



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS Y DOPAMINÉRGICOS
EN LA CORTEZA PREFRONTAL DURANTE LA EVOCACIÓN Y EL REAPRENDIZAJE
DE LA MEMORIA DEL SABOR DESPUÉS DE UN CONSUMO PROLONGADO DE
AZÚCAR

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIC. SERAID CAYNAS ROJAS

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARÍA ISABEL MIRANDA SAUCEDO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

QUERÉTARO, MÉXICO ENERO 2019



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.



Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Neuroquímica de la Memoria del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la supervisión de la Dra. María Isabel Miranda Saucedo.

Este proyecto fue apoyado por:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT), beca doctoral 375146 y donativo 252379.

Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (PAPIIT) IN201018, IN204615.

Dedicatoria:

A mis amados padres:

Prof. Sergio Caynas Cruz y Prof. Aida Margarita Rojas Carreón.

ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS.....	6
1. RESUMEN/ABSTRACT.....	7
1.1. Resumen.....	7
1.2. Abstract.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1. Aprendizaje y memoria.....	11
2.1.1. Modelos para estudiar los diferentes tipos de memoria del sabor.....	13
2.1.1.1. Preferencia al sabor.....	13
2.1.1.2. Condicionamiento de Aversión al Sabor (CAS).....	14
2.1.1.3. Extinción del CAS.....	14
2.1.1.4. Inhibición latente del CAS (IL del CAS).....	15
2.2. Estructuras cerebrales involucradas en la memoria del sabor.....	17
2.2.1. Corteza prefrontal medial (CPFm) y su relación con la memoria del sabor.....	20
2.3. Actividad dopaminérgica y β -adrenérgica en la corteza prefrontal medial (CPFm).....	25

2.3.1. Actividad dopaminérgica y β-adrenérgica en la corteza prefrontal medial (CPFm) y su relación con el reforzamiento, la atención, la memoria y la flexibilidad conductual.....	26
2.3.2. Actividad dopaminérgica y β-adrenérgica en la corteza prefrontal medial (CPFm) y su relación con el reforzamiento, la atención, la memoria y la flexibilidad conductual.....	30
2.3.3. Actividad dopaminérgica y β-adrenérgica en la corteza prefrontal medial (CPFm) durante la formación de la memoria del sabor.....	33
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
4. HIPÓTESIS.....	40
4.1. Hipótesis de trabajo.....	41
5. OBJETIVOS.....	44
5.1. Objetivo general.....	44
5.2. Objetivos específicos.....	44
6. MATERIALES Y MÉTODO.....	46
6.1. Sujetos.....	46
6.2. Procedimientos experimentales.....	47

6.2.1. Consumo prolongado de solución azucarada y recuperación posquirúrgica (días 1-21)	49
6.2.2. Implante de cánulas (día 15)	50
6.2.3. Recuperación posquirúrgica (días 16-21)	50
6.2.4. Pruebas de preferencia al sabor (días 22-23)	51
6.2.5. Microinyecciones farmacológicas en la CPFm (día 24)	52
6.2.6. Condicionamiento de aversión al sabor (CAS) y extinción del CAS (días 24-28)	54
6.3. Histología	56
6.4. Cuantificación de los receptores dopaminérgicos de la CPFm	58
6.4.1. Disección de la CPFm	58
6.4.2. Fraccionamiento subcelular de la CPFm	59
6.4.3. Estimación de los receptores dopaminérgicos con la técnica de Western Blot	61
6.5. Análisis estadísticos	63
7. RESULTADOS	64

7.1. Aumento en el consumo del líquido azucarado y reducción en el consumo de alimento sólido durante el periodo de exposición al azúcar.....	64
7.2. Aumento en la preferencia por azúcar debido a la exposición al azúcar.....	66
7.3. Aumento en la IL del CAS y aceleración de la extinción del cas debido a la exposición al azúcar.....	68
7.4. La activación de los receptores β-adrenérgicos de la CPFm durante la adquisición del CAS estabiliza la memoria aversiva del sabor.....	70
7.5. El bloqueo de los receptores β-adrenérgicos de la CPFm durante la adquisición del CAS incrementa la IL del CAS y acelera la extinción del CAS.....	72
7.6. La activación de los receptores dopaminérgicos de la CPFm durante la adquisición del CAS incrementa la IL del CAS y ac.elera la extinción del CAS.....	74

7.7. El bloqueo de los receptores dopaminérgicos de la CPFm	
durante la adquisición del CAS impide la evocación de la memoria	
apetitiva después de un consumo prolongado de azúcar y acelera la	
extinción del CAS después de un consumo agudo de azúcar.....	76
7.8. El consumo prolongado de azúcar incrementa los receptores d2 en	
la fracción de las membranas citoplasmáticas de la CPFm.....	78
8. DISCUSIÓN.....	80
9. CONCLUSIÓN.....	87
10. REFERENCIAS.....	88
11. ANEXOS.....	105
11.1. Artículo publicado.....	105

ABREVIATURAS

ADQ: Adquisición.

AVT: Área ventral tegmental.

CAS: Condicionamiento de aversión al sabor.

CCg1: Corteza cingulada, área 1.

CI: Corteza Insular.

CIL: Corteza infralímbica.

CM2: Corteza motora secundaria.

CPFm: Corteza Prefrontal Medial.

CPL: Corteza Prelímbica.

DA: Dopamina.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

EC: Estímulo condicionado.

EVO: Evocación.

EXT: Extinción.

HL: Hipotálamo lateral.

IL: Inhibición latente.

i.p.: intraperitoneal.

LC: Locus cerúleo.

NA: Noradrenalina.

NAcc: Núcleo accumbens.

NTS: núcleo del tracto solitario.

Pref: Preferencia por un sabor.

TMD: Tálamo medial dorsal.

VPL: núcleo ventroposterolateral del tálamo.

VPM: núcleo ventroposteromedial del tálamo.

1. RESUMEN/ABSTRACT

1.1. RESUMEN

La corteza prefrontal medial (CPFm) establece conexiones recíprocas con muchas estructuras cerebrales cruciales en el control de la ingesta de alimentos y el reforzamiento; por lo cual, la CPFm resulta un candidato ideal para estudiar la memoria de reconocimiento del sabor. Además, resultados previos indican que el consumo prolongado de azúcar produce cambios en el reaprendizaje apetitivo, sugiriendo que esta deficiencia en el reaprendizaje es responsable del aumento en el consumo de azúcar debido a la incapacidad de asociar las nuevas consecuencias negativas al mismo sabor. Por lo tanto, el propósito del presente trabajo fue evaluar en ratas el efecto del bloqueo o la activación de los receptores dopaminérgicos y β -adrenérgicos de la corteza prefrontal medial en la preferencia por el azúcar y la inhibición latente (IL) del condicionamiento aversivo al sabor (CAS) después de un consumo agudo o prolongado de azúcar. Los resultados muestran que después del consumo prolongado de azúcar la activación de los receptores β -adrenérgicos con clenbuterol demora la extinción de la memoria aversiva, mientras que el bloqueo con propranolol o la activación de los receptores dopaminérgicos con apomorfina incrementan la IL del CAS y aceleran la extinción solamente después del consumo agudo de azúcar. Únicamente el bloqueo de los receptores dopaminérgicos con haloperidol reduce la preferencia por agua azucarada después de un consumo prolongado de azúcar, pero incrementa la IL del CAS y acelera la extinción de la memoria aversiva después del consumo agudo de azúcar. En conjunto, los datos presentados en este trabajo aportan evidencia a favor de que los receptores catecolaminérgicos de la CPFm sufren cambios funcionales después del consumo prolongado de azúcar, y estos cambios están relacionados con los cambios en la capacidad de adquirir un nuevo aprendizaje aversivo y el reaprendizaje apetitivo.

1.2. ABSTRACT

The medial prefrontal cortex (mPFC) has reciprocal projections with many cerebral structures that are crucial in the control of food ingestion behavior and reward processing; therefore, the mPFC has an important function in taste memory recognition. Previous results indicate that long-term consumption of sugar produces changes in appetitive re-learning and suggest that this could trigger an escalating consumption due to the inability to learn new negative consequences related to the same taste. Therefore, the purpose of this study was to evaluate in rats whether after 21 days of sugar consumption the increase in sweet taste preference and latent inhibition of conditioned taste aversion (CTA) were affected differentially by pharmacological activation or blockage of dopaminergic and β -adrenergic receptors, in the mPFC, during CTA acquisition. Results showed that after long-term sugar exposure, mPFC activation of β -adrenergic receptors with clenbuterol delayed aversive memory extinction, but the blockade with propranolol or activation of dopaminergic receptors with apomorphine increased CTA latent inhibition and accelerated aversive memory extinction only after acute sugar exposure. Only dopaminergic blockade with haloperidol prevented sweet taste preference expression after long-term sugar consumption, increased CTA latent inhibition and accelerated extinction after acute sugar exposure. Taken together, the present data provide evidence that catecholaminergic receptors in the mPFC after prolonged consumption underwent functional changes related to re-learning and new aversive taste learning.

2. INTRODUCCION

La obesidad se ha convertido en una pandemia en nuestro siglo (Lifshitz & Lifshitz, 2014; Popkin, Adair, & Ng, 2012; Swinburn et al., 2011). La decisión de qué, cuándo y cuánto comemos depende de múltiples causas (Armelagos, 2014; Mennella, 2014; Woods, 2009), y es indiscutible que el aprendizaje es un factor importante en el desarrollo del consumo inapropiado y patológico de alimentos apetitosos (Bouton, 2011; Holland & Petrovich, 2005).

Recientemente se han realizado varios esfuerzos para entender la influencia del aprendizaje en el consumo inapropiado de alimentos utilizando modelos animales. Específicamente, trabajos con ratas que fueron previamente entrenadas en un protocolo de condicionamiento clásico (en el que un estímulo auditivo o visual es asociado al consumo de alimento), demostraron que la presentación del estímulo condicionado (**EC**) provoca que las ratas coman nuevamente a pesar de estar saciadas (Holland & Gallagher, 2003; Weingarten, 1983). Además, la presentación de un EC asociado a la entrega de comida fue capaz de promover la búsqueda de alimento, aumentando el número de conductas operantes previamente reforzadas con comida (Corbit & Balleine, 2003). Esta evidencia sugiere que los estímulos asociados con comida provocan la urgencia por comer o buscar alimento más allá de la saciedad. Adicionalmente, se ha reportado que el consumo de comida genera una memoria persistente, pues se ha demostrado la generalización de conductas operantes reforzadas con comida en contextos nuevos, a pesar de que previamente se haya extinguido la conducta en el contexto original. Además, si primero se asocia un EC a la entrega de comida y después se genera un nuevo aprendizaje aversivo,

asociando el mismo EC con la administración de una descarga eléctrica en las patas, ocurre que después de extinguir el nuevo aprendizaje aversivo, el estímulo condicionado es capaz de generar la búsqueda de alimento, evidenciando la persistencia de la memoria apetitiva (Bouton & Peck, 1992).

Aunque el vínculo entre el aprendizaje y el consumo patológico e inapropiado de alimentos ha sido explorado, las bases neuroquímicas que subyacen a la interferencia que ejerce un aprendizaje apetitivo tras un consumo prolongado de azúcar en un nuevo aprendizaje aversivo no han sido estudiadas con la misma profundidad. En este sentido, el presente trabajo pretende dar un aporte a esta área del conocimiento.

Por lo tanto, el propósito de este estudio fue evaluar si el aumento de la preferencia y la inhibición latente (IL) del condicionamiento de aversión al sabor (CAS) se ven afectados de forma diferencial por la activación o bloqueo farmacológico de los receptores catecolaminérgicos en la CPFm después de 21 días de consumo de azúcar. Con este fin, se realizaron inyecciones en la corteza prefrontal medial (CPFm) de 1) clenbuterol, un agonista de los receptores β -adrenérgicos; 2) propranolol, un antagonista de los receptores β -adrenérgicos; 3) apomorfina, un agonista de los receptores dopaminérgicos; y 4) haloperidol, un antagonista de los receptores dopaminérgicos, durante la evocación del aprendizaje apetitivo y en la adquisición del CAS. Un objetivo adicional fue evaluar si la exposición prolongada al azúcar modifica la expresión de los receptores de dopamina en la CPFm usando la técnica de Western Blot.

2.1. APRENDIZAJE Y MEMORIA

Los organismos requieren adaptarse a su entorno con la finalidad de sobrevivir; por ello deben responder de forma flexible a las demandas de un medio ambiente incierto y cambiante, lo que se logra a través del aprendizaje (Nolfi & Floreano, 1999). El **aprendizaje** se define en términos neurobiológicos como “la creación de representaciones internas duraderas o modificaciones perdurables a estas representaciones internas debidas a la experiencia” (Dudai, 2004); por lo tanto, la **memoria** es “la retención en el tiempo de las **representaciones internas** dependientes de la experiencia, o la capacidad de reactivar o reconstruir tales representaciones” (Dudai, 2004). Como podemos deducir a partir de las definiciones mencionadas, mientras el aprendizaje puede observarse durante la interacción del organismo con su ambiente, la memoria se debe inferir a partir de la conducta observable, al menos mientras el desarrollo de la disciplina no permita un estudio directo del fenómeno.

Por su aplicabilidad y grado desarrollo conceptual, en esta tesis doctoral se optó por el estudio de la memoria a través del uso de modelos del aprendizaje del sabor (Núñez-Jaramillo, Ramírez-Lugo, Herrera-Morales, & Miranda, 2010). Por medio de estos modelos se puede evaluar la capacidad de reconocer sustancias nutritivas y evitar las venenosas, reforzando el éxito adaptativo de cualquier organismo. A favor de utilizar estos modelos está el hecho de que los mamíferos nacen con preferencias hacia sabores que aportan nutrientes importantes para mantenerse vivos y aversiones heredadas hacia alimentos que podrían poner en riesgo la salud (Bures, Bermudez-Rattoni, & Yamamoto, 1998; Chandrashekar,

Hoon, Ryba, & Zuker, 2006; Miranda, 2011; Núñez-Jaramillo et al., 2010). Debido a lo importante de la capacidad para encontrar nutrientes, los mamíferos pueden cambiar estas preferencias y aversiones innatas para ampliar la variedad de sustancias comestibles en el medio gracias al aprendizaje (Bureset al., 1998; Miranda, 2011; Núñez-Jaramillo et al., 2010). Con la finalidad de estudiar el aprendizaje del sabor en una forma más controlada se han desarrollado protocolos conductuales experimentales específicos. Los protocolos que existen para estudiar de forma experimental el aprendizaje del sabor y su empleo para estudiar la memoria del sabor se explicaran en la siguiente sección.

2.1.1. Modelos para estudiar la memoria del sabor

Siguiendo la definición neurobiológica de memoria, la memoria del sabor es una representación interna y duradera del olor y gusto, que se estudia a través de los protocolos experimentales de conducta (véase Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de memoria del sabor y protocolos conductuales que existen para su estudio.

Tipo de memoria del sabor	Protocolo conductual	Referencia
Formación de memoria aversiva	CAS	(Garcia, Hankins, & Rusiniak, 1974)
Formación de memoria apetitiva	Preferencia al sabor IL del CAS	(Touzani, Bodnar, & Sclafani, 2010) (Berman, Hazvi, Neduva, & Dudai, 2000)
Consolidación de la memoria	CAS	(Gal-Ben-Ari & Rosenblum, 2011)
Evocación de la memoria	CAS Preferencia al sabor	(Osorio-Gómez, Guzmán-Ramos, & Bermúdez-Rattoni, 2016) (Rodríguez-García & Miranda, 2016)
Extinción de la memoria aversiva	CAS	(Berman & Dudai, 2001)

En esta tabla se muestran los diferentes tipos de memoria del sabor que se han identificado junto con los protocolos conductuales más usados para estudiarlas (Núñez-Jaramillo et al., 2010). En la columna de la derecha se encuentran referenciados ejemplos de estos estudios.

2.1.1.1. Preferencia al sabor

Se entiende por preferencia al sabor el consumo de un alimento o sustancia sobre otro u otros (Núñez-Jaramillo, Ramírez-Lugo, Herrera-Morales, & Miranda, 2010).

Para evaluar la preferencia experimentalmente, primero se permite a los sujetos experimentales escoger consumir o beber diferentes sustancias (alimentos) con sabores de diferentes características; p.ej. atractivo y/o novedoso o sabor neutral/familiar y, normalmente, 24 h después se les permite nuevamente escoger

entre dichos alimentos/sustancias. Esta prueba conductual permite evaluar la formación de la preferencia por alguno de los sabores presentados. Se considera que hay memoria apetitiva cuando los sujetos consumen una cantidad mayor de un determinado alimento/sabor en comparación con el otro u otros alimentos/sustancias presentados (Carpenter, 1958; Núñez-Jaramillo et al., 2010).

2.1.1.2. Condicionamiento de Aversión al Sabor (CAS)

El Condicionamiento de aversión al sabor (CAS) es el rechazo aprendido a consumir un alimento o sustancia asociado a un malestar gástrico (Garcia, Hankins, & Rusiniak, 1974). En este protocolo conductual un alimento o sustancia de sabor novedoso es asociado con una irritación gástrica (normalmente a través de cloruro de litio, LiCl), que se administra con una demora variable después del consumo. Posteriormente se permite nuevamente a los sujetos consumir el mismo alimento o sustancia para evaluar el grado de aversión adquirida, esto ocurre en el día de evocación (EVO) del CAS. Este protocolo permite evaluar la adquisición de la aversión condicionada al sabor, cuantificando el grado de aversión al alimento/sustancia el día siguiente (Garcia et al., 1974). Se ha identificado un periodo de tiempo después de la adquisición del CAS en el que ocurren procesos neurofisiológicos que estabilizan el aprendizaje y que se conoce como periodo de consolidación (Gal-Ben-Ari & Rosenblum, 2011).

2.1.1.3. Extinción del CAS

Después del entrenamiento del CAS, la presentación sucesiva del alimento, pero sin que éste se asocie nuevamente al malestar gástrico reduce la aversión

condicionada. Este proceso se conoce como extinción, y conduce al aumento del consumo del alimento o sustancia anteriormente asociado al malestar gástrico. La extinción se considera completa cuando el consumo del alimento o sustancia asociada al malestar gástrico es similar al de los animales en los cuales el alimento o sustancia no fue asociada al malestar gástrico (Núñez-Jaramillo et al., 2010). A través de la cuantificación del alimento ingerido durante los días de extinción se comprueba el aumento progresivo del consumo, evaluando así la extinción de la memoria de aversión. La extinción de la memoria aversiva se emplea para medir la estabilidad de la asociación aversiva, ya que la resistencia a la extinción es mayor cuando la memoria aversiva es más estable (Prado-Alcalá, Medina, López, & Quirarte, 2012).

2.1.1.4. Inhibición latente del CAS (IL del CAS)

La inhibición latente es la disminución de la capacidad de generar una asociación aversiva que tiene un estímulo como consecuencia de la preexposición no reforzada (Lubow, 1973). Experimentalmente la IL del CAS se logra a través de la preexposición a un sabor novedoso, generalmente un día antes del CAS. La preexposición genera una memoria apetitiva o incidental que interfiere posteriormente con la formación de la memoria aversiva, esta interferencia se observa como un mayor consumo del sabor (menor aversión) el día de la EVO (Revusky & Bedarf, 1967).

Recientemente en nuestro laboratorio se ha desarrollado un protocolo conductual con la finalidad de avanzar el conocimiento de la memoria del sabor altamente familiar de sabores apetitivos (Vera-Rivera et al., 2018). Particularmente

se ha evaluado el efecto del consumo de agua azucarada *ad libitum* entre 14-21 días sobre la memoria apetitiva en ratas. La memoria apetitiva se evaluó después del consumo prolongado de azúcar a través del protocolo de preferencia comparando el consumo de agua azucarada con el de agua simple, asimismo, se empleó el protocolo de CAS para dilucidar los efectos de la interferencia proactiva de la memoria apetitiva altamente familiar sobre la formación de la memoria aversiva (IL del CAS).

2.2. ESTRUCTURAS CEREBRALES INVOLUCRADAS EN LA MEMORIA DEL SABOR

Durante el consumo de alimentos las vías sensoriales gustativas, olfativas y táctiles son activadas y la integración de esta información genera la percepción del sabor (Miranda, 2011). La vía estructural a la que subyace el procesamiento del gusto empieza en las células gustativas ubicadas en las papilas de la lengua, las cuales transducen el estímulo sávido a un código de potenciales de acción hacia las neuronas que forman los pares craneales VII, IX y X. Es a través de estos pares craneales que la información gustativa llega a su primer relevo en el sistema nervioso central, el núcleo del tracto solitario (NTS) en el bulbo raquídeo. A su vez el NTS reenvía la información al núcleo parabraquial ubicado en el puente, el cual transmite la información gustativa al núcleo ventroposteromedial (VPM) del tálamo. Por último, la información es proyectada desde el VPM a la corteza insular (CI) o corteza gustativa (Bermúdez-Rattoni, 2004).

El olor de los alimentos consumidos alcanza el epitelio olfatorio por la vía retronasal. Las neuronas del epitelio olfatorio transducen el estímulo olfativo a un código de potenciales de acción hacia las neuronas mitrales del bulbo olfatorio, las cuales a su vez proyectan la información a la corteza piriforme o corteza olfatoria. La corteza piriforme proyecta a la CI donde se integra con la información gustativa para formar la percepción del sabor (Caynas, 2010; Miranda, 2012).

La estimulación táctil de la boca activa los mecanorreceptores de las terminaciones nerviosas de las células del ganglio trigeminal, generando potenciales de acción que viajan a lo largo de la raíz maxilar del nervio trigémino

llevando la información táctil al núcleo principal del complejo trigeminal en el tallo cerebral. Las neuronas del núcleo principal del complejo trigeminal proyectan esta información al núcleo ventroposterolateral del tálamo (VPL) a través del lemnisco medial. A su vez, el VPL proyecta esta información a la CI donde se integra la información gustativa, olfativa y táctil que conforman la percepción del sabor (de Araujo & Simon, 2009; Haggard & de Boer, 2014).

A pesar de que las vías mencionadas anteriormente son consideradas la vía general del procesamiento del sabor, cabe mencionar que esta vía interactúa con otras estructuras para poder guiar la conducta de consumo. De entre estas estructuras la corteza prefrontal medial (CPFm) se caracteriza por ser un área de asociación que tiene proyecciones recíprocas con un gran número de estructuras cerebrales (Heidbreder & Groenewegen, 2003; Hoover & Vertes, 2007; Vertes, 2004). Particularmente la CPFm establece conexiones con el núcleo del tracto solitario (NTS), el núcleo parabraquial del puente, la amígdala, el hipotálamo lateral (HL), la corteza CI, el estriado y el área tegmental ventral (AVT), todas ellas áreas importantes en el control de la conducta de ingestión de alimentos y el procesamiento de estímulos gustativos (Dela Cruz et al., 2015; Gálosi et al., 2015; Horst & Laubach, 2013; Moscarello, Ben-Shahar, & Ettenberg, 2007; Parabucki & Netser, 2014; Parent, Amarante, Liu, Weikum, & Laubach, 2015; Van den Oever et al., 2006). Esta relación es importante, pues mientras la vía canónica está relacionada con el procesamiento de la información gustativa, olfativa, táctil y visceral, la CPFm ha sido relacionada con funciones cognitivas, tales como procesos atencionales, toma de decisiones, conductas orientadas a metas,

memoria de trabajo, adquisición de la memoria y flexibilidad conductual (Balleine & Dickinson, 1998; Birrell & Brown, 2000; Gill, Castaneda, & Janak, 2010; Granon, Vidal, Thinus-Blanc, Changeux, & Poucet, 1994; Lacroix, Spinelli, Heidbreder, & Feldon, 2000; Muir, Everitt, & Robbins, 1996; Orsini et al., 2018; Paine, Asinof, Diehl, Frackman, & Leffler, 2013; Sotres-Bayon, Cain, & LeDoux, 2006), funciones importantes para el aprendizaje del sabor y la conducta de ingesta de alimentos, razón por la cual nos centraremos en el estudio de CPFm en el presente estudio.

2.2.1. Corteza prefrontal medial (CPFm) y su relación con la memoria del sabor

En la rata, se conoce como CPFm a la corteza agranular de la región frontal de la pared medial los hemisferios cerebrales, que a su vez es anterior y dorsal al *genu* del cuerpo calloso y que además está compuesta por un 75-80% de neuronas piramidales glutamatérgicas y un 20-25% de interneuronas GABAérgicas. Se caracteriza por establecer conexiones recíprocas con el tálamo medial dorsal (TMD) y carecer de la capa IV de células granulares. Esta área se compone a su vez de cuatro subregiones con características citoarquitectónicas distintivas (Heidbreder & Groenewegen, 2003; Santana & Artigas, 2017). Enseguida se describen las características citoarquitectónicas de estas cuatro regiones empezado por el área más dorsal y continuando en dirección ventral:

Corteza motora secundaria (CM2): es la más gruesa y la que se encuentra más dorsal de las cuatro regiones. Se trata de corteza agranular con una capa III compuesta de un relativamente escaso número de cuerpos celulares y una capa II relativamente densa (Donoghue & Wise, 1982).

Corteza cingulada, área 1 (CCg1): al igual que la región dorsalmente adyacente, carece de la capa IV, posee límites interlaminares bien definidos entre sus cinco capas y se pueden observar dos subregiones en la capa 6. A diferencia de la CM2, la CCg1 es más delgada, principalmente en las capas III, V y VI y se caracteriza por poseer somas neuronales de forma piramidal agrupados

horizontalmente en la capa V, lo cual es propio de esta región (Gabbott, Dickie, Vaid, Headlam, & Bacon, 1997).

Corteza prelímbica (CPL): esta corteza agranular es más delgada que la región inmediatamente dorsal (CCg1) debido a la reducción en el área de las capas III, V y VI, siendo más evidente esta reducción en la capa VI (Gabbott et al., 1997).

Corteza infralímbica (CIL): esta corteza agranular se distingue por poseer células con cuerpos relativamente más grandes que las regiones más dorsales y una capa II más amplia y poco diferenciada de la capa III (mezclada con la capa III). Además, sus capas V y VI son las más delgadas y poseen los bordes menos definidos de las cuatro regiones (Gabbott et al., 1997).

Entre las funciones que se han vinculado con esta estructura cerebral se encuentra el reforzamiento. De tal forma, se ha documentado que la estimulación eléctrica de la CPFm sirve para reforzar una respuesta operante (Robertson, Laferrière, & Milner, 1982). Además, la inhibición de la CPFm con muscimol incrementa la respuesta de las neuronas del AVT durante la espera por un reforzador y la inhibición optogenética de las proyecciones de la CPFm hacia el núcleo accumbens reduce la búsqueda de cocaína, lo que sugiere que la CPFm a través de sus proyecciones hacia otras estructuras cerebrales ejerce control sobre la expectativa y motivación por un reforzador (Jo, Lee, & Mizumori, 2013; Stefanik et al., 2013).

Como ya se mencionó, por ser una corteza de asociación interconectada con otras cortezas y núcleos, la CPFm está relacionada con funciones cognitivas como

la atención. De acuerdo con esta idea se ha documentado que la lesión excitotóxica de la CPFm con ácido quinolínico reduce el número de respuestas correctas mientras se realiza una tarea de tiempo de reacción con cinco opciones de respuesta en serie (Five-choice serial reaction time task; Muir et al., 1996). Debido a que el sujeto experimental debe estar atento a la señal que se le da en cada ensayo, los errores en esta tarea son atribuidos a un déficit de atención. Además, la lesión de la CPFm con ácido N-metil-D-aspartico reduce el tiempo de exploración de un estímulo visual novedoso (Dias & Honey, 2002).

Otra función cognitiva afectada por la lesión de la CPFm es la memoria de trabajo. Se ha reportado que la lesión de la CPFm impide la respuesta de igualación a la muestra (matching-to-sample tasks) usando un laberinto de dos brazos, una tarea en la que el sujeto experimental debe mantener la memoria adquirida durante el ensayo de muestra, para poder realizar la misma conducta durante la prueba (Granon et al., 1994). Más aún, con el uso de la tarea de respuesta de alternancia (una tarea en la cual el sujeto experimental debe recorrer uno de los dos brazos posibles dentro de un laberinto en el primer ensayo para conseguir un reforzador, mientras en el siguiente ensayo debe recorrer el brazo opuesto, continuando en los siguientes ensayos escogiendo de forma alternada entre ambos brazos, por lo cual debe mantener la memoria de la respuesta anterior para no repetirla en el nuevo ensayo), se ha descubierto que existe un aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas de la CPFm mientras se mantiene activa la memoria a corto plazo, mientras que la inactivación de la CPFm con muscimol disminuye el número de respuestas correctas (Yang, Shi, Wang, Peng, & Li, 2014). Además, se ha reportado

que la lesión de la CPFm impide la adquisición y extinción de la asociación de un sonido con un choque eléctrico en las patas utilizando el protocolo conductual de condicionamiento de miedo (Lacroix et al., 2000; Sotres-Bayon et al., 2006). De igual manera, se ha documentado que la lesión de la CPFm impide la adquisición de la asociación de una operante (presión de palanca) reforzada con comida (Balleine & Dickinson, 1998). Resulta pertinente mencionar que la lesión de la CPFm con ácido iboténico reduce la flexibilidad conductual, aumentando la perseveración en emitir una respuesta que ya no es reforzada, empleando el protocolo conductual de ajuste al cambio (set-shifting task; Birrell & Brown, 2000).

Específicamente con relación a la memoria del sabor, es sabido que la CPFm y la corteza insular se encuentran interconectadas recíprocamente y el cortar estas conexiones impide la adquisición del CAS (Gabbott, Warner, Jays, & Bacon, 2003; Schalomon, Robertson, & Laferriere, 1994). De igual forma, la lesión de la CPFm impide la formación y la evocación del CAS (Gonzalez, Villar, Igaz, Viola, & Medina, 2015; Hernádi et al., 2000). Asimismo, se ha reportado que tanto la activación de los receptores al ácido γ -aminobutírico (GABA), como el bloqueo de los receptores a glutamato o la inhibición de la síntesis de proteínas en la CPFm durante la adquisición del CAS impide la formación de la memoria aversiva (Gonzalez et al., 2015). Esta evidencia sustenta la idea de que la actividad de la CPFm es importante para la formación de la memoria aversiva. Aunque se ha documentado que la inhibición de la CPFm activando los receptores a GABA no tiene ningún efecto en la evocación del CAS (Ding, Teixeira, & Frankland, 2008; Ramírez-Lugo, Peñas-Rincón, Ángeles-Durán, & Sotres-Bayon, 2016), se ha documentado el aumento en

la expresión de genes en la CPFm durante la extinción del CAS, junto con reportes de que mientras la inhibición de la síntesis de proteínas en esta estructura cerebral impide la extinción del CAS, la estimulación eléctrica de esta región cortical facilita la extinción del CAS (Akirav et al., 2006; Lin, Wang, Tai, & Tsai, 2010; Maroun, Kavushansky, Holmes, Wellman, & Motanis, 2012; Mickley, Kenmuir, Yocom, Wellman, & Biada, 2005; Shehadi & Maroun, 2013). Es importante destacar que, si bien se cuenta con evidencia de que la CPFm participa en las diferentes etapas de la memoria del sabor, no se ha estudiado la participación de esta estructura del cerebro durante la evocación (EVO) de la memoria apetitiva después un consumo prolongado de azúcar, ni los efectos durante un nuevo aprendizaje aversivo.

2.3. ACTIVIDAD DOPAMINÉRGICA Y β -ADRENÉRGICA EN LA CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL (CPFm)

Desde que pudieron visualizarse las vías dopaminérgica y β -adrenérgicas en el cerebro de roedores con la técnica de histofluorescencia fue notoria la mayor inervación de estos sistemas de neurotransmisión en el hipotálamo, el núcleo estriado y la corteza prefrontal, lo que muestra la importancia de estos neurotransmisores en la conducta de consumo de alimento, el control del movimiento musculo-esquelético y en las funciones cognitivas (Fuxe, Hökfelt, & Ungerstedt, 1970). En el presente trabajo nos centraremos en la actividad dopaminérgica y β -adrenérgica, razón por la cual se describirán estos sistemas de neurotransmisión, después se expondrá la relación de la actividad dopaminérgica y β -adrenérgica en CPFm con las funciones de la CPFm relevantes para el estudio de la evocación de la memoria apetitiva tras un consumo prolongado de azúcar, así como un nuevo aprendizaje aversivo; y se dará evidencia de su participación en la memoria del sabor.

2.3.1. Actividad dopaminérgica en la corteza prefrontal medial (CPFm) y su relación con el reforzamiento, la atención, la memoria y la flexibilidad conductual

Al respecto de la dopamina, este neurotransmisor en la CPFm proviene del área ventral tegmental (AVT) del mesencéfalo, llegando a la CPFm a través de la vía mesocortical (Emson, Koob, & Iversen, 1977). Además, existe una mayor inervación dopaminérgica en las capas V y VI de la CPFm (Benes, Vincent, Molloy, & Khan, 1996). También, se ha reportado que a diferencia de lo que ocurre en el estriado, las fibras dopaminérgicas mesocorticales que inervan a la CPFm presentan una tasa de disparo más alta, un mayor radio de difusión de la dopamina y la falta de autorreceptores inhibidores de la síntesis de dopamina (Sesack, Hawrylak, Matus, Guido, & Levey, 1998). Estos datos son evidencia de la singularidad de la actividad dopaminérgica de la CPFm con respecto a otras áreas del cerebro. De tal forma, este neurotransmisor ejerce sus efectos post-sinápticos a través de 5 tipos de receptores acoplados a proteínas G, estos son: D1, D2, D3, D4 y D5. Estos receptores se agrupan a su vez en dos sub-familias dependiendo de si su activación aumenta los niveles del nucleótido adenosín trifosfato cíclico (sub-familia tipo D1 conformada por los receptores D1 y D5), o los disminuye (sub-familia tipo D2 formada por los receptores D2, D3 y D4; Sibley & Monsma, 1992). Asimismo, se ha reportado que los receptores D1 se expresan principalmente en las capas III, V y VI de la CPFm, mientras que los D2 se expresan principalmente en las capas V y VI de la CPFm. Ambos receptores se expresan tanto en neuronas piramidales glutamatérgicas, como en interneuronas GABAérgicas de la CPFm. Además, los

receptores D1 se expresan en mayor cantidad y en más células que los D2 (Boyson, McGonigle, & Molinoff, 1986; Santana, Mengod, & Artigas, 2009).

Desde que se estableció la relación entre el aumento en la liberación de dopamina y la capacidad reforzante de la estimulación eléctrica intracraneal, la innervación dopaminérgica de la CPFm hizo de esta estructura cerebral un candidato ideal para el estudio de las bases neuroquímicas del reforzamiento. De tal forma, se ha documentado que el reforzamiento con autoestimulación eléctrica de la CPFm incrementa los niveles extracelulares de DA en la CPFm y el bloqueo de los receptores D1 disminuye el número de descargas eléctricas autoadministradas en la CPFm (Ferrer, Sanguinetti, Vives, & Mora, 1983; Mora & Myers, 1977). Esta evidencia demuestra que la actividad dopaminérgica de la corteza prefrontal participa durante el reforzamiento.

La alteración de la actividad dopaminérgica en la CPFm se ha vinculado con alteraciones en la atención. Por ejemplo, la denervación de las terminales dopaminérgicas de la CPFm impiden la inhibición de la respuesta de sobresalto que produce un estímulo auditivo estridente, lo que manifiesta la incapacidad para filtrar información relevante del medio (Bubser & Koch, 1994). Además, atender a un estímulo novedoso incrementa los niveles de DA extracelular en la CPFm (Feenstra, Botterblom, & van Uum, 1995). Respecto a la memoria de trabajo se ha documentado que tanto la denervación de las terminales dopaminérgicas, como el bloqueo de los receptores dopaminérgicos en la CPFm dificulta que los sujetos experimentales mantengan la memoria de corto plazo mientras realizan la tarea de escoger brazos de forma alternada en un laberinto en T (Aultman & Moghaddam,

2001; Bubser & Schmidt, 1990). Además, se ha reportado el aumento de la liberación extracelular de dopamina (DA) en la CPFm durante la adquisición y evocación de la memoria de corto plazo mientras se realiza la tarea de escoger brazos de forma alternada en un laberinto en T y se ha correlacionado positivamente el nivel de liberación de dopamina en la CPFm con la probabilidad de escoger el brazo correcto (Phillips, Ahn, & Floresco, 2004).

Es importante señalar además, que existe un aumento significativo de DA en la CPFm durante la adquisición y la evocación de la asociación de un sonido con un choque eléctrico utilizando el protocolo conductual de condicionamiento de miedo, mientras que el bloqueo de los receptores a DA de la CPFm impide selectivamente la evocación del condicionamiento de miedo (Wilkinson et al., 1998). Asimismo, se ha reportado que tanto la denervación dopaminérgica, como la activación de los receptores dopaminérgicos en la CPFm con apomorfina incrementan la inhibición latente (IL) del condicionamiento de miedo (Broersen, Heinsbroek, de Bruin, & Olivier, 1996; Nelson, Thur, Marsden, & Cassaday, 2010). Además, se ha documentado el aumento de dopamina en la CPFm durante la adquisición de la asociación de una operante (presión de palanca) reforzada con comida; el bloqueo de los receptores a DA en esta estructura cerebral impide la adquisición y evocación de la asociación de una conducta operante reforzada con comida (Baldwin, Sadeghian, & Kelley, 2002; Izaki, Hori, & Nomura, 1998). Conjuntamente, el bloqueo de los receptores dopaminérgicos de la CPFm reduce la flexibilidad conductual, aumentando la perseverancia de una respuesta que ya no es reforzada más con el uso del protocolo conductual de ajuste al cambio (set-shifting task; Floresco,

Magyar, Ghods-Sharifi, Vexelman, & Tse, 2006). A pesar de que se conoce la participación de la actividad dopaminérgica de la CPFm en el reforzamiento, la atención, la memoria y la flexibilidad conductual, hasta ahora no se ha explorado su participación durante la evocación de la memoria apetitiva tras un consumo prolongado de azúcar, ni sus efectos durante un nuevo aprendizaje aversivo.

2.3.2. Actividad β -adrenérgica en la corteza prefrontal medial (CPFm) y su relación con el reforzamiento, la atención, la memoria y la flexibilidad conductual

Los receptores adrenérgicos se agrupan en tres subfamilias: α 1, α 2 (conocidos como α -adrenérgicos) y β (conocidos como β -adrenérgicos). Son tres los receptores β -adrenérgicos que se han encontrado hasta ahora: β -1, β -2 y β -3. Se trata de receptores acoplados a proteínas G, los cuales han sido agrupados en esta subfamilia ya que su activación aumenta los niveles del nucleótido adenosín trifosfato cíclico (Ramos & Arnsten, 2007). Además, los receptores β -adrenérgicos se expresan en toda la corteza prefrontal medial, y se ha reportado que el receptor β -1 es el más expresado (Nicholas, Pieribone, & Hökfelt, 1993; Parkt et al., 1996; Summers, Papaioannou, Harris, & Evans, 1995). También se ha reportado que estos receptores β -adrenérgicos son activados por la noradrenalina (NA) proveniente del locus cerúleo (LC) en el puente cerebral, llegando a la CPFm a través de la vía mesocortical (Emson et al., 1977). A pesar de que existe inervación noradrenérgica en toda la CPFm, existen más terminaciones noradrenérgicas en la capa I (Miner, Schroeter, Blakely, & Sesack, 2003). Se ha reportado que la autoestimulación eléctrica intracraneal de la CPFm no es alterada por el la activación o el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos, sugiriendo que la actividad β -adrenérgica de la CPFm no participa en el reforzamiento (Ramírez, Alba, Vives, Mora, & Osorio, 1983).

Con respecto a la atención, se ha descrito en roedores un aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas noradrenérgicas del LC durante el despertar y la disminución progresiva en la frecuencia de disparos de estas mismas neuronas a lo largo de las diferentes etapas del sueño, hasta alcanzar su mínima frecuencia de disparo durante el sueño con movimientos oculares rápidos (Aston-Jones, Chiang, & Alexinsky, 1991). Además, se ha reportado la disminución de NA extracelular en la CPFm en roedores bajo anestesia (Kubota et al., 1999). Estos descubrimientos aunados al hecho de que existe un aumento de NA en la CPFm mientras se explora un nuevo contexto y que el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos con propranolol disminuye la exploración activa, muestran la participación de la actividad β -adrenérgica de la CPFm en la atención (Feenstra, Botterblom, & Mastenbroek, 2000; Sara, Dyon-Laurent, & Hervé, 1995).

Por una parte, con relación a la memoria de trabajo, se ha documentado una correlación negativa entre la cantidad de NA en la CPFm y el número de errores cometidos mientras realiza la tarea de escoger brazos de forma alternada en un laberinto T (Sahakian et al., 1985). Por otra parte, se ha reportado que tanto el bloqueo de los receptores β -1 como la activación de los receptores β -2 facilita que los sujetos experimentales mantengan por más tiempo una memoria a corto plazo mientras realizan la tarea de escoger brazos de forma alternada en un laberinto T (Ramos et al., 2005).

También, hay evidencia del aumento significativo de NA extracelular en la CPFm durante la adquisición y evocación de la asociación de un sonido con un choque eléctrico utilizando el protocolo conductual de condicionamiento de miedo

(Feenstra, Vogel, Botterblom, Joosten, & de Bruin, 2001). Asimismo, se ha reportado que la activación de los receptores β -2 de la CPFm al finalizar el entrenamiento del protocolo conductual de condicionamiento de miedo fortalece la asociación del sonido con el choque eléctrico y la memoria evocada 24 h después (Zhou et al., 2013). De igual manera se ha reportado que la activación de los receptores β -adrenérgicos de la CPFm antes del primer ensayo de extinción de la asociación de un sonido con un choque eléctrico utilizando el protocolo conductual de condicionamiento de miedo facilita la extinción de la asociación de un contexto con el choque eléctrico (Do-Monte et al., 2010). También se ha documentado el aumento de la NA en la CPFm durante la adquisición y evocación de la asociación de una conducta operante (presión de palanca) reforzada con comida (Mingote, de Bruin, & Feenstra, 2004).

Adicionalmente, se sabe que la lesión de las terminales noradrenérgicas de la CPFm reduce la flexibilidad conductual, aumentando la perseverancia de una respuesta que ya no es reforzada más con el uso del protocolo conductual de ajuste al cambio (set-shifting task), y este déficit en la flexibilidad es mejorado por la aplicación del agonista noradrenérgico atomoxetina (McGaughy, Ross, & Eichenbaum, 2008; Newman, Darling, & McGaughy, 2008). A pesar de que se conoce la participación de la actividad β -adrenérgica de la CPFm en la atención, la memoria y la flexibilidad conductual, hasta ahora no se ha explorado su participación durante la evocación de la memoria apetitiva tras un consumo prolongado de azúcar.

2.3.3. Actividad dopaminérgica y β -adrenérgica en la corteza prefrontal medial (CPFm) durante la formación de la memoria del sabor

De entre los varios sistemas de neurotransmisión que pueden encontrarse en la CPFm, el sistema catecolaminérgico ha demostrado su relación con la regulación del consumo de alimentos y la memoria del sabor. Por una parte, ha sido reiteradamente reportado el incremento en la liberación extracelular de dopamina en la CPFm durante el consumo de alimentos apetitosos (Bassareo, De Luca, & Di Chiara, 2002; De Luca, 2014; Feenstra, Teske, Botterblom, & De Bruin, 1999; Gambarana et al., 2003). Por otra parte, el consumo de azúcar incrementa la liberación tanto de dopamina como noradrenalina en la CPFm (Mingote et al., 2004). Además, mientras la activación optogenética de las neuronas piramidales de la CPFm que expresan el receptor D1 incrementa el consumo de alimento, la inhibición optogenética de estas mismas neuronas disminuye el consumo de alimento (Land et al., 2014).

Con respecto a la memoria aversiva del sabor, la administración sistémica del antagonista de los receptores D1, el SCH 39166, inmediatamente después de finalizado el protocolo conductual del CAS impide la consolidación de la memoria aversiva del sabor (Fenu, Rivas, & Di Chiara, 2009). Además, mientras la administración sistémica de un antagonista de los receptores β -adrenérgicos (*dl-4-[2 hydroxy-3-isopropylaminopropoxy]-indole*) durante la adquisición del CAS reduce la aversión condicionada al sabor, la administración sistémica de un agonista de

estos receptores (*dl-isoproterenol hydrochloride*) incrementa la aversión (Kral & St Omer, 1972). Más aún, tanto el boqueo de los receptores a dopamina (DA) como el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en la corteza insular (CI) durante el entrenamiento del protocolo conductual de CAS impide la adquisición de la memoria del sabor aversivo (Berman, Hazvi, Neduva, & Dudai, 2000). También, se ha documentado que el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en la amígdala impide la formación de la memoria aversiva del sabor (Miranda, LaLumiere, Buen, Bermudez-Rattoni, & McGaugh, 2003). Más aún, se ha documentado que tanto el aumento extracelular de dopamina en la CI y de noradrenalina en la amígdala durante la consolidación de la memoria aversiva (CAS), así como el bloqueo de los receptores dopaminérgicos en la CI y los β -adrenérgicos en la amígdala durante el periodo de consolidación impiden la formación de la memoria del sabor aversivo (Guzmán-Ramos, Osorio-Gómez, Moreno-Castilla, & Bermúdez-Rattoni, 2010, 2012). Esta evidencia sustenta el hecho de que el sistema dopaminérgico y β -adrenérgico son importantes para la formación de la memoria del sabor aversivo.

Más concretamente, además de que la denervación de las fibras dopaminérgicas y noradrenérgicas de la CPFm con la toxina 6-hidroxidopamina impide la adquisición de del CAS, el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en la CPFm produce el mismo efecto (Hernádi et al., 2000; Reyes-López, Nuñez-Jaramillo, Morán-Guel, & Miranda, 2010). Más aún, el bloqueo de los receptores D1 de la CPFm con SCH23390 durante el periodo de consolidación de la memoria del CAS a sacarina desestabiliza la memoria, haciéndola propensa a extinguirse más rápidamente (Gonzalez et al., 2014). Esta evidencia muestra que la actividad

dopaminérgica y β -adrenérgica de la CPFm es importante para la formación y estabilidad de la memoria del sabor aversivo. Una vez formada la memoria del sabor, es crucial que el organismo recupere esta información para guiar su conducta y poder adaptarse a su ambiente, a este fenómeno se le conoce como evocación de la memoria (Núñez-Jaramillo et al., 2010). Así pues, se ha reportado el incremento extracelular de dopamina y noradrenalina tanto en la CI como en la amígdala durante la evocación del CAS a sacarina (Osorio-Gómez, Guzmán-Ramos, & Bermúdez-Rattoni, 2016, 2017). Además, se ha documentado que tanto el bloqueo de los receptores dopaminérgicos y β -adrenérgicos de la CI como el bloqueo los β -adrenérgicos de la amígdala impiden la evocación de la memoria aversiva (Osorio-Gómez et al., 2016, 2017). Aunque estos resultados demuestran la participación de los sistemas dopaminérgico y β -adrenérgico durante la evocación de la memoria aversiva del sabor, no se ha investigado la actividad de estos sistemas en la CPFm y menos aún durante la evocación de la memoria apetitiva tras un consumo prolongado de azúcar.

La extinción de la memoria del sabor aversivo, entendida como un nuevo aprendizaje, requiere de un patrón característico de actividad de diferentes sistemas de neurotransmisión en diferentes estructuras para formarse. De acuerdo con lo anterior, se ha reportado que tanto el bloqueo de los receptores a dopamina como el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos de la amígdala dificultan la extinción de la memoria aversiva al sabor (Osorio-Gómez et al., 2016). Específicamente, la denervación noradrenérgica de la CPFm retrasa la extinción de la memoria aversiva (Mason & Fibiger, 1979). A pesar de que existe evidencia de la participación del

sistema catecolaminérgico de la CPFm durante el nuevo aprendizaje de extinción de la memoria aversiva, hasta ahora no se ha evaluado la participación de los receptores a dopamina ni de los receptores β -adrenérgicos en la CPFm durante la extinción del CAS, resultando ser vías de investigación interesantes de explorar.

Con respecto a la memoria apetitiva resulta pertinente mencionar que la administración sistémica del antagonista de los receptores D2, el raclopride, reduce la preferencia por sacarosa (Hsiao & Smith, 1995). Además, tanto la administración sistémica de anfetamina durante el periodo de preexposición utilizando el protocolo conductual de IL del CAS, como la administración sistémica del antagonista de los receptores a dopamina, el haloperidol, impide la formación de la memoria apetitiva/incidental (Bethus, Muscat, & Goodall, 2006; Ellenbroek, Knobbout, & Cools, 1997). De igual manera, tanto el bloqueo de los receptores a dopamina como el bloqueo de los receptores a noradrenalina en la CI durante el periodo de preexposición utilizando el protocolo conductual de IL del CAS, impide la formación de la memoria apetitiva/incidental (Berman et al., 2000). Asimismo, se ha reportado que el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos de la amígdala con propanolol impide la formación de la memoria apetitiva/incidental (Miranda et al., 2003; Miranda, Rodríguez-García, Reyes-López, Ferry, & Ferreira, 2008). Particularmente, la denervación de las fibras dopaminérgicas en la CPFm incrementa la preferencia por glucosa, mientras que la denervación selectiva de las fibras noradrenérgicas de CPFm no afecta la preferencia por glucosa (Gálosi et al., 2015). De igual manera, el bloqueo de los receptores dopaminérgicos en la CPFm impide la adquisición de la preferencia por la glucosa (Malkusz et al., 2012; Touzani, Bodnar, & Sclafani,

2010). Es importante recalcar que, aunque se ha reportado la participación de la actividad dopaminérgica de la CPFm durante la formación de la memoria del sabor apetitivo, no se ha estudiado la participación de los sistemas de neurotransmisión catecolaminérgicos de la CPFm en la evocación de la memoria apetitiva tras un consumo prolongado de azúcar, ni sus efectos durante un nuevo aprendizaje aversivo.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que:

- Existe la necesidad de entender la participación del aprendizaje en el desarrollo del consumo inapropiado y patológico de alimentos apetitosos, resulta importante evaluar los efectos del consumo prolongado de alimentos dulces, como lo es el azúcar.
- Se ha documentado la participación de la actividad dopaminérgica y β -adrenérgica de la CPFm en las diferentes etapas de la memoria del sabor, resulta plausible pensar que la neurotransmisión catecolaminérgica de la CPFm participa durante la actualización de la memoria del sabor dulce (cando el sabor pasa de preferido a aversivo).
- Los mecanismos neurobiológicos de actualización de la memoria del sabor varían dependiendo del grado de entrenamiento, resulta lógico suponer que el consumo prolongado de azúcar producirá cambios en los mecanismos neurobiológicos responsables de la actualización de la memoria del sabor (la neurotransmisión catecolaminérgica de la CPFm).

De tal forma surgen las siguientes preguntas:

¿Cuál es la función de la actividad dopaminérgica y β -adrenérgica de la CPFm durante la evocación de la memoria apetitiva tras una exposición prolongada al azúcar? ¿Cómo afecta el grado de exposición a la azúcar un nuevo aprendizaje aversivo (IL del CAS)? y ¿Cómo alteran las manipulaciones farmacológicas la

estabilidad de la nueva memoria de aversión por ese mismo sabor (EXT del CAS), dependiendo del grado de exposición al sabor dulce?

Los resultados de este estudio podrían servir para entender por qué el consumo de alimentos apetitosos parece tan persistente (Bouton, 2011). Por lo cual nos proponemos determinar la función de la actividad dopaminérgica y β -adrenérgica en la CPFm, a través de la activación y bloqueo de sus respectivos receptores durante la evocación de la memoria apetitiva y la adquisición de un nuevo aprendizaje aversivo (IL del CAS), así mismo, evaluaremos la estabilidad de la memoria aversiva (EXT del CAS), ya sea después de un consumo corto (3 días/20 min) o un consumo prolongado y permanente (21 días/24 h) de azúcar. Además, dado que se ha reportado que el consumo de alimentos dulces incrementa los niveles extracelulares de dopamina en la CPFm (Bassareo et al., 2002; De Luca, 2014; Feenstra et al., 1999; Gambarana et al., 2003; Mingote et al., 2004) y que el consumo excesivo de glucosa modifica la expresión de los receptores dopaminérgicos en el estriado (Colantuoni et al., 2001) nos propusimos evaluar si la alta familiarización a un sabor apetitivo modifica la cantidad de receptores a dopamina en la CPFm mediante el uso de Western blot.

4. HIPÓTESIS

La manipulación farmacológica de la actividad dopaminérgica y β -adrenérgica de la CPFm afectará diferencialmente la evocación de la memoria apetitiva, el nuevo aprendizaje aversivo (IL del CAS) y la extinción del CAS, dependiendo del grado de preexposición al sabor dulce (azúcar).

4.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

H1.- La activación de los receptores beta-adrenérgicos de la CPFm con clenbuterol NO afectará la evocación de la memoria apetitiva (Gálosi et al., 2015; Kral & St Omer, 1972).

H2.- El bloqueo de los receptores beta-adrenérgicos de la CPFm con propranolol NO afectaran la evocación de la memoria apetitiva (Gálosi et al., 2015; Kral & St Omer, 1972).

H3.- La activación de los receptores a dopamina de la CPFm con apomorfina mejorará la evocación de la memoria apetitiva (Land et al., 2014).

H4.- El bloqueo de los receptores a dopamina de la CPFm con haloperidol evitará la evocación de la memoria apetitiva (Hsiao & Smith, 1995).

H5.- La activación de los receptores beta-adrenérgicos de la CPFm con clenbuterol reducirá la IL del CAS (Gálosi et al., 2015; Kral & St Omer, 1972).

H6.- El bloqueo de los receptores beta-adrenérgicos de la CPFm con propranolol aumentará la IL del CAS (Berman et al., 2000; Guzmán-Ramos et al.,

2010; Hernádi et al., 2000; Miranda, LaLumiere, Buen, Bermudez-Rattoni, & McGaugh, 2003; Reyes-López et al., 2010).

H7.- La activación de los receptores a dopamina de la CPFm con apomorfina aumentará la IL del CAS (Broersen et al., 1996).

H8.- El bloqueo de los receptores a dopamina de la CPFm con haloperidol aumentará la IL del CAS (Berman et al., 2000; Bethus et al., 2006; Fenu et al., 2009; Gonzalez et al., 2014; Guzmán-Ramos et al., 2010, 2012; Hernádi et al., 2000).

H9.- La activación de los receptores beta-adrenérgicos de la CPFm con clenbuterol impedirá la EXT del CAS (Gálosi et al., 2015; Kral & St Omer, 1972).

H10.- El bloqueo de los receptores beta-adrenérgicos de la CPFm con propranolol facilitará la EXT del CAS (Berman et al., 2000; Guzmán-Ramos et al., 2010; Hernádi et al., 2000; Miranda et al., 2003; Reyes-López et al., 2010).

H11.- La activación de los receptores a dopamina de la CPFm con apomorfina facilitará la EXT del CAS (Broersen et al., 1996).

H12.- El bloqueo de los receptores a dopamina de la CPFm con haloperidol facilitará la EXT del CAS (Berman et al., 2000; Bethus et al., 2006; Fenu et al., 2009; Gonzalez et al., 2014; Guzmán-Ramos et al., 2010, 2012; Hernádi et al., 2000).

Para los grupos que tuvieron un consumo prolongado de azúcar y que no contamos con información previa para proponer una hipótesis se optó por proponer las mismas hipótesis que para los grupos anteriores:

H13.- La activación de los receptores beta-adrenérgicos de la CPFm con clenbuterol NO afectará la evocación de la memoria apetitiva después del consumo prolongado de azúcar.

H14.- El bloqueo de los receptores beta-adrenérgicos de la CPFm con propranolol NO afectaran la evocación de la memoria apetitiva después del consumo prolongado de azúcar.

H15.- La activación de los receptores a dopamina de la CPFm con apomorfina mejorará la evocación de la memoria apetitiva después del consumo prolongado de azúcar.

H16.- El bloqueo de los receptores a dopamina de la CPFm con haloperidol evitará la evocación de la memoria apetitiva después del consumo prolongado de azúcar.

H17.- La activación de los receptores beta-adrenérgicos de la CPFm con clenbuterol reducirá la IL del CAS después del consumo prolongado de azúcar.

H18.- El bloqueo de los receptores beta-adrenérgicos de la CPFm con propranolol aumentará la IL del CAS después del consumo prolongado de azúcar.

H19.- La activación de los receptores a dopamina de la CPFm con apomorfina aumentará la IL del CAS después del consumo prolongado de azúcar.

H20.- El bloqueo de los receptores a dopamina de la CPFm con haloperidol aumentará la IL del CAS después del consumo prolongado de azúcar.

H21.- La activación de los receptores beta-adrenérgicos de la CPFm con clenbuterol impedirá la EXT del CAS después del consumo prolongado de azúcar.

H22.- El bloqueo de los receptores beta-adrenérgicos de la CPFm con propranolol facilitará la EXT del CAS después del consumo prolongado de azúcar.

H23.- La activación de los receptores a dopamina de la CPFm con apomorfina facilitará la EXT del CAS después del consumo prolongado de azúcar.

H24.- El bloqueo de los receptores a dopamina de la CPFm con haloperidol facilitará la EXT del CAS después del consumo prolongado de azúcar.

H25.- El consumo prolongado de azúcar reducirá la expresión de receptores a dopamina en sinaptosomas y membranas citoplasmáticas de la CPFm.

5. OBJETIVO

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de la manipulación de los receptores dopaminérgicos y β -adrenérgicos en la CPFm durante la evocación de la memoria apetitiva, el nuevo aprendizaje aversivo (IL del CAS) y la extinción del CAS, después de la exposición corta y aguda (2 días/20 min) o la exposición permanente a largo plazo (21 días/24 h) de solución azucarada.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar los efectos de la inyección de clenbuterol, agonista de los receptores β -adrenérgicos, en la CPFm sobre la evocación de la memoria aversiva apetitiva, la IL del CAS y la EXT del CAS en función del grado de exposición al sabor dulce (azúcar).

Determinar los efectos de la inyección de propranolol, antagonista de los receptores β -adrenérgicos, en la CPFm sobre la evocación de la memoria apetitiva, la IL del CAS y la EXT del CAS en función del grado de exposición al sabor dulce (azúcar).

Determinar los efectos de la inyección de apomorfina, agonista de los receptores dopaminérgicos, en la CPFm sobre la evocación de la memoria apetitiva, la IL del CAS y la EXT del CAS en función del grado de exposición al sabor dulce (azúcar).

Determinar los efectos de la inyección de haloperidol, antagonista de los receptores dopaminérgicos, en la CPFm sobre la evocación de la memoria apetitiva, la IL del CAS y la EXT del CAS en función del grado exposición al sabor dulce (azúcar).

Determinar los niveles de receptores dopaminérgicos en la CPFm después del consumo a largo plazo (21 días) de azúcar.

6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1. SUJETOS

Se empleó un total de 171 ratas macho de la cepa Wistar (Bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM). Las ratas fueron alojadas individualmente y mantenidas a una temperatura ambiental constante de 23°C. El bioterio se mantuvo en un ciclo de luz-oscuridad tal que las luces se encendían a las 21:00 h y se apagaban a las 9:00 h. Todos los procedimientos conductuales se llevaron a cabo durante la fase de oscuridad del ciclo luz-oscuridad del bioterio, entre las 10:00 h y las 16:00 h. Los sujetos experimentales se mantuvieron bajo un régimen de agua y alimento *ad libitum* hasta el comienzo del experimento.

Todos los procedimientos experimentales se realizaron cumpliendo con la Ley Mexicana de Cuidado (Norma Oficial Mexicana SAGARPA) y las leyes concernientes impuestas por la Secretaría de Salud Mexicano. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

6.2. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

El diseño experimental empleado en el presente trabajo se ilustra en la **Figura 1**.

Exposición al azúcar: las ratas fueron asignadas a uno de dos grupos. El grupo AZÚCAR fue expuesto *ad libitum* al sabor dulce (solución azucarada al 10%) por 21 días (incluyendo la recuperación post-quirúrgica del implante de las cánulas), además de las dos pruebas de preferencia al sabor los días 22 y 23; de tal forma que el día de la adquisición del CAS habían recibido una exposición prolongada al azúcar por 23 días. Por otra parte, el grupo AGUA (control) durante 21 días fue expuesto sólo a agua *ad libitum*; y fueron expuestas por primera vez al azúcar durante las pruebas de preferencia; de tal forma que el día de la adquisición del CAS solo habían recibido una exposición de 20 min durante 2 días.

Implante de guías cánula: durante el día 15 de consumo, se implantaron cánulas guía para la administración de los diferentes tratamientos farmacológicos en la CPFm.

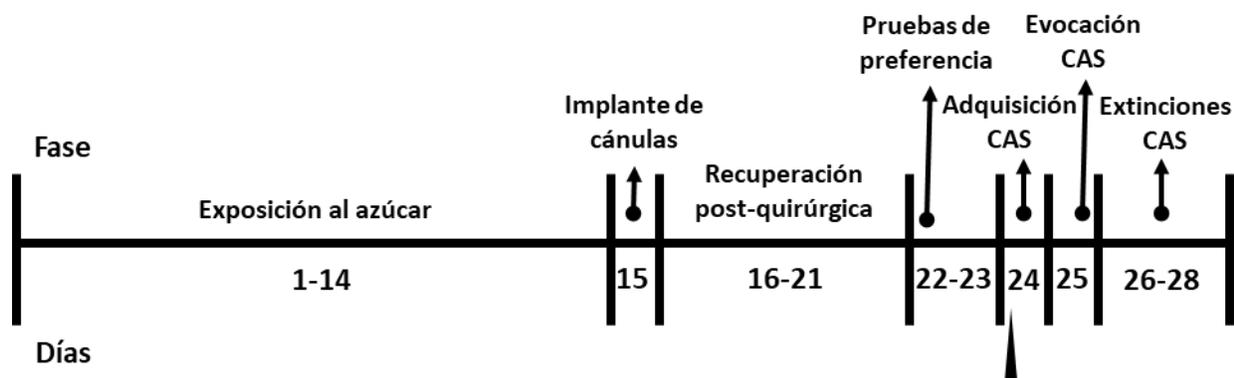
Pruebas de preferencia del sabor: en el día 22 y 23 se realizaron pruebas de preferencia para comprobar el grado de memoria apetitiva al azúcar en ambos grupos (AGUA y AZÚCAR).

CAS: un día después, se entrenó bajo el protocolo del CAS (Adquisición del CAS). En este día ambos grupos se subdividieron de manera aleatoria en subgrupos para los tratamientos farmacológicos en la CPFm. Durante este día se determinaron los efectos de las manipulaciones farmacológicas de la CPFm en la evocación de la memoria apetitiva (grupo AGUA) y de la memoria apetitiva altamente familiar (grupo

AZÚCAR). El CAS como nuevo aprendizaje aversivo tuvo la finalidad de identificar aquellos tratamientos que facilitan o impiden la interferencia proactiva de la memoria apetitiva (IL del CAS) sobre el nuevo aprendizaje aversivo en función del grado de entrenamiento apetitivo durante la evocación del CAS, 24 h después. A través de la evaluación de la evocación del CAS, se cuantificaron los efectos de los diferentes tratamientos farmacológicos en la IL del CAS en función del grado de entrenamiento apetitivo.

En la etapa final del protocolo conductual (tres ensayos de extinciones del CAS) se evaluó la estabilidad de la nueva memoria aversiva, adquirida bajo los efectos de los diferentes tratamientos farmacológicos y en función del grado de exposición a la azúcar.

Figura 1. Protocolo de procedimientos experimentales para el estudio de los efectos de las distintas manipulaciones farmacológicas de la CPFm en la evocación de la memoria apetitiva y un nuevo aprendizaje aversivo.



La línea horizontal representa el número de los días de cada fase del protocolo. La punta de flecha (triángulo) ilustra la adquisición del CAS y la microinyección en la CPFm de los diferentes tratamientos farmacológicos, 20 min antes de presentación de azúcar durante la adquisición.

6.2.1. Consumo prolongado de solución azucarada y recuperación postquirúrgica (días 1-21)

Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a uno de dos grupos. El grupo AGUA se mantuvo en las condiciones estándares del bioterio, con agua simple y alimento *ad libitum*, mientras que el grupo AZÚCAR tuvo agua endulzada al 10% (peso/volumen) con azúcar comercial de caña (marca Zulka; compuesta en un 99% de sacarosa) en vez de agua simple. Durante los primeros 14 días (días 1-14) se pesó diariamente y a la misma hora (entre las 12:00 h y las 13:00 h) a todos los sujetos experimentales con la finalidad de llevar el registro de los cambios en el peso corporal en este periodo de tiempo. Con la finalidad de registrar la cantidad de alimento consumido, todos los días se les dejaba 200g de alimento balanceado para rata (marca Lab Diet 5001) y 24 h después se pesaba el alimento no consumido por los sujetos, de tal manera que la diferencia de los 200g menos el alimento encontrado al día siguiente se registraba como la cantidad de alimento consumido. En el caso del líquido consumido, se pesaban los bebederos antes de ponerlos a disposición de los sujetos experimentales y 24 h después se volvían a pesar, de tal manera que la diferencia del peso del bebedero antes del consumo menos el peso del bebedero al día siguiente se registraba como la cantidad de líquido consumido. Los bebederos con agua simple y agua azucarada se lavaban y se volvían a llenar cada dos días. A diferencia de los primeros 14 días, durante los siguientes siete días (días 15-21) no se registraron los cambios del peso corporal ni el consumo alimento y líquido, además de que el grupo AZÚCAR tuvo un bebedero extra con agua simple durante el proceso de recuperación posquirúrgica.

6.2.2. Implante de cánulas (día 15)

Al finalizar el registro de los pesos corporales y el consumo de alimento y líquido, el día 15 contado desde el comienzo del experimento, todos los sujetos fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (marca Pisa 70mg/kg) y xilacina (marca Pisa 6mg/kg) administrada por vía intraperitoneal (i.p.). Durante los efectos de la anestesia se les implantaron bilateralmente dos cánulas guía de acero inoxidable de 12mm de largo, calibre 23, cuyas puntas se colocaron 2mm en dirección dorsal con respecto a la CPFm (coordenadas: anteroposterior +3.0 mm, medial-lateral \pm 0.5 mm y dorso-ventral -2.0 mm con respecto a Bregma, según Paxinos et al., 2007). Las cánulas fueron fijadas al cráneo con dos tornillos quirúrgicos yacrílico dental. Además, se insertaron puntas de inyectores de 12mm de largo dentro de las cánulas para mantenerlas permeables. Al finalizar la cirugía los sujetos experimentales recibieron una dosis de 0.01mg/20 μ l de tramadol (marca AMSA)

6.2.3. Recuperación posquirúrgica (días 16-21)

Durante los seis días de recuperación posquirúrgica (días 16-21 desde el comienzo del experimento) se monitoreo el estado general de salud de los sujetos experimentales y el proceso de cicatrización diariamente. Además, se procuró la permeabilidad de las cánulas al remover y volver a colocar las puntas de los inyectores, y de ser necesario reemplazar las puntas de inyectores no encontrados dentro de las cánulas.

Durante esta fase del protocolo el grupo AGUA se mantuvo en las condiciones estándares de agua simple y alimento ad libitum, mientras que el grupo

AZÚCAR tuvo acceso a agua azucarada al 10%, agua simple y alimento ad libitum, de tal forma que la exposición constante a azúcar abarcó un total de 21 días. Los bebederos con agua simple y agua azucarada se lavaban y se volvían a llenar cada dos días.

6.2.4. Pruebas de preferencia al sabor (días 22-23)

La noche del último día de recuperación (día 21 a partir del comienzo del experimento) se retiraron los bebederos de las cajas de todas las ratas con la finalidad de asegurar la motivación para beber durante el resto del protocolo conductual. En el día 22 se realizó la primera prueba de preferencia por el sabor dulce, con el propósito de evaluar la preferencia inicial por el agua azucarada tanto en el grupo AGUA como en el grupo AZÚCAR, así como para formar una memoria apetitiva en el grupo AGUA. Con este fin, se ofrecieron dos probetas graduadas con capacidad de 50 ml, tapadas con un bebedero, a todas las ratas durante 20 min. Una de estas probetas contenía agua simple y la otra agua azucarada. Los bebederos se encontraban separados 10 cm el uno del otro y se intercambiaban de posición cada 2 min para evitar el sesgo a consumir en uno sólo. Para evaluar el grado de preferencia entre el agua y la solución azucarada se calculó el porcentaje de agua azucarada consumida con respecto al total de líquido consumido de la siguiente manera: $\% \text{ consumido de agua azucarada} = (\text{ml consumidos de agua azucarada} \times 100) / (\text{ml consumidos de agua azucarada} + \text{ml consumidos de agua simple})$. En el día 23 se realizó la segunda prueba de preferencia exactamente igual a la primera para verificar la formación de la memoria apetitiva en ambos grupos.

6.2.5. Microinyección de los agonistas y antagonistas en la CPFm (día 24)

En el día 24 del experimento los grupos AGUA y AZÚCAR fueron subdivididos en 6 subgrupos asignados a uno de los 6 tratamientos farmacológicos. Todas las ratas fueron inyectadas bilateralmente en la CPFm 20 min antes de la adquisición del CAS. Justo antes de la microinyección se removieron las protecciones puestas para mantener la permeabilidad de las cánulas y se introdujeron inyectores de 14 mm (2 mm más largos que las cánulas para alcanzar a la CPFm). Cada inyector se encontraba unido a un tubo de polietileno conectado a una jeringa de 10 µl y ambas jeringas eran manejadas simultáneamente por una bomba electrónica. Los sujetos en cada subgrupo recibieron una microinyección bilateral en la CPFm de uno de los siguientes tratamientos y fueron nombrados de la siguiente manera:

- Grupos AGUA (AGUA):
 - **AGUA-S:** Ratas previamente expuestas a azúcar 2 días/20 min; inyección de 0.5 µl de solución salina al 0.9% estéril, este fue el vehículo en el que se disolvió el propranolol.
 - **AGUA-V:** Ratas previamente expuestas a azúcar 2 días/20 min; inyección de 0.5 µl del vehículo en el que se disolvieron la mayoría de los fármacos debido a su poca solubilidad en agua, se compone de 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) diluido en solución salina al 0.9% estéril.

- **AGUA-C:** Ratas previamente expuestas a azúcar 2 días/20 min; inyección 10.0 ng/ de 0.5 µl del agonista β-adrenérgico clenbuterol disuelto en 10% DMSO.
- **AGUA-P:** Ratas previamente expuestas a azúcar 2 días/20 min; inyección de 2.5 µg/0.5 µl del antagonista β-adrenérgico propranolol disuelto en solución salina.
- **AGUA-A:** Ratas previamente expuestas a azúcar 2 días/20 min; inyección de 9.0 µg /0.5 µl de del agonista dopaminérgico apomorfina disuelto en 10% DMSO.
- **AGUA-H:** Ratas previamente expuestas a azúcar 2 días/20 min; inyección de 0.5 µg/0.5 µl del antagonista dopaminérgico haloperidol disuelto en 10% DMSO.
- Grupos AZÚCAR:
 - **AZÚCAR-S:** Ratas previamente expuestas a azúcar por 21 días/24 h; inyección de 0.5 µl de solución salina al 0.9% estéril.
 - **AZÚCAR-V:** Ratas previamente expuestas a azúcar por 21 días/24 h; inyección de 0.5 µl de DMSO al 10%.
 - **AZÚCAR-C:** Ratas previamente expuestas a azúcar por 21 días/24 h; inyección de 10.0 ng/ de 0.5 µl del agonista β-adrenérgico clenbuterol disuelto en 10% DMSO.
 - **AZÚCAR-P:** Ratas previamente expuestas a azúcar por 21 días/24 h; inyección de 2.5 µg/0.5 µl del antagonista β-adrenérgico propranolol disuelto en solución salina.

- **AZÚCAR-A:** Ratas previamente expuestas a azúcar por 21 días/24 h; inyección de 9.0 µg /0.5 µl de del agonista dopaminérgico apomorfina disuelto en 10% DMSO.
- **AZÚCAR-H:** Ratas previamente expuestas a azúcar por 21 días/24 h; inyección de 0.5 µg /0.5 µl del antagonista dopaminérgico haloperidol disuelto en 10% DMSO.

Se inyectó un volumen total de 0.5 µl por hemisferio a una velocidad de 0.5 µl por minuto con la ayuda de una bomba automática programada para funcionar a esa velocidad (Gamagi Medicine, Stocolmo, Suecia), la cual empujaba los émbolos de dos microjeringas (Hamilton, Reno, Estados Unidos) conectadas a tubos de polietileno que unían las microjeringas a los inyectores. Los inyectores se dejaron un minuto adicional para evitar el reflujo de las soluciones y permitir su difusión en el tejido blanco. Las dosis de los diferentes fármacos se escogieron con base en reportes previos de su efectividad empleando otras tareas de aprendizaje (Broersen et al., 1996; Ferry & McGaugh, 1999; Kutlu et al., 2013; Reyes-López et al., 2010; Thomas, Fang, Yuriev, & Chalmers, 2016; Wang & Rebec, 1998).

6.2.6. Condicionamiento de aversión al sabor (CAS) y extinción del CAS (días 24-28)

En el día 24, 20 min después de las microinyecciones en la CPFm se realizó la adquisición del CAS. En esta etapa del protocolo se presentaron dos probetas tapadas con bebederos por 20 min a los sujetos experimentales, una llena con agua simple y la otra con agua azucarada, de la misma manera que se reportó en las

pruebas de preferencia al sabor (ver sección 6.2.4. Pruebas de preferencia al sabor). 30 min después de finalizado el consumo de líquidos de este día, se inyectó a los sujetos experimentales cloruro de litio (LiCl) vía i.p. para producir un malestar gástrico. Se inyectó una dosis de 10.0 ml por kg de peso corporal a una concentración de 127.2 mg de LiCl disuelto en 10.0 ml de agua destilada.

En el día 25 se evaluó la memoria aversiva formada el día anterior presentando nuevamente dos probetas tapadas con bebederos a los sujetos experimentales, al igual que se hizo el día de las pruebas de preferencia al sabor (ver sección 6.2.4. Pruebas de preferencia al sabor). Para evaluar la fuerza de la memoria aversiva se comparó el % consumido de agua azucarada el día de la evocación en proporción al % consumido de agua azucarada el día de la adquisición de la siguiente manera: % respecto a la adquisición = $(\% \text{ consumido de agua azucarada el día de la evocación} \times 100) / (\% \text{ consumido de agua azucarada el día de la adquisición})$.

Por último, los siguientes 3 días en el protocolo experimental (días 26-28) se realizaron las extinciones del CAS, por lo cual se presentaron diariamente dos probetas tapadas con bebederos por un periodo de 20 min a los sujetos, de forma semejante a como se hizo el día de las pruebas de preferencia al sabor (ver sección 6.2.4. Pruebas de preferencia al sabor). Para evaluar la estabilidad de la memoria aversiva se comparó el % consumido de agua azucarada el día de cada extinción en proporción del % consumido de agua azucarada el día de la adquisición de la siguiente manera: % respecto a la adquisición = $(\% \text{ consumido de agua azucarada el día de la extinción} \times 100) / (\% \text{ consumido de agua azucarada el día de la adquisición})$.

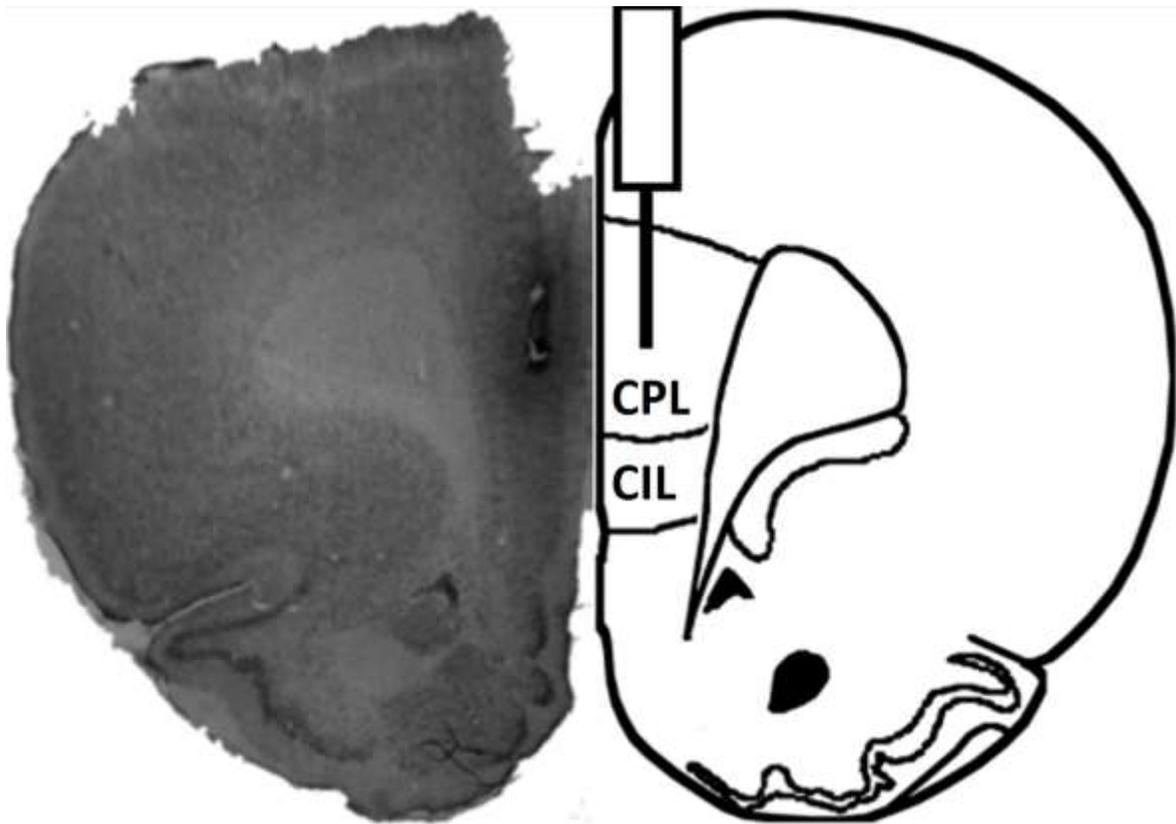
en el día de extinción x 100)/(% consumido de agua azucarada el día de la adquisición).

Durante la evocación se midió el grado de aversión adquirida en la adquisición del CAS, mientras que a lo largo de las extensiones se evaluó la estabilidad de esta aversión (Prado-Alcalá et al., 2012).

6.3. HISTOLOGÍA

Después de concluido del protocolo experimental se sacrificó a los sujetos con una sobredosis de pentobarbital sódico (115 mg/kg; i.p.) y se perfundieron transcardialmente con una solución de formaldehído al 4% en solución salina isotónica al 0.9%. Los cerebros de los sujetos experimentales fueron extraídos enteros y sumergidos en formaldehído al 4% por una noche. Después fueron sumergidos en una solución de sacarosa al 30% y almacenados a 4°C hasta que fueron cortados. Los cerebros fueron cortados en rebanadas coronales de 50 µm de grosor con ayuda de un micrótopo (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania), recuperándose las rebanadas de la región de interés. Estas rebanadas fueron montadas en portaobjetos recubiertos con gelatina. Después, las rebanadas de cerebro así montadas fueron teñidas con violeta de cresilo e inspeccionadas con la ayuda de un estereoscopio. Los datos de 40 ratas con inyectores localizados fuera de la CPFm fueron excluidos (**Fig. 2**).

Figura 2. Microfotografía de corte coronal representativo de cerebro de rata teñido con violeta de cresilo y esquema que corresponde al hemisferio contralateral.



Panel izquierdo: microfotografía de corte coronal representativo de cerebro de rata teñido con violeta de cresilo (+3.0 mm desde Bregma según Paxinos et al., 2007) mostrando la posición de la punta de uno de los inyectores en la CPFm. Panel derecho: Esquema que corresponde al hemisferio contralateral modificado de Paxinos et al., 2007. CPL: corteza prelímbica; CIL: corteza infralímbica. Los datos de los sujetos en los que fueron encontradas las puntas de los inyectores fuera de la región comprendida por la CPL y la CIL fueron descartados.

6.4. ESTIMACIÓN DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DE LA CPFm

Dado que se ha reportado que el consumo de alimentos dulces incrementa los niveles extracelulares de dopamina en la CPFm (Bassareo et al., 2002; De Luca, 2014; Feenstra et al., 1999; Gambarana et al., 2003; Mingote et al., 2004) y el consumo excesivo de glucosa modifica la expresión de receptores dopaminérgicos en el estriado (Colantuoni et al., 2001), por lo que nos propusimos verificar si el consumo prolongado al azúcar modifica la cantidad de receptores a dopamina en la CPFm, para lo cual se empleó un conjunto independiente de 18 ratas para cuantificar la cantidad de receptores a dopamina mediante el uso de Western blot.

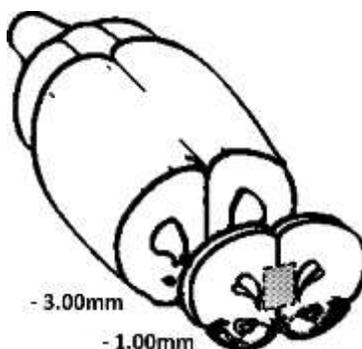
Los sujetos experimentales fueron asignados al azar a uno de dos grupos: el grupo AGUA el cual se mantuvo en las condiciones estándares del bioterio, con agua simple y alimento *ad libitum* por 21 días, y el grupo AZÚCAR cuya única diferencia con el grupo anterior es que en vez de agua simple se le ofreció agua azucarada al 10%. Los bebederos con agua simple y agua azucarada se lavaban y se volvían a llenar cada dos días.

6.4.1. Disección de la CPFm

Al final del periodo de consumo prolongado a azúcar por 21 días todos los sujetos experimentales fueron sacrificados por decapitación y los cerebros fueron extraídos. Con la finalidad de disectar la CPFm de ambos hemisferios se hizo un primer corte coronal de 1mm de grosor en la punta rostral de los lóbulos frontales con la ayuda de una matriz de plástico, y esta rebanada fue descartada pues no contenía la región de interés. Después se hizo una segunda rebanada de 2mm de grosor de la

cual se extrajo el tejido a estudiar. Las astas anteriores del cuerpo calloso fueron empleadas como referencia y la región entre ambas astas fue recuperada para los posteriores análisis (Fig. 3).

Figura 3. Esquema que representa la región disectada que se utilizó en la cuantificación de los receptores a dopamina en la CPFm.



El esquema representa un cerebro de rata con cortes coronales a nivel de 1mm y 3mm en dirección caudal partiendo de la punta rostral de los lóbulos frontales (-1.00mm y -3.00mm en la figura). La punta rostral de los lóbulos frontales no se ilustra en el esquema. El rectángulo gris que se ilustra entre las astas anteriores del cuerpo calloso en la rebanada representa la región que fue recuperada para los posteriores análisis.

6.4.2. Fraccionamiento subcelular de la CPFm

La CPFm de ambos hemisferios fue homogenizada conjuntamente en 500 μ l de solución "A" (0.32 M de sacarosa, 0.5 mM de CaCl_2 , 1 mM de NaHCO_3 , 1 mM de MgCl_2 , 1 mM de NaF, 2 mM de ortovanadato de sodio, β -glicerofosfato y el coctel completo inhibidor de proteasas de la marca Roche) con 12 golpes de un homogeneizador de Teflon dentro de un recipiente de cristal de borosilicato con la finalidad de aislar las terminales sinápticas y formar los sinaptosomas. La muestra homogenizada en esta forma fue centrifugada a 1,000 x g por 10 min con la finalidad de remover los núcleos y otros restos celulares densos. El sedimento (pellet) fue

resuspendido en 0.5 ml de solución "A" y centrifugado por 10 min a 1000 x g. Los dos sobrenadantes se mezclaron. La muestra libre de núcleos y otros restos celulares densos fue centrifugada a 15,000 x g por 15 min con la finalidad de obtener la fracción de membranas citoplasmáticas en forma de sobrenadante, mientras que en el sedimento del fondo estaban contenidos los sinaptosomas junto con otras estructuras. El sobrenadante se mantuvo a - 20°C hasta que se realizó la estimación de los receptores dopaminérgicos con la técnica de Western Blot. El sedimento que contenía los sinaptosomas fue resuspendido en 1 ml de solución "B" 0.32 M de sacarosa, 1 mM de NaHCO₃, 1 mM de NaF, 2 mM de ortovanadato de sodio, β-glicerofosfato y el coctel completo inhibidor de proteasas de la marca Roche) y fue centrifugado en un gradiente discontinuo de sacarosa, de tal forma que se colocó 1 ml de solución "B" al 1.2 M de sacarosa en el fondo del tubo en el que se centrifugó la muestra, se colocó encima 1 ml de solución "B" al 1.0 M de sacarosa seguido de 1 ml de solución "B" al 0.85 M de sacarosa y se cubrió este gradiente discontinuo con la muestra resuspendida en 1 ml de solución "B". Los tubos fueron centrifugados a 82,500 x g por 2 h. Al finalizar la centrifugación de 2 h, la banda que se formó debido al aglomeramiento de los sinaptosomas entre la capa de 1.0 M y 1.2 M de sacarosa fue aspirada cuidadosamente con ayuda de una pipeta y almacenada a - 20°C hasta que se realizó la estimación de los receptores dopaminérgicos con la técnica de Western Blot.

6.4.3. Estimación de los receptores dopaminérgicos con la técnica de Western Blot

Las muestras se prepararon tomando la cantidad suficiente para contener 10µg de proteína, esta cantidad fue mezclada con buffer de Leammli en una proporción 1:1. Esta mezcla estuvo en baño María por 5 min a 50°C para desenmascarar las proteínas.

Posteriormente, las muestras así preparadas fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 10% de 10 carriles. Los carriles de los extremos (carril 1, 9 y 10 contados desde el extremo izquierdo) quedaron vacíos. El segundo carril respecto al extremo izquierdo del gel fue cargado con el marcador de peso molecular (marca Thermo Scientific), los carriles 3, 5 y 7 se cargaron con las muestras provenientes de sujetos del grupo AGUA y los carriles 4, 6 y 8 se cargaron con las muestras provenientes de sujetos del grupo AZÚCAR. La separación de las proteínas por peso molecular con electroforesis se hizo por una hora y media a 110V con el buffer de corrida (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0.1% SDS).

Las proteínas se transfirieron a membranas PVDF (marca BioRad) con un potencial eléctrico de 75V por 12 h en buffer de transferencia (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0.1% SDS, 20% metanol). Las membranas resultantes de la transferencia se incubaron por 1 h en buffer TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) con 5% de BSA. Para marcar los receptores a dopamina, las membranas de PVDF fueron incubadas 12 h a temperatura ambiente con anticuerpo anti D1 (Calbiochem)

o anti D2 (Boster) policlonales, desarrollados en conejo y a una concentración de 1:1000.

Las membranas se lavaron durante 5 min 4 veces en TBS-T, y se incubaron 1hr con anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano (anti conejo, policlonal, 1:5000, Sigma). Las membranas se lavaron por 5 cinco min 4 veces con TBS-T y dos veces con TBS. Después las membranas se incubaron con sustrato quimio-luminiscente HRP (BioRad) y se expusieron a placas radiográficas. La inmunoreactividad se cuantificó densitométricamente con el software ImageJ (National Institutes of Health).

La actina, una proteína que se expresa constitutivamente en las neuronas, fue tomada como referencia en las mismas membranas de PVDF. Con esta finalidad, