

# Activación progresiva de áreas cerebrales inducida por la ingestión diaria de una golosina dulce

Áurea Susana Blancas Velázquez y Carolina Escobar Briones\*

Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

## Resumen

La ingestión de alimentos dulces y sabrosos desencadena eventos de atracón y sobreconsumo por placer, y no por hambre. En roedores, cuando se ofrecen alimentos dulces en horarios restringidos se desarrollan conductas de anticipación y a nivel cerebral se observa incremento de actividad neuronal en áreas corticolímbicas a la hora que se entrega la golosina. Este patrón de actividad persiste durante muchos días después de interrumpir el protocolo, sugiriendo un proceso de estimación de tiempo relacionado con dependencia o adicción. El presente trabajo exploró el desarrollo de esta activación neuronal en ratas que recibieron 5 g de chocolate diariamente durante ocho días. Se comparó la activación neuronal, medida con *c-Fos* de la corteza prelímbica, el núcleo accumbens (ACC) y la corteza piriforme (CxPir) evocadas al día 1, 3, 5 y 8 durante la anticipación y posterior a la ingestión del chocolate. La ingestión de chocolate provoca siempre la misma activación neuronal, independientemente de los días de exposición. Durante la espera y anticipación se observó un proceso gradual de activación neuronal, que el octavo día alcanzó la misma intensidad que por la ingesta del chocolate. Concluimos que la anticipación conductual y activación neuronal corticolímbica a un alimento dulce son procesos progresivos.

**PALABRAS CLAVE:** Corteza prefrontal. Núcleo accumbens. Hipotálamo. Sincronización. Ritmos circadianos. Adicción.

## Abstract

Ingestion of sweet and tasty food is a relevant factor inducing binge eating and overconsumption of food motivated by pleasure rather than hunger. When sweet food is offered daily in a scheduled manner, rodents develop anticipatory behavior and at the brain level increased neuronal activation in corticolimbic areas at the moment of the snack delivery. This pattern of activation persists for several days after interrupting delivery of the daily scheduled snack, suggesting a timekeeping process related with dependence or addiction. The present study explored the process of development of this neuronal activation in rats receiving chocolate 5 g daily for eight days. Neuronal activation was measured with *c-Fos* in prelimbic cortex, nucleus accumbens, and piriform cortex on days 1, 3, 5, and 8 after ingestion of chocolate and during the interval of anticipating the daily snack. Here we report that chocolate ingestion produces the same intense activation on all days evaluated, independent of days of exposition. During expectancy and anticipation, neuronal activation builds up along the days, reaching on day 8 the same intensity as observed after ingestion. We conclude that behavioral anticipation and neuronal activation in corticolimbic areas to a palatable snack is a progressive process.

**KEY WORDS:** Prefrontal cortex. Nucleus accumbens. Hypothalamus. Entrainment. Circadian rhythms. Addiction.

### Correspondencia:

\*Carolina Escobar Briones  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Departamento de Anatomía  
Avda. Universidad 3000, Edificio B, 4.º piso  
Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México, D.F.  
E-mail: escocarolina@gmail.com

Fecha de recepción en versión modificada: 15-11-2012

Fecha de aceptación: 20-02-2013

## Introducción

Ante la epidemia mundial de obesidad se ha reconocido ampliamente que la ingestión excesiva de alimento obedece a múltiples factores. Además del hambre, un estímulo importante para comer es el placer anticipado por la comida sabrosa, el cual está determinado por las cualidades sensoriales de los alimentos. Por ello, una gran cantidad de alimentos comerciales contienen grandes cantidades de grasa y/o azúcares que resultan atractivos y sabrosos al paladar<sup>1</sup>. El intenso y a veces irrefrenable impulso por consumir cierto tipo de alimentos ha llevado a plantear que se puede desarrollar una adicción a los alimentos, ya que en algunas personas se acompaña por síntomas de malestar cuando no pueden consumirlos<sup>2</sup>. En particular, los alimentos ricos en azúcar y grasa inducen atracones (*binge eating*), una ingestión exagerada e incontrolada de algún alimento<sup>3</sup>. Esta conducta se acompaña del deseo intenso por ingerir el alimento específico, proceso que se conoce en inglés como «*craving*». Estos episodios se caracterizan por estados de ansiedad y búsqueda por el bocado apetitoso que puede ser dulce, salado y, generalmente, con alto contenido energético<sup>4</sup>.

