de actividad (noche) induce una expresión más fuerte de CA y que la sacarosa y el alimento estándar pueden producir CA independientemente, sin embargo la combinación de ambos factores induce mayor cantidad de indicadores de CA.

### 7.1. La CA para sacarosa y alimento estándar muestra características diferenciales

El acceso restringido a alimento o a alimentos apetecibles se ha utilizado para inducir CA (Bello et al., 2003; Carlo Colantuoni et al., 2002; Peng et al. 2011). Es bien sabido que la privación de alimento induce un desequilibrio energético negativo que conduce a un estado de hambre y a conductas de búsqueda de alimento (Dileone et al., 2012; Saper et al., 2002), lo que puede llevar a los animales a desarrollar un consumo excesivo de comida regular (Nicola, 2016). Estudios anteriores han señalado la importancia de la alimentación intermitente, ya que las ratas pueden incluso desarrollar CA a la manteca vegetal cuando el acceso se restringe a tres veces por semana (R. L. Corwin & Wojnicki, 2006). En este trabajo se presenta evidencia de que la CA para la comida estándar y apetitosa se debe principalmente al acceso restringido. Es importante señalar que cuando se ofrece una opción, los roedores privados de comida muestran preferencia por alimentos densos de alta energía (K. D. Carr et al., 2003).

Los estudios previos que exploran los mecanismos de la CA han usado frecuentemente una combinación de comida restringida con acceso restringido a sacarosa (N. M. Avena et al., 2006; R. L. Corwin, 2004; Rada et al., 2005). Se ha demostrado que esta combinación produce niveles más altos de BEB.

Nuestros resultados destacan que para inducir la CA a sacarosa, no es necesaria la privación de alimento, dado que las ratas expuestas a SAC o a ARA+SAC mostraron una ingesta de sacarosa y una CA similares, lo que concuerda con estudios anteriores (R. L. W. Corwin et al., 2016; S.G. Dimitriou et al., 2000). Además, los resultados indican que para los grupos SAC el acceso intermitente a sacarosa es el principal factor que contribuye a la CA y no a la privación de alimentos. Sin embargo, es importante señalar que, incluso cuando la CA fue similar entre animales con restricción a alimento y animales sin restricción de alimento, otros estudios han indicado que la liberación de dopamina a las recompensas naturales y artificiales es más fuerte para los animales privados de alimento (Pothos et al., 1995b; Tukey et al., 2013). Esto puede explicar el aumento de la densidad óptica de D1 en el núcleo Accumbens observado específicamente en los grupos ARA+SAC. En contraste, la CA para la comida fue influenciada por el acceso a sacarosa porque las ratas expuestas a la combinación ARA+SAC ingirieron menos comida durante la primera hora de acceso que las ratas con ARA.

## **7.2. La CA para la comida y sacarosa y la AA está influenciada por el ciclo día-noche**

Se encontró una influencia del día y la noche en la CA para la comida estándar y sacarosa, con una mayor magnitud para la CA durante el acceso nocturno. Mientras que las ratas con acceso restringido a la sacarosa durante el día, consumieron al menos 2 veces la ingesta del grupo CTRL, las ratas con acceso a la comida o a la sacarosa durante la noche consumieron hasta 6 veces el consumo del grupo CTRL y alcanzaron un mayor escalamiento. Esto confirma hallazgos previos que reportan que las ratas que beben sacarosa y/o consumen

alimentos durante la noche consumen significativamente más que las ratas expuestas al mismo protocolo durante el día (Bainier et al., 2017; Tõnissaar et al., 2006).

Los resultados anteriores también han demostrado que durante la fase de actividad los roedores aumentan su motivación y buscan recompensas naturales y artificiales como comida (Balagura & Coscina, 1968; ter Haar, 1972), comportamiento sexual (Webb et al., 2009) e ingestión de drogas (Abarca et al., 2002; McClung et al., 2005; Sleipness et al., 2007). La relevancia de una modulación circadiana en los comportamientos motivados se ha destacado en los modelos de perturbación circadiana. La alteración del sistema circadiano conduce a la alteración del rendimiento de las conductas motivadas y favorece la alteración de las respuestas del apetito y la recompensa que pueden llevar a conductas adictivas (Landgraf et al., 2016; Luo y Aston-Jones, 2009; Reséndiz-Flores y Escobar, 2018).

La actividad de anticipación a la comida (AA) es un comportamiento circadiano que puede desarrollarse cuando la comida se presenta diariamente en un tiempo específico programado. La AA se expresa como un aumento de la actividad locomotora general así como un aumento de la temperatura corporal y un cambio en los niveles de hormonas y proteínas en el cerebro (c-Fos, PER1) (Ángeles-Castellanos et al., 2007; Davidson, 2009). Se ha descrito anteriormente que el acceso a alimentos apetecibles (5g de chocolate) durante el día indujo un corto periodo de 15-30 min de AA seguida de un consumo excesivo de alimentos apetecibles, (Ángeles-Castellanos et al., 2008; J. Mendoza et al., 2005).

Aquí encontramos que las ratas desarrollaron AA tanto para la sacarosa como para el alimento estándar (Ver Tabla 4), cuando comparamos el porcentaje de cambio entre la semana 5 vs. la línea base dentro de los grupos durante la hora de anticipación (1 h de acceso previo a la sacarosa/chow), encontramos que los grupos con acceso a sacarosa mostraron valores más altos en la actividad de anticipación en comparación con sus contrapartes nocturnas; el grupo SAC-D

mostró un incremento en la actividad de anticipación de 55% . Mientras que para el SAC-N fue de 35.2%, los grupos con mayor magnitud en la actividad de anticipación fueron los que tuvieron condiciones mixtas (ARA+SAC), siendo un incremento de 79.1% en la actividad de anticipación para ARA+SAC-D mientras que para ARA+SAC-N el incremento fue de 56.1%, para los grupos ARA encontramos que el grupo ARA-D mostró un incremento de 21.8% el cual no alcanzó diferencias estadísticas mientras que el grupo ARA-N mostró un incremento de 52.8% cuando se comparó con su línea base. Nuestros resultados señalan que el acceso a alimentos apetecibles o a condiciones mixtas parece ser un factor determinante para desarrollar actividad de anticipación durante el día, ya que por la noche ambos factores son capaces de inducirla de forma independiente.

La anticipación de la temperatura corporal se observó como un descenso que comenzó varias horas antes del acceso al alimento, mientras que en los grupos nocturnos se observó un aumento en anticipación. En los grupos con manipulación durante el día el descenso fue estadísticamente significativo para los grupos SAC (-0,38%) y ARA (-0,64%) y se observó una tendencia a la disminución en el grupo ARA+SAC. Este efecto día-noche puede depender del sistema circadiano. En estudios anteriores que utilizaron la temperatura corporal como marcador de la anticipación, se puede observar una disminución en esta variable previo al acceso al alimento, aunque en varios estudios esta disminución no se discute (Blancas et al., 2014; Gooley et al., 2006; Krieger, 1974). Es importante destacar que esta disminución no se observó en los grupos con manipulaciones durante la noche. En los grupos con manipulaciones durante la noche se observó un aumento en el porcentaje de cambio en comparación con la línea base para los grupos SAC (0,64%) y ARA+SAC (1,07%), se encontró un aumento en el grupo ARA-N pero no alcanzó la significación estadística (0,24%).

Anteriormente se ha descrito que la intensidad de AA está directamente relacionada con las horas de privación de alimento que preceden al acceso a los

alimentos. Mientras que una AA fuerte se observa cuando el acceso a los alimentos se limita a 2-4 h diarias seguidas de un ayuno de 20-22 h (J. Mendoza et al., 2005), Stephan y Becker (1989), demostraron que la intensidad de la AA disminuyó o no se observó cuando el acceso a los alimentos se extendió a 12 h, señalando la relevancia de la duración de la restricción alimentaria para la intensidad y el inicio de la AA. En el presente protocolo las ratas tuvieron acceso a los alimentos durante 16 horas y se dejaron sin alimentos durante sólo 8 horas, esto puede explicar la falta de AA para el RFA-D, también encontramos que la intensidad de la actividad de AA podría depender de la hora de acceso a la comida estandar y/o palatable.

Se encontró un retraso en el inicio de la actividad nocturna para los grupos con acceso a la comida en ZT17. Observaciones recientes utilizando el acceso programado a los alimentos han indicado que los alimentos son una fuerte señal de sincronización para el sistema circadiano (Ubaldo-Reyes LM et al., 2017) y que el tiempo de disponibilidad de los alimentos puede impulsar los osciladores circadianos fuera del NSC (Sheward et al., 2007). Aquí mostramos que en las ratas expuestas a un ciclo normal de luz y oscuridad, el acceso restringido a los alimentos puede desplazar el inicio de la actividad nocturna, confirmando la fuerte influencia de los alimentos en la expresión de la actividad diaria y los ritmos de temperatura.

### **7.3. Efectos de la CA en la vía mesolímbica**

En la rata la síntesis y liberación de dopamina en la vía mesolímbica se incrementa durante la noche (Castañeda, de Prado, Prieto, & Mora, 2004), sugiriendo que este mecanismo modula la motivación en los roedores nocturnos para buscar recompensas durante la noche (R. L. W. Corwin et al., 2016). Un pico nocturno de c-Fos se ha descrito en células dopaminérgicas y no dopaminérgicas en el ATV de ratas (Webb et al., 2015) y en el aumento de las conductas relacionadas con la recompensa como la autoadministración de fármacos (Abarca et al., 2002), el condicionamiento de preferencia de lugar (Webb et al., 2009) y la

conducta de búsqueda de alimento en la fase de actividad. Tales hallazgos están en concordancia con los resultados actuales que evidencian una CA de mayor magnitud durante la noche.

Efectos significativos en la densidad óptica de los receptores D1 fueron observados en los grupos expuestos a la condición combinada de acceso restringido a alimento + sacarosa. Los datos actuales concuerdan con los estudios de Carr et al (2001) que demostraron un aumento de los efectos reforzantes y de activación locomotora después de una restricción de alimentos crónica combinada con la administración de un agonista D1 (A77636). Además, Tukey et al (2013) informaron que la restricción de alimentos combinada con sacarosa indujo cascadas de señalización intracelular en neuronas que expresan D1 en el núcleo Accumbens.

Varios estudios han encontrado que usando algunas otras estrategias de reconocimiento de receptores se puede destacar el papel de los receptores D1 en la ingesta de sacarosa: Peng et al. (2011) y Carr et al. (2010) demostraron que la ingesta de sacarosa promueve un aumento de la unión de la dopamina a los receptores D1 en las neuronas que expresan D1 en la NA. (Grimm et al., 2011) demostraron que la administración de un antagonista D1 era capaz de reducir la búsqueda de sacarosa mientras que El-Ghundi, et al., 2003 demostraron que los ratones con deficiencia de receptores D1 mostraban un menor reforzamiento hacia la sacarosa.

Otros estudios han señalado que los receptores D1 están implicados principalmente en comportamientos basados en la recompensa y en la búsqueda anticipada de alimentos/sacarosa más que en comportamientos consumatorios, porque la ausencia o el bloqueo de los receptores D1 redujo los comportamientos de búsqueda de sacarosa y de aprendizaje a la fructosa (Bernal et al., 2008; El-Ghundi et al., 2003; Grimm et al., 2011; (Gallardo et al., 2014). Además, un informe anterior indicó que la restricción de alimentos induce una mayor liberación de



dopamina por parte del ATV y una mayor afinidad por los receptores D1 (Peng et al., 2011)

Anteriormente nuestro grupo había demostrado que la inmunorreactividad de c-Fos se incrementaba en el núcleo Accumbens durante el período de anticipación, también se demostró que la actividad de anticipación era menor en los animales con lesiones en el núcleo Accumbens (Jorge Mendoza et al, 2005), ya que nuestros resultados indicaron que todos los grupos mostraron actividad de anticipación, la magnitud de AA fue mayor para los grupos con condiciones mixtas (RFA+SUC) (Tabla 4) que también mostraron mayor densidad óptica para los receptores D1 en NAcCore, estos resultados indicaron que la AA puede ser desarrollado por ARA, acceso a alimentos palatables o la combinación de ambos factores.

Es importante destacar que no sólo la vía mesolímbica puede estar involucrada en la CA, un papel para el hipotálamo en la CA también ha sido evaluado en la literatura, específicamente para el hipotálamo lateral (HL), es bien conocido que el HL envía y recibe información del núcleo Accumbens (Phillipson & Griffiths, 1985; .Castro et al., 2015). Las primeras evidencias proporcionadas por Teitelbaum y Epstein (1962) demostraron que las lesiones de HL eran capaces de inducir reacciones de aversión a los alimentos apetecibles, mientras que la estimulación del HL mejora la señal hedónica del sabor para aumentar la saliencia de los alimentos (Hoebel, 1988). Estudios recientes han señalado el papel de las neuronas de orexina del LH en el aumento de las reacciones de "agrado" a la sacarosa, la estimulación optogénica, de las fibras del LH de las neuronas de orexina, en el pálido ventral ha dado lugar a un aumento de las reacciones hedónicas a la sacarosa (Castro et al., 2015). También las neuronas LH GABAérgicas que se proyectan al VTA están relacionadas en la conducción de comportamientos relacionados con la alimentación (Nieh et al., 2015).

Sin embargo, es relevante para nuestros resultados señalar que la densidad óptica a D1 mostro un incremento gradual de acuerdo con el impacto de la

restricción de la alimentación con valores más bajos para SAC, niveles más altos para los grupos ARA y los niveles más altos para las condiciones mixtas. Las manipulaciones farmacológicas, durante la adquisición de la CA y durante la anticipación, como las realizadas por Grimm y cols. (Grimm et al., 2011) ayudarán a comprender el papel específico de los receptores D1 en la CA y en la AA.

Hallazgos previos han reportado un incremento en la liberación de dopamina del ATV al NA después de la CA (N. M. Avena et al., 2008) y una disminución de los niveles basales de dopamina en el ATV (Pothos et al., 1995b). Dado que la TH es la enzima limitante de la tasa de síntesis de dopamina, decidimos explorar la TH en el ATV de animales expuestos a sacarosa restringida y al acceso restringido a alimento. Los resultados actuales mostraron que el número de células positivas a TH en el VTA no era diferente entre los grupos. Una limitación principal en este estudio fue que la inmunohistoquímica indica las células que contienen el precursor TH, pero no refleja la dinámica de la síntesis, recaptura y liberación de dopamina.

Dada la alta co-expresión de los receptores AMPA, D1 y GLUR1 en el NA, y la regulación de los receptores D1 por las subunidades GLUR1 a través de las cascadas de señalización intracelular (Hobson et al., 2013; Mangiavacchi & Wolf, 2004), en el presente estudio se examinó el número de células positivas para GLUR1 en el NAc<sub>core</sub> y NAc<sub>shell</sub>. Sin embargo, no se encontraron cambios en el número de células positivas para GLUR1 para ninguna condición. Esto concuerda con un estudio anterior que muestra que la abundancia de GLUR1 en la “célula entera” (*whole cell*) y en las fracciones sinaptosómicas del NA no difiere de la de las ratas control en ratas con acceso a la sacarosa por restricción de alimentos (K. D. Carr et al., 2010; Mangiavacchi & Wolf, 2004; Tukey et al., 2013). En ambos estudios se examinó la presencia de GLUR1 en el citoplasma y esto puede determinar una diferencia con los estudios que han descrito cambios a nivel de la membrana. D.S. Tukey et al. (2013), reportaron que las subunidades de GLUR1 fueron abundantes a nivel de la membrana después de la ingesta de sacarosa

pero no se observaron a nivel de la célula entera. Por lo tanto, se necesita más investigación para entender el papel de los receptores GLUR1 en la CA para la sacarosa y el alimento estándar, así como las estrategias que pueden descubrir su contribución a la alimentación hedónica.

## **8. CONCLUSIONES**

Los resultados actuales ponen en un rol importante la existencia de una vulnerabilidad relacionada con la hora de acceso a alimentos para el desarrollo de la CA según el momento del acceso y el tipo de alimentos (Cuadro suplementario 4). Este conocimiento es importante para comprender mejor las condiciones que promueven el desarrollo de la CA, los trastornos alimenticios y las patologías relacionadas con la recompensa.

## 9. ANEXOS Y TABLAS

ACTIVIDAD GENERAL NORMALIZADA				
Grupos				
n=6-8	DIA	NOCHE	T de Student	Valor de P
CTRL	0.42±0.02	1.42±0.031	t=25.09 df=94	< 0.0001
SAC-D	0.44±0.01	1.64±0.05	t=22.43 df=94	< 0.0001
ARA-D	0.38±0.01	1.76±0.05	t=22.71 df=94	< 0.0001
ARA+SAC-D	0.54±0.05	1.47±0.04	t=12.78 df=94	< 0.0001
SAC-N	0.46±0.04	1.61±0.04	t=17.45 df=94	< 0.0001
ARA-N	0.38±0.03	1.70±0.06	t=18.99 df=94	< 0.0001
ARA+SAC-N	0.55±0.03	1.54±0.05	t=15.85 df=94	< 0.0001

**Tabla 2.** Se muestran los recuentos medios normalizados de actividad locomotora  $\pm$  s.e. para el día (columna DÍA) y para la noche (columna NOCHE) para todos los grupos: CTRL= Grupo de control, SAC-D= Acceso a la sacarosa durante el día, ARA-D= Acceso restringido al alimento con inicio en el día, ARA+SAC-D= Acceso restringido al alimento + sacarosa con inicio en el día, SAC-N= Acceso a la sacarosa durante la noche, ARA-N= Acceso restringido al alimento con inicio en la noche, ARA+SAC-N= Acceso restringido al alimento + sacarosa con inicio en la noche. Los valores t de Student para las comparaciones entre los valores medios del día y la noche se muestran junto con los grados de libertad (df) en la tercera columna. Los valores P se muestran en la cuarta columna para cada comparación.

### TEMPERATURA

#### Grupos

n=6-8	DIA	NOCHE	T de Student	Valor de P
CTRL	36.42±0.02	37.1±0.03	t=16.17 df=46	< 0.0001
SUC-D	36.52±0.01	36.94±0.02	t=13.97 df=46	< 0.0001
RFA-D	36.46±0.01	37.06±0.02	t=17.25 df=46	< 0.0001
RFA+SUC-D	36.36±0.01	36.88±0.02	t=18.08 df=46	< 0.0001
SUC-N	36.56±0.01	36.9±0.02	t=10.20 df=46	< 0.0001
RFA-N	36.58±0.01	37.03±0.02	t=14.96 df=46	< 0.0001
RFA+SUC-N	36.49±0.02	37.07±0.02	t=15.81 df=46	< 0.0001

**Tabla 3.** Se muestran los valores medios de la temperatura  $\pm$  s.e. para el día (columna DÍA) y para la noche (columna NOCHE) para todos los grupos: CTRL= Grupo de control, SAC-D= Acceso a la sacarosa durante el

día, ARA-D= Acceso restringido al alimento con inicio en el día, ARA+SAC-D= Acceso restringido al alimento + sacarosa con inicio en el día, SAC-N= Acceso a la sacarosa durante la noche, ARA-N= Acceso restringido al alimento con inicio en la noche, ARA+SAC-N= Acceso restringido al alimento + sacarosa con inicio en la noche. Los valores t de Student para las comparaciones entre los valores medios del día y la noche se muestran junto con los grados de libertad (df) en la tercera columna. Los valores P se muestran en la cuarta columna para cada comparación.

Grupos (n=6-8)	Actividad locomotora		Temperatura	
	DIA	NOCHE	DIA	NOCHE
CTRL	14.35%	15.10%	-0.24	-0.16
SAC	55.2%	35.2%	-0.38	0.64
ARA	21.80%	52.8%	-0.93	0.24
ARA+SAC	79.1%	56.1%	-0.30	1.07

**Tabla 4.** Porcentaje de cambio entre la semana 5 y la línea de base para la actividad locomotora y la temperatura en anticipación. En las columnas del día se puede observar el porcentaje de cambio para los grupos con manipulaciones durante el día, en las columnas de la noche se muestra el porcentaje de cambio para los grupos con manipulaciones durante la noche. Cada porcentaje se obtuvo comparando los valores medios de la actividad locomotora y la temperatura con los valores de referencia de cada grupo. CTRL= Control, SUC= sacarosa, RFA= Acceso restringido a los alimentos, RFA+SUC= Acceso restringido a los alimentos + sacarosa.

## 10. Referencias

- Abarca C, Albrecht U, Spanagel R (2002) Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9026–9030 Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084940>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC124417>.
- Abizaid A, Liu Z-W, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, Roth RH, Sleeman MW, Picciotto MR, Tschöp MH, Gao X-B, Horvath TL (2006) Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest* 116:3229–3239.
- American Psychiatric Association. (2013) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed).
- Anders T (1982) Biological rhythms in development. *Psychosom Med*.
- Ángeles-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* 144:344–355.
- Ángeles-Castellanos, M., Salgado-Delgado, R., Rodríguez, K., Buijs, R. M., & Escobar, C. (2008). Expectancy for food or expectancy for chocolate reveals timing systems for metabolism and reward. *Neuroscience*, 155(1), 297–307.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.001>
- Avena NM (2010) The study of food addiction using animal models of binge eating. *Appetite* 55:734–737.
- Avena NM, Rada P, Hoebel BG (2009) Sugar and Fat Bingeing Have Notable Differences in Addictive-like Behavior 1 – 3. :1–6.
- Avena NM, Rada P, Moise N, Hoebel BG (2006) Sucrose sham feeding on a binge schedule releases accumbens dopamine repeatedly and eliminates the acetylcholine satiety response. *Neuroscience* 139:813–820.
- Bainier C, Mateo M, Felder-Schmittbuhl MP, Mendoza J (2017) Circadian rhythms of hedonic drinking behavior in mice. *Neuroscience* 349:229–238 Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.03.002>.
- Balagura, S., & Coscina, D. V. (1968). Periodicity of food intake in the rat as measured by an operant response. *Physiology and Behavior*, 3(5), 641–643.  
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(68\)90127-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(68)90127-3)
- Baltazar RM, Coolen LM, Webb IC (2013) Diurnal rhythms in neural activation in the mesolimbic reward system: Critical role of the medial prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 38:2319–2327.
- Bello, N. T., Sweigart, K. L., Lakoski, J. M., Norgren, R., & Hajnal, A. (2003). Restricted feeding with scheduled sucrose access results in an upregulation of the rat dopamine transporter. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(5), R1260-8. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00716.2002>
- Bernal, S. Y., Dostova, I., Kest, A., Abayev, Y., Kandova, E., Touzani, K., ... Bodnar, R. J. (2008). Role of dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens shell on the acquisition and expression of fructose-conditioned flavor-flavor preferences in rats.

- Blancas, A., González-García, S. D., Rodríguez, K., & Escobar, C. (2014). Progressive anticipation in behavior and brain activation of rats exposed to scheduled daily palatable food. *Neuroscience*, 281, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.036>
- Buijs RM, la Fleur SE, Wortel J, Van Heyningen C, Zuiddam L, Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K, Nijima A (2003) The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol* 464:36–48.
- Carr KD (2002) Augmentation of drug reward by chronic food restriction: Behavioral evidence and underlying mechanisms. *Physiol Behav* 76:353–364.
- Carr KD, Chau LS, Cabeza de Vaca S, Gustafson K, Stouffer M, Tukey DS, Restituto S, Ziff EB (2010) AMPA receptor subunit GluR1 downstream of D-1 dopamine receptor stimulation in nucleus accumbens shell mediates increased drug reward magnitude in food-restricted rats. *Neuroscience* 165:1074–1086 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.015>.
- Castaneda T, Prado B (2004) Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. *J pineal ....*
- Castro, D. C., Cole, S. L., & Berridge, K. C. (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), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00090>
- Chausse B, Solon C, Caldeira da Silva CC, Masselli Dos Reis IG, Manchado-Gobatto FB, Gobatto C a, Velloso L a, Kowaltowski AJ (2014) Intermittent fasting induces hypothalamic modifications resulting in low feeding efficiency, low body mass and overeating. *Endocrinology* 155:2456–2466.
- Colantuoni C, Schwenker J, McCarthy J, Rada P, Ladenheim B, Cadet JL, Schwartz GJ, Moran TH, Hoebel BG (2001) Excessive sugar intake alters binding to dopamine and mu-opioid receptors in the brain. *Neuroreport* 12:3549–3552 Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11733709](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11733709).
- Corwin, R. L. (2004). Binge-type eating induced by limited access in rats does not require energy restriction on the previous day. *Appetite*, 42(2), 139–142. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2003.08.010>
- Corwin, R. L. W., Wojnicki, F. H. E., Zimmer, D. J., Babbs, R. K., McGrath, L. E., Olivos, D. R., ... Hayes, M. R. (2016). Binge-type eating disrupts dopaminergic and GABAergic signaling in the prefrontal cortex and ventral tegmental area. *Obesity*, 24(10), 2118–2125. <https://doi.org/10.1002/oby.21626>
- Corwin, R. L., & Wojnicki, F. H. (2006). Binge Eating in Rats with Limited Access. *Current Protocols in Neuroscience*, 9.23B.1-9.(Supplement 36), 1–11.
- Cottone P, Sabino V, Steardo L, Zorrilla EP (2008) Opioid-dependent anticipatory negative contrast and binge-like eating in rats with limited access to highly preferred food.

- Neuropsychopharmacology 33:524–535.
- Davidson, A. J. (2009). Lesion studies targeting food-anticipatory activity. *European Journal of Neuroscience*, 30(9), 1658–1664. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06961.x>
- Dileone, R. J., Taylor, J. R., & Picciotto, M. R. (2012). The drive to eat: comparisons and distinctions between mechanisms of food reward and drug addiction. *Nature Neuroscience*, 15(10), 1330–1335. <https://doi.org/10.1038/nn.3202>
- Dardente H, Cermakian N (2007) Molecular Circadian Rhythms in Central and Peripheral Clocks in Mammals. *Chronobiol Int* 24:195–213.
- El-Ghundi, M., O’Dowd, B. F., Erlik, M., & George, S. R. (2003). Attenuation of sucrose reinforcement in dopamine D1 receptor deficient mice. *European Journal of Neuroscience*, 17(4), 851–862. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02496.x>
- Fairburn CG, Harrison PJ (2003) Eating disorders. *Lancet* 361:407–416.
- Falcón E, McClung CA (2009) A role for the circadian genes in drug addiction. *Neuropharmacology* 56:91–96.
- Gallardo, C. M., Darvas, M., Oviatt, M., Chang, C. H., Michalik, M., Huddy, T. F., ... Steele, A. D. (2014). Dopamine receptor 1 neurons in the dorsal striatum regulate food anticipatory circadian activity rhythms in mice. *eLife*, 3(Ld), e03781. <https://doi.org/10.7554/eLife.03781>
- Golombek DA, Bussi IL, Agostino P V (2014) Minutes, days and years: molecular interactions among different scales of biological timing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:20120465 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3895990&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gooley, J. J., Schomer, A., & Saper, C. B. (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nature Neuroscience*, 9(3), 398–407. <https://doi.org/10.1038/nn1651>
- Grimm, J. W., Harkness, J. H., Ratliff, C., Barnes, J., North, K., & Collins, S. (2011). Effects of systemic or nucleus accumbens-directed dopamine D1 receptor antagonism on sucrose seeking in rats. *Psychopharmacology*, 216(2), 219–233. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2210-y>
- Hampp G, Ripperger JA, Houben T, Schmutz I, Blex C, Perreau-Lenz S, Brunk I, Spanagel R, Ahnert-Hilger G, Meijer JH, Albrecht U (2008) Regulation of Monoamine Oxidase A by Circadian-Clock Components Implies Clock Influence on Mood. *Curr Biol* 18:678–683.
- Herzog ED, Takahashi JS, Block GD (1998) Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons.
- Hobson, B. D., O’Neill, C. E., Levis, S. C., Monteggia, L. M., Neve, R. L., Self, D. W., & Bachtell, R. K. (2013). Adenosine A1 and dopamine d1 receptor regulation of AMPA receptor phosphorylation and cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(10), 1974–83. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.96>



- Hudson JI, Hiripi E, Jr HGP, Kessler RC (2008) The Prevalence and Correlates of Eating Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *61*:348–358.
- Hudson JI, Lalonde JK, Coit CE, Tsuang MT, Mcelroy SL, Crow SJ, Bulik CM, Hudson MS, Yanovski JA, Rosenthal NR, Jr HGP (2010) Longitudinal study of the diagnosis of components of the metabolic syndrome in individuals with binge-eating disorder 1 – 3. *Am J Clin Nutr*:12–14.
- Johnson PM, Kenny PJ (2010) Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci* 13:635–641 Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.2519>.
- Kinzl JF, Traweger C, Trefalt E, Mangweth B, Biebl W (1999) Binge eating disorder in males : A population-based investigation. *88*:169–174.
- Kjelsås E, Bjørnstrøm C, Gøtestam KG (2004) Prevalence of eating disorders in female and male adolescents (14-15 years). *Eat Behav* 5:13–25.
- Koban M, Sita L, Le W, Hoffman G (2008) Sleep deprivation of rats: the hyperphagic response is real. *Sleep*:1–7.
- Krieger, D. T. (1974). Food and water restriction shifts corticosterone, temperature, activity and brain amine periodicity. *Endocrinology*, 95(5), 1195–1201. <https://doi.org/10.1210/endo-95-5-1195>
- Krügel U, Schraft T, Kittner H, Kiess W, Illes P (2003) Basal and feeding-evoked dopamine release in the rat nucleus accumbens is depressed by leptin. *Eur J Pharmacol* 482:185–187.
- Landgraf, D., Long, J. E., & Welsh, D. K. (2016). Depression-like behaviour in mice is associated with disrupted circadian rhythms in nucleus accumbens and periaqueductal grey. *European Journal of Neuroscience*, 43(10), 1309–1320. <https://doi.org/10.1111/ejn.13085>
- Lutter M, Nestler EJ (2009) Homeostatic and Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. *J Nutr* 139:629–632 Available at: <http://jn.nutrition.org/content/139/3/629.short%5Cnhttp://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.108.097618>.
- Luo, A. H., & Aston-Jones, G. (2009). Circuit projection from suprachiasmatic nucleus to ventral tegmental area: A novel circadian output pathway. *European Journal of Neuroscience*, 29(4), 748–760. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06606.x>
- Marcus MD, Wildes JE (2009) Obesity: is it a mental disorder? *Int J Eat Disord* 42:739–753.
- Mangiavacchi, S., & Wolf, M. E. (2004). D1 dopamine receptor stimulation increases the rate of AMPA receptor insertion onto the surface of cultured nucleus accumbens neurons through a pathway dependent on protein kinase A. *Journal of Neurochemistry*, 88(5), 1261–1271. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02248.x>
- McClung, C. a, Sidiropoulou, K., Vitaterna, M., Takahashi, J. S., White, F. J., Cooper, D. C., & Nestler, E. J. (2005). Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the Clock gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9377–9381. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503584102>
- Mendoza, J., Angeles-Castellanos, M., & Escobar, C. (2005). Differential role of the accumbens Shell and Core subterritories in food-entrained rhythms of rats.

Behavioural Brain Research, 158(1), 133–142.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.08.016>

- 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* 133:293–303.
- Méquinion M, Langlet F, Zgheib S, Dickson S, Dehouck B, Chauveau C, Viltart O (2013) Ghrelin: central and peripheral implications in anorexia nervosa. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:15.
- Moore RY, Speh JC, Leak RK (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 309:89–98.
- Naber D, Wirz-Justice A, Kafka MS (1982) Chronic fluphenazine treatment modifies circadian rhythms of neurotransmitter receptor binding in rat brain. *J Neural Transm* 55:277–288 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF01243449>.
- Nicola, S. M. (2016). Reassessing wanting and liking in the study of mesolimbic influence on food intake. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 311(5), R811–R840.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00234.2016>
- Nieh, E. H., Matthews, G. A., Allsop, S. A., Presbrey, K. N., Leppla, C. A., Wichmann, R., ... Tye, K. M. (2015). Decoding neural circuits that control compulsive sucrose seeking. *Cell*, 160(3), 528–541. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.003>
- Nistiar F, Racz O, Lukacinova A, Hubkova B, Novakova J, Lovasova E, Sedlakova E (2012) Age dependency on some physiological and biochemical parameters of male Wistar rats in controlled environment. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng* 47:1224–1233.
- Pan Y, Berman Y, Haberny S, Meller E, Carr KD (2006) Synthesis, protein levels, activity, and phosphorylation state of tyrosine hydroxylase in mesoaccumbens and nigrostriatal dopamine pathways of chronically food-restricted rats. *Brain Res* 1122:135–142.
- Parekh PK, Ozburn AR, Mcclung CA (2015) Circadian clock genes : Effects on dopamine , reward and addiction. *Alcohol* 49:341–349 Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.09.034>.
- Paxinos G, Watson C (2009) *The rat brain*.
- Peng, X. X., Ziff, E. B., & Carr, K. D. (2011). Effects of food restriction and sucrose intake on synaptic delivery of AMPA receptors in nucleus accumbens. *Synapse*, 65(10), 1024–1031. <https://doi.org/10.1002/syn.20931>
- Phillipson, O. T., & Griffiths, A. C. (1985). The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience*, 16(2), 275–296.  
[https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(85\)90002-8](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(85)90002-8)
- Pfaff DW (2013) *Neuroscience in the 21st century: From basic to clinical*.
- Phillipson OT, Griffiths AC (1985) The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience* 16:275–296.
- Pothos, E. N., Creese, I., & Hoebel, B. G. (1995). Restricted eating with weight loss selectively decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens and alters dopamine response to amphetamine, morphine, and food intake. *The Journal of*

- Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, 15(10), 6640–6650. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7472425](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7472425)
- Rada P, Avena NM, Hoebel BG (2005) Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience* 134:737–744.
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935–941.
- Reséndiz-Flores, M., & Escobar, C. (2018). Circadian disruption favors alcohol consumption and differential  $\Delta$ FosB accumulation in Corticolimbic structures. *Addiction Biology*, (Gardner 2011). <https://doi.org/10.1111/adb.12674>
- Roenneberg T, Daan S, Meroz M (2015) *The Art of Entrainment*. 18.
- S.G. Dimitriou, H.B. Rice, and R. L. C. (200AD). Effects of Limited Access to a Fat Option on Food Intake and Body Composition in Female Rats. *International Journal of Eating Disorders*, 28(4), 436–445. <https://doi.org/10.1097/00001199-199604000-00006>
- Salamone JD, Correa M, Mingote S, Weber SM (2003) Nucleus Accumbens Dopamine and the Regulation of Effort in Food-Seeking Behavior: Implications for Studies of Natural Motivation, Psychiatry, and Drug Abuse. 305:1–8.
- Saper CB, Chou TC, Elmquist JK (2002) The Need to Feed: Homeostatic and Hedonic Control of Eating. *Neuron* 36:199–211.
- Sheward, W. J., Maywood, E. S., French, K. L., Horn, J. M., Hastings, M. H., Seckl, J. R., ... Hargreaves, A. J. (2007). Entrainment to Feeding but Not to Light: Circadian Phenotype of VPAC2 Receptor-Null Mice. *Journal of Neuroscience*, 27(16), 4351–4358. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4843-06.2007>
- Sleipness EP, Sorg BA, Jansen HT (2007) Diurnal differences in dopamine transporter and tyrosine hydroxylase levels in rat brain: Dependence on the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1129:34–42.
- Stice E, Agras WS, Telch CF, Halmi KA, Mitchell JE, Wilson T (2000) Subtyping Binge Eating-Disordered Women Along Dieting and Negative Affect Dimensions.
- Szczypka MS, Kwok K, Brot MD, Marck BT, Matsumoto AM, Donahue BA, Palmiter RD (2001) Dopamine Production in the Caudate Putamen Restores Feeding in Dopamine-Deficient Mice. *Neuron* 30:819–828.
- ter Haar, M. B. (1972). Circadian and estrual rhythms in food intake in the rat. *Hormones and Behavior*, 3(3), 213–219. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(72\)90034-7](https://doi.org/10.1016/0018-506X(72)90034-7)
- Tönissaar, M., Herm, L., Rinken, A., & Harro, J. (2006). Individual differences in sucrose intake and preference in the rat: Circadian variation and association with dopamine D2 receptor function in striatum and nucleus accumbens. *Neuroscience Letters*, 403(1–2), 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.04.023>
- Tukey DS et al. (2013) Sucrose ingestion induces rapid AMPA receptor trafficking. *J Neurosci* 33:6123–6132.
- Ubaldo-Reyes LM, Buijs RM, Escobar C, Á.-C. M. (2017). SCHEDULED MEAL

ACCELERATES ENTRAINMENT TO A 6 HOURS PHASE ADVANCE BY SHIFTING CENTRAL AND PERIPHERAL OSCILLATIONS IN RATS. *European Journal of Neuroscience* (Vol. 46). <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>

- Waddington Lamont, E., Harbour, V. L., Barry-Shaw, J., Renteria Diaz, L., Robinson, B., Stewart, J., & Amir, S. (2007). Restricted access to food, but not sucrose, saccharine, or salt, synchronizes the expression of *Period2* protein in the limbic forebrain. *Neuroscience*, 144(2), 402–411. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.09.027>
- Webb IC, Baltazar RM, Wang X, Pitchers KK, Coolen LM, Lehman MN (2009) Diurnal variations in natural and drug reward, mesolimbic tyrosine hydroxylase, and clock gene expression in the male rat. *J Biol Rhythms* 24:465–476.
- Webb, I. C., Lehman, M. N., & Coolen, L. M. (2015). Diurnal and circadian regulation of reward-related neurophysiology and behavior. *Physiology and Behavior*, 143, 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.02.034>
- Weltzin TE, Hsu LKG, Pollice C, Kaye WH (1991) Feeding patterns in *Bulimia nervosa*. *Biol Psychiatry* 30:1093–1110.
- Wolff GE, Crosby RD, Roberts J a, Wittrock D a (2000) Differences in daily stress, mood, coping, and eating behavior in binge eating and nonbinge eating college women. *Addict Behav* 25:205–216.
- Zigman JM, Elmquist JK (2003) Minireview: From Anorexia to Obesity—The Yin and Yang of Body Weight Control. *Endocrinology* 144:3749–3756.