Con modelos animales se trata de comprender los mecanismos cerebrales que llevan a los atracones, y a la búsqueda incontrolada de alimentos dulces, palatables. Con roedores se ha observado que con el paso de los días de exposición a golosinas, la cantidad consumida aumenta progresivamente<sup>3,5</sup>. Cuando el alimento apetitoso se ofrece en una ración restringida a diario y a la misma hora, las ratas de laboratorio desarrollan una conducta de anticipación caracterizada por activación y respuestas de búsqueda que inician unos 30 min antes de que se les entregue la golosina<sup>6,7</sup>; además, el acceso restringido provoca atracones de la comida apetitosa<sup>5</sup>. Asimismo, después de haber consumido durante varios días una golosina dulce, la privación del alimento apetitoso genera durante varios días activación y búsqueda a la hora programada de acceso, y respuestas de abstinencia similares a las observadas en personas adictas a sustancias de abuso<sup>3,7</sup>, lo que sugiere un proceso de adicción al alimento.

En roedores la ingestión de alimentos dulces provoca activación de diversas áreas cerebrales, entre ellas el núcleo ACC del estriado ventral y la corteza prefrontal<sup>8</sup>. Se ha descrito que la activación neuronal en estas áreas responde a la liberación de dopamina, entre

otros neurotransmisores<sup>8,9</sup>. La liberación de dopamina se ha asociado al efecto reforzador y de satisfacción que tiene el sabor dulce sobre los individuos<sup>10</sup>. Otros grupos han mostrado que durante la espera o expectación por comida dulce aumenta la producción del ARN mensajero de preproencefalinas en el ACC<sup>11</sup>. Se ha propuesto que el ACC es la interfase neural entre el hipotálamo, el sistema límbico y los ganglios basales para la expresión de conductas motivadas mediada por área tegmental ventral, productora de dopamina y el globo pálido<sup>12-14</sup>. A su vez, proyecciones excitadoras que llegan al ACC desde la corteza prefrontal han mostrado mediar el ímpetu que se imprime a la respuesta conductual ante un estímulo incentivo<sup>15</sup>. Este circuito constituye parte del sistema de recompensa, ya que se ha observado que se activa ante un estímulo placentero, ya sea tangible o solo evocado por la memoria<sup>16</sup>.

En ratas, hemos reportado que cuando se entregan diariamente 5 g de chocolate a una hora específica durante varias semanas, se produce activación neuronal en anticipación al evento diario de entrega de chocolate, en núcleos involucrados con el sistema de recompensa, en particular en la corteza prefrontal prelímbica (CPF) y el ACC<sup>6,17</sup>. El acceso diario y a la misma hora de una golosina dulce también genera oscilaciones circadianas de genes reloj en estas estructuras límbicas, lo cual sugiere la activación de un proceso de estimación del tiempo, que pudiera ser el fundamento de la búsqueda del alimento apetitoso ante su restricción y durante la abstinencia<sup>7,18</sup>.

Los cambios de actividad neuronal observados en roedores expuestos diariamente a una golosina dulce podrían ser resultado de un proceso gradual o bien podrían establecerse abruptamente posterior a un evento reforzante. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar los cambios en la actividad neuronal generados por la ingestión diaria de una golosina apetitosa, especialmente determinar el proceso que subyace a la expectación de un alimento apetitoso. Para ello, se hizo un seguimiento de la respuesta neuronal en el ACC, CPF como representantes del sistema motivacional, y de la CxPir como estructura control e indicador de la respuesta olfatoria y de exploración. La actividad neuronal se determinó con la expresión de la proteína c-Fos, que se considera un marcador de excitación neuronal<sup>19</sup>. Esta respuesta se determinó en cerebros de sujetos sacrificados posterior a la ingestión y durante el intervalo de anticipación y espera de una golosina palatable (chocolate), así como en controles no manipulados. Primeramente, se evidenció el

desarrollo de la conducta de anticipación y expectación a un bocado dulce (chocolate) por medio de un registro conductual y la elaboración de actogramas de la actividad general de las ratas. Posteriormente, se estudiaron cerebros de ratas que consumieron y de ratas que fueron desarrollando expectación por el alimento dulce en diferentes días posteriores a la exposición diaria al chocolate.

## Material y métodos

### Sujetos y condiciones de experimentación

Se trabajó con ratas albinas, adultas, machos de la cepa Wistar, con un peso inicial de 250-300 g de peso, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y mantenidas en el bioterio del Departamento de Anatomía. Durante las fases experimentales, las ratas se alojaron individualmente en cajas de acrílico transparente con agua y comida siempre disponibles. Las cajas se mantuvieron sobre placas metálicas con sensores de movimiento en roperos que alojan ocho cajas cada una. En estos roperos se mantiene el control del ciclo luz-oscuridad, que en esta ocasión se mantuvo 12:12, (encendido de las luces a las 06.00 de la mañana y apagado a las 18.00 de la tarde). La temperatura se mantuvo a 22 °C y con recambio de aire por medio de un sistema de ventilación de cada ropero y en el cuarto general de animales. El proyecto fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM, la manipulación de los animales se realizó bajo las normas de uso de animales de experimentación según el Decreto de Ley de Protección a los Animales del Distrito Federal, publicada en la *Gaceta Oficial* del Distrito Federal, el 26 de febrero de 2002.

### Grupos y diseño experimental

Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a uno de dos grupos:

- Control: estos sujetos se mantuvieron en las condiciones descritas, sin recibir manipulación alguna (n = 5).
- Chocolate: estos sujetos recibieron un bocado de chocolate de 5 g (Kinder® MAXI, Ferrero, 0.48 g de proteína, 2.1 g de grasas, 2.6 g de hidratos de carbono) a media mañana (12.00 h). A su vez, los sujetos de este grupo fueron divididos en dos: en uno se exploraron los cambios de actividad

neuronal por la ingestión repetida del chocolate (Ch) y en otros los cambios de actividad neuronal durante la espera y anticipación por el chocolate (E). En los sujetos de ambos grupos se registró la conducta a lo largo de los días de estudio.

### Ingestión de chocolate

Los sujetos Ch (n = 25) se asignaron a cinco grupos con cinco sujetos cada uno: un grupo se sacrificó después de un primer evento de ingestión (Ch1), otro después de dos días consecutivos de ingestión (Ch2), y los otros después de tres (Ch3), cinco (Ch5) y ocho (Ch8) días de haber ingerido el chocolate. Los animales fueron sacrificados una hora después de ingerir el alimento apetitoso (13.00 h) para determinar, por medio de la expresión de la proteína c-Fos, las áreas cerebrales que expresan incremento de actividad y que responden al estímulo del chocolate.

### Anticipación por chocolate

Otra serie de ratas (n = 20) que recibieron chocolate fueron sacrificadas al momento de estar esperando su ración diaria de chocolate (12.00 h) para determinar los cambios asociados a la espera y expectación. Se sacrificaron cuatro grupos de ratas (n = 5) cuando esperaban su segunda ración (E2), su tercera ración (E3), la quinta (E5) y octava (E8) entrega de chocolate. Estos grupos fueron constituidos por cinco sujetos cada uno y comparados con controles no expuestos previamente al chocolate.

### Monitoreo automatizado de conducta

Todos los sujetos fueron monitoreados diariamente durante la línea base y la fase experimental por medio de un sistema automatizado de sensores de presión colocados debajo de cada hábitat de las ratas. Estos sensores envían pulsos cada minuto a un ordenador que guarda la cuenta de eventos en que se activan los sensores, y proporciona mapas de tiempo diarios con la organización temporal del movimiento de las ratas. El sistema fue desarrollado para nuestro grupo por Omnia México.

Los datos obtenidos se analizan con el sistema SPAD9, desarrollado por el ingeniero Adrián Hernández (UNAM) basado en Matlab, y se representan con actogramas. Se obtuvieron promedios de actividad diaria de la línea base y del total de los días en que se entregó chocolate.

## **Inmunohistoquímica y análisis de actividad cerebral**

Los animales se sacrificaron el día y a la hora programada para cada grupo. Se inyectaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (Barbital) (1 ml) y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo hacia la aorta con 150-200 ml de solución salina isotónica al 0.9%, seguida de 150-200 ml de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PBS, 0.1 M, con un pH de 7.2).

Al finalizar la perfusión se extrajeron manualmente los cerebros con ayuda de gubias. Se posfijaron en paraformaldehído durante 24 h y posteriormente se crioprotegieron en sacarosa al 30% durante 72 h. Los cerebros se cortaron en un criostato a  $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$  en cortes coronales de  $40\text{ }\mu\text{m}$  de grosor que se recolectaron en cuatro series en PBS.

Se tomó una serie de cada cerebro y se incubó con el anticuerpo primario para la proteína c-Fos (anti-c-Fos hecho en conejo, Santa Cruz Biotechnology) durante 72 h en una dilución de 1:2,500 en PBS con gelatina natural al 2.5% y tritón X-100 al 1% (PBSGT). Terminado el tiempo de incubación, los cortes se lavaron tres veces durante 10 min con PBS, y se incubaron con el anticuerpo secundario (Biotinilado anticonejo, hecho en cabra, Vector Laboratories Inc.) a una dilución de 1:200 en PBSGT durante 90 min. Terminado este periodo, se lavaron los cortes tres veces durante 10 min en PBS y se incubaron en el complejo AB (avidina-biotina Vector Laboratories Inc.) a una dilución en PBSGT de 9:1,000 durante 90 min. Al finalizar este periodo, se lavó el tejido y se activó la reacción de oxidación con diaminobenzidina en triz 7.2 Ph (1.54 g por cada 100 ml) y peróxido de hidrógeno ( $35\text{ }\mu\text{m}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% por cada 100 ml). Los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, se deshidrataron gradualmente con alcoholes y xilol, y se cubrieron con cubreobjetos y resina Entellan (Merck).

### **Cuantificación de células inmunopositivas**

Se seleccionaron cortes de la zona anterior, medial y posterior de cada núcleo con la ayuda del atlas estereotáxico para rata de Paxinos y Watson (1998). Se localizaron la CPF (3.5, 3.2 y 2.5 mm anterior a bregma), el ACC (1.9, 1.6 y 1.2 mm anterior a bregma) y la CxPir (1.9, 1.6 y 1.2 mm anterior a bregma).

Las laminillas con los cortes se seleccionaron con un microscopio óptico (Olympus BX41), el cual cuenta con una cámara (Evolution LC color) conectada a un ordenador. Se adquirieron imágenes con

una amplificación de 20x, digitalizadas automáticamente con el programa Image-Pro Plus 5.1. Las fotografías digitales se guardaron en formato jpg.

Para contar las células inmunopositivas para Fos se utilizó un sistema computarizado de análisis (Image J Launcher). Se localizaron las células positivas a c-Fos y se contaron automáticamente, tomando como criterios el fondo de la imagen y el tamaño de los núcleos celulares para evitar que en el conteo se incluyeran marcas no correspondientes a marcas de c-Fos.

### **Estadística**

Para el análisis conductual se elaboraron actogramas y promedios de actividad con las cuentas automáticas como variable dependiente. Los datos de la cuantificación neuronal se representan como medias  $\pm$  error estándar. Para el análisis neuronal se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, la variable independiente fueron los días transcurridos comiendo chocolate, y la variable dependiente, la cantidad de células inmunorreactivas a la proteína c-Fos. Se aplicó la prueba *post hoc* de Tukey.

## **Resultados**

### **Análisis conductual**

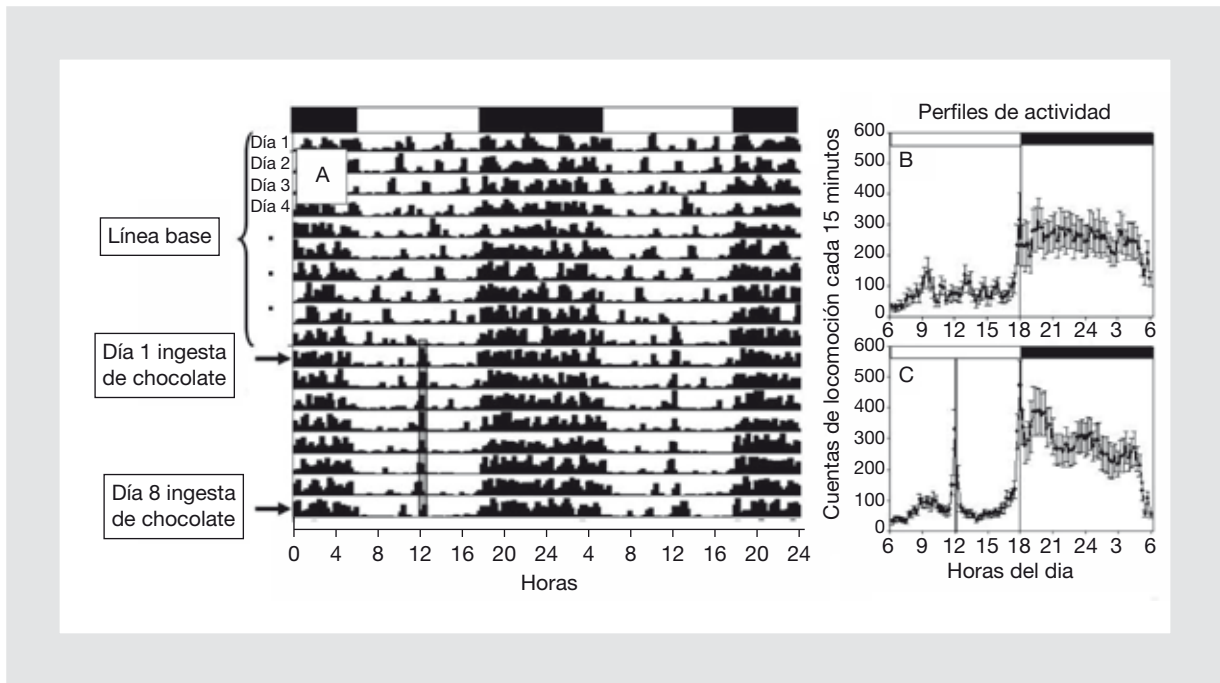
Durante la línea base, el 100% de las ratas mostraron un patrón de actividad nocturno bien definido, con baja actividad durante el día (23% del total diario) y el mayor número de cuentas de actividad durante la noche (77%). Durante la fase experimental en que se entregó diariamente un pedazo de chocolate de 5 g, las ratas conservaron su actividad nocturna y mostraron un componente de actividad adicional a la hora de la entrega del chocolate. La conducta de anticipación que mostraron fue muy breve, cercana a los 15 min (Fig. 1).

### **Análisis neuronal**

La expresión de la proteína c-Fos es de tipo nuclear, por lo que se detectó por la expresión de núcleos oscuros positivos por el proceso de inmunohistoquímica (Fig. 2).

### **Núcleo accumbens**

En el grupo de ingesta de chocolate, el número de las células inmunopositivas para c-Fos en el ACC fue



**Figura 1. A:** actograma que muestra el número de eventos de la actividad general diaria de una rata. Los primeros 10 días se tomaron como línea base y se observa la organización temporal circadiana con actividad predominantemente durante la noche. La flecha superior indica el día en que se inicia el protocolo de entregarle a la rata, diariamente y a la misma hora, 5 g de chocolate, mostrado por el recuadro gris. La flecha inferior indica el último día de entrega de chocolate. **B:** promedio de actividad general para un ciclo de 24 h durante la línea base (n = 8). **C:** promedio de actividad del último día del experimento; se observa un incremento de actividad locomotora a las 12 h, cuando se recibe el chocolate indicado por la línea vertical. Las barras horizontales blanca y negra representan el día y la noche.

significativamente mayor que en el grupo control, y en el grupo Ch se observó un número de células positivas similar a lo largo de los días de ingestión de chocolate (Ch2, Ch3, Ch5 y Ch8). El ANOVA de una vía indicó diferencia significativa entre los sujetos Ch de sus controles ( $F = 3.576$ ;  $p = 0.023$ ) (Tabla 1 y Fig. 2).

En el grupo expectante se observó que la expresión de células inmunopositivas a c-Fos incrementó progresivamente conforme transcurrieron más días de exposición al chocolate. El ANOVA de una vía mostró diferencias dadas por los días de exposición previa al chocolate ( $F = 9.915$ ;  $p < 0.001$ ). La prueba *post hoc* de Tukey indicó diferencias estadísticamente significativas entre las ratas del grupo control y las ratas E5 y E8 (Tabla 1 y Fig. 2).

### Corteza prefrontal prelámbica

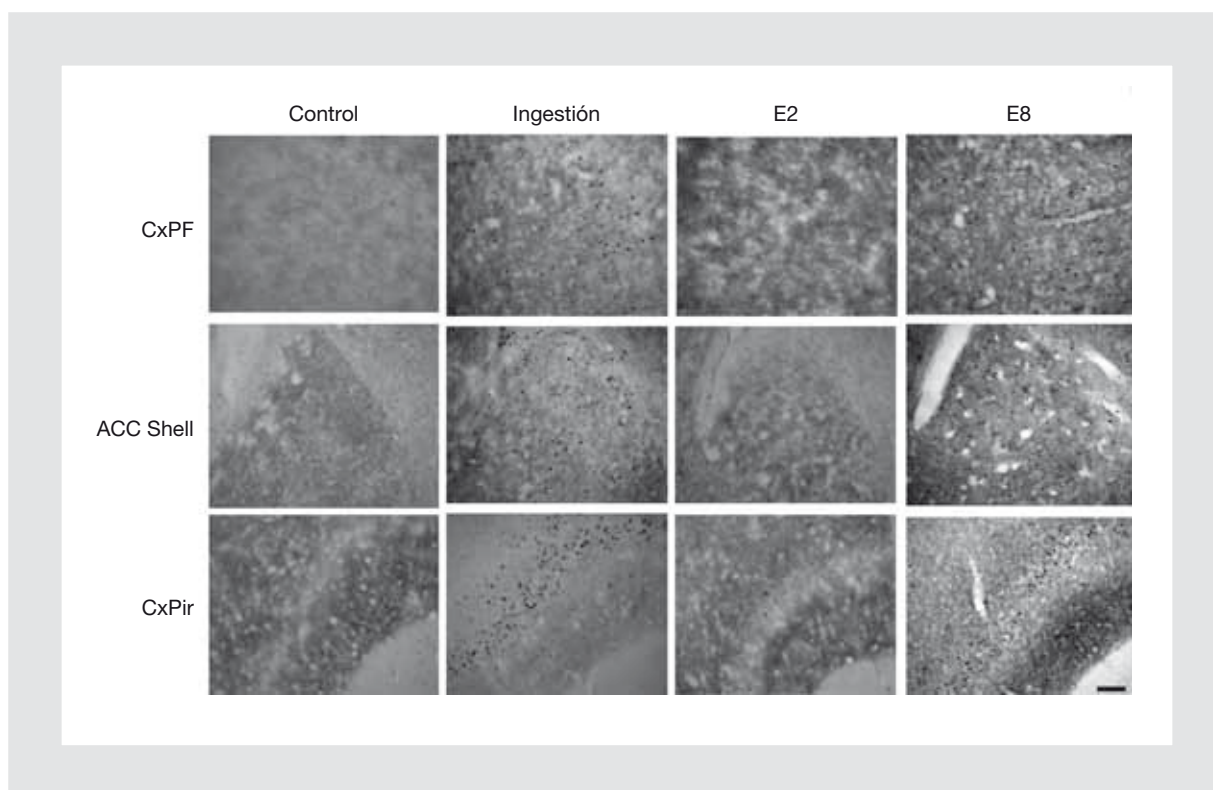
En el grupo Ch, las células inmunopositivas para c-Fos de la CPF mostraron una activación constante a lo largo de los días y mayor en todos los días que al grupo control. El ANOVA de una vía indicó diferencias entre los grupos ( $F = 4.531$ ;  $p < 0.05$ ). La prueba *post hoc* indicó que los días 1, 2, 3 y 8 son

estadísticamente diferentes al grupo control con  $p < 0.05$  (Tabla 1 y Fig. 2)

En la corteza prefrontal prelámbica del grupo expectante se observó que la expresión de células inmunopositivas a c-Fos aumentó conforme a los días de exposición al chocolate. El ANOVA de una vía indicó que hubo diferencias entre los días de exposición al chocolate (E2 vs E3, vs E5 y E8;  $F = 8.733$ ;  $p < 0.001$ ). Se realizó la prueba *post hoc*, que indicó diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los animales expectantes a partir del día E3 ( $p < 0.05$ ).

### Corteza piriforme

En la corteza piriforme del grupo Ch se observó una tendencia de las células inmunorreactivas a c-Fos a decrecer en número conforme pasaron los días de consumo de chocolate, aunque en todos los días se observa una mayor activación en comparación con el grupo control. El ANOVA de una vía indicó diferencias entre los grupos ( $F = 7.802$ ;  $p < 0.01$ ). La prueba *post hoc* indicó diferencias estadísticamente significativas entre E1 y E2 con el grupo control ( $p < 0.01$ ) (Tabla 1 y Fig. 2).



**Figura 2.** La activación neuronal determinada con la expresión de la proteína *c-Fos* durante la espera del chocolate depende de los días previos de ingesta. Horizontalmente se muestran imágenes digitalizadas de la CPF, ACC y CxPir. La primera columna muestra el patrón de actividad que se observa en un sujeto control: ratas que nunca ingirieron ni estuvieron en contacto con el chocolate. La columna de ingestión muestra la expresión de *c-Fos* en ratas una hora después de haber ingerido 5 g de chocolate; obsérvense los puntos oscuros. La columna E2 muestra poca o nula expresión de *c-Fos* en ratas que al momento de ser sacrificadas no ingirieron chocolate y que únicamente lo habían consumido el día anterior a su sacrificio. La actividad neuronal es igual a la del grupo control que nunca ingirió chocolate. La columna E8 muestra la activación neuronal con *c-Fos* en ratas esperando el chocolate después de siete días de haberlo ingerido. La barra negra (esquina inferior derecha) muestra una escala de 100  $\mu\text{m}$ .

En el grupo expectante, se observó una tendencia similar a lo observado en el ACC y CPF, con aumento progresivo del número de células positivas a *c-Fos* asociado a los días de exposición. El ANOVA de una vía indicó diferencias entre los grupos ( $F = 4.161$ ;  $p < 0.05$ ). Al aplicar la prueba *post hoc* se encontró que la diferencia estaba dada entre el grupo control y el grupo expectante del día 8 ( $p < 0.05$ ).

## Discusión

Los datos aquí mostrados indican que la ingestión diaria de chocolate provoca activación en las ratas a una hora en que normalmente estarían dormidas. Este efecto ya se había reportado previamente<sup>6,7</sup>, y además se había reportado que se desarrolla actividad de anticipación muy breve, lo cual hace que en el actograma y su análisis con promedios de actividad no sea muy evidente. Por esta razón, algunos estudios han puesto en duda la existencia de la anticipación a

comidas dulces basados en modelos similares al de este estudio, pero utilizando otro tipo de alimentos dulces<sup>20-22</sup>. Por otro lado, esta anticipación es muy precisa y se repite durante muchos ciclos posterior a la interrupción de la entrega del chocolate, comprobando la participación de un sistema de estimación de tiempo asociado a esta activación conductual<sup>7</sup>.

Se ha observado que la conducta de anticipación es intensa cuando lo que se restringe es el tiempo de alimentación a dos horas diarias<sup>23,24</sup>. La anticipación se hace aún más robusta cuando el acceso al alimento se restringe al grado de inducir pérdida de peso en los roedores y producir una condición hipocalórica<sup>25</sup>. En la condición descrita en este estudio, las ratas estuvieron *ad libitum*, sin restricción de alimento alguna, de manera que la conducta de anticipación resultante no fue provocada por hambre y estuvo asociada exclusivamente al factor motivacional/hedónico por comer chocolate.

La activación neuronal resultante de la ingestión (Ch) fue similar durante los días de seguimiento en las

**Tabla 1. Número de células positivas a c-Fos en estructuras cerebrales en condiciones control, posterior a la ingestión y durante la anticipación al chocolate. Se observan los cambios graduales en la anticipación, mientras que la ingestión de chocolate provoca todos los días la misma activación significativamente distinta del control**

	Control	Ingestión				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 5	Día 8
ACC	17.3 ± 5.5	132 ± 37*	138 ± 5*	138 ± 17*	107 ± 27*	109 ± 12*
CPF	19 ± 3.1	178 ± 37*	127 ± 8*	130.3 ± 27*	84 ± 10*	119 ± 18*
CxPir	6.33 ± 1	225 ± 17*	140 ± 29*	113 ± 35	64 ± 23	126 ± 16
Anticipación						
ACC	17.3 ± 5		16.6 ± 8	81.2 ± 19	88 ± 28*	141 ± 4*
CPF	19 ± 3.1		16 ± 5	97 ± 33*	116 ± 20*	139 ± 27*
CxPir	6.33 ± 1		40.6 ± 3.8	79.2 ± 31	53 ± 16	118 ± 22*

\*Diferencia estadísticamente significativa entre el control y el grupo indicado ( $p < 0.01$ ).

dos estructuras límbicas, lo cual sugiere que el sabor y la experiencia hedónica asociados a la ingestión de chocolate son siempre iguales, independientemente de los días sucesivos de exposición. En cambio, la activación de la CxPir disminuyó progresivamente con los días, lo que sugiere un decremento en la experiencia olfatoria, posiblemente porque el paso de los días llevó a que la entrega de chocolate dejara de ser un estímulo novedoso. Por el contrario, la activación neuronal asociada a la espera y anticipación al chocolate fue aumentando conforme pasaron los días de exposición e ingestión. Especialmente en la CPF hubo cambios significativos desde el tercer día de espera del chocolate, mientras que en el ACC se observaron cambios significativos a partir del día E5 y en la CxPir al día E8. Este hallazgo confirma el papel relevante que juega la CPF para el establecimiento de motivaciones y procesos de anticipación, como ya se ha propuesto antes, y confirma la importancia de la corteza prefrontal para generar anticipación o expectativa ante la exposición de un estímulo motivacional<sup>18</sup>.

Interesantemente, el aumento progresivo de activación se observó en por lo menos estas tres estructuras estudiadas, sugiriendo que el desarrollo de la espera y anticipación de un alimento sabroso involucra un circuito muy complejo de estructuras involucradas tanto en procesos de entrada sensorial, como en integración homeostática, hedónica y motivacional<sup>18</sup>. Entre ellas, la CPF mostró ser la primera en activarse significativamente durante la espera, lo cual la sitúa como posible reguladora o marcapasos de los ciclos diarios de activación sincronizada por el chocolate.

### **Implicación para la formación de adicciones**

Las ratas que ingieren y esperan chocolate muestran conductas de búsqueda del chocolate previas a la hora de entrega de este alimento apetitoso, lo cual podría semejar a las conductas que expresan las personas autodenominadas adictas al chocolate cuando quieren consumirlo, ya que estas también reportan ansiedad e incapacidad para resistirse a su consumo<sup>2</sup>. Estas conductas se acompañan de cambios en la actividad cerebral que van estableciéndose progresivamente conforme los sujetos se van exponiendo diariamente y a la misma hora a la golosina dulce (chocolate). Por tanto, este estudio demuestra que el proceso de adquisición de adicciones al alimento se establece de forma gradual e involucra estructuras corticolímbicas.

### **Agradecimientos**

Este proyecto fue motivo de la tesis de licenciatura de Áurea Susana Blancas y recibió soporte financiero del CONACyT 82462, UNAM PAPIIT IN- 203907 y DGAPA-PAPIIT IN-224911.

### **Bibliografía**

1. Stice E, Spoor S, Ng J, Zald DH. Relation of obesity to consummatory and anticipatory food reward. *Physiol Behav.* 2009;97:551-60.
2. Hetherington M, Macdiarmid J. Chocolate addiction: a preliminary study of its description and its relationship to problem eating. *Appetite.* 1993;21(3):233-46.
3. Avena NM, Rada P, Hoebel BG. Sugar and fat bingeing have notable differences in addictive-like behavior. *J Nutr.* 2009;139(3):623-8.

4. Pelchat ML. Of human bondage: Food craving, obsession, compulsion, and addiction. *Physiol Behav.* 2002;76:347-52.
5. Corwin RL, Wojnicki FHE. Binge eating in rats with limited access to vegetable shortening. *Curr Protoc Neurosci.* 2006;9:23B.1-9.23B.11.
6. Mendoza J, Ángeles-Castellanos M, Escobar C. Entrainment by a palatable meal induces food-anticipatory activity and c-Fos expression in reward-related areas of the brain. *Neuroscience.* 2005;133:293-303.
7. Ángeles-Castellanos M, Salgado-Delgado R, Rodríguez K, Buijs RM, Escobar C. Expectancy for food or expectancy for chocolate reveals timing systems for metabolism and reward. *Neuroscience.* 2008;155(1):297-307.
8. Bassareo V, De Luca MA, Di Chiara G. Differential expression of motivational stimulus properties by dopamine in nucleus accumbens shell versus core and prefrontal cortex. *J Neurosci.* 2002;22(11):1709-19.
9. Avena NM, Rada P, Moise N. Sucrose sham feeding on a binge schedule releases accumbens repeatedly and eliminates the acetylcholine satiety response. *Neuroscience.* 2006;139:813-20.
10. Schneider LH. Orosensory self-stimulation by sucrose involves brain dopaminergic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;575:307-20.
11. Kelley AE, Will MJ, Steininger TL, Zhang M, Haber SN. Restricted daily consumption of a highly palatable food (chocolate Ensure) alters striatal enkephaline gene expression. *Eur J Neurosci.* 2003;18:2592-8.
12. Escobar C, Hernández Gonzáles M. Los mecanismos de la motivación. En: Escobar BC y Aguilar Roblero RA. *Motivación y conducta: sus bases biológicas.* Editorial manual moderno; 2002. p. 99-116.
13. Giordano M. El estriado dorsal y ventral: la interfase entre cognición, motivación y acción. En: Juárez González J, editor. *Neurobiología del hedonismo.* Manual moderno; 2007. p. 1-20.
14. Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY. From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol.* 1980;14:69-97.
15. Goto Y, Grace AA. Limbic and cortical information processing in the nucleus accumbens. *Trends Neurosci.* 2008;31(11):552-8.
16. Pelchat ML, Jhonson A, Chan R, Valdez J, Ragland D. Images of desire: food-craving activation during fMRI. *Neuroimage.* 2004;23:1486-93.
17. Ángeles-Castellanos M, Mendoza J, Escobar C. Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience.* 2007;144:344-55.
18. Webb IC, Baltazar RM, Lehman MN, Coolen LM. Bidirectional interactions between the circadian and reward systems: is restricted food access a unique zeitgeber? *Eur J Neurosci.* 2009;30:1739-48.
19. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci.* 1991;14:421-51.
20. Waddington Lamont E, Harbour VL, Barry-Shaw J, et al. Restricted access to food, but not sucrose, saccharine, or salt, synchronizes the expression of Period2 protein in the limbic forebrain. *Neuroscience.* 2007;144:402-11.
21. Hsu TC, Patton DF, Mistlberger RE, Steele AD. Palatable meal anticipation in mice. *Plos One.* 2010;5(9):e1293.
22. Verwey M, Khoja Z, Stewart J, Amir S. Differential regulation of the expression of period2 protein in the limbic forebrain and dorsomedial hypothalamus by daily limited access to highly palatable food in food-deprived and free-fed rats. *Neuroscience.* 2007;147:277-85.
23. Stephan FK. Food-entrainable oscillators in mammals. En: Takahashi JS, Turek FW, Moore RY. *Handbook of behavioral neurobiology.* Volumen 12. *Circadian Clocks.* Nueva York: Kulwer Academic/Plenum publishers; 2002. p. 223-41.
24. Mistlberger RE. Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur J Neurosci.* 2009;30:1718-29.
25. Mendoza J, Graff C, Dardente H, Pevet P, Challet E. Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci.* 2005;25(6):1514-22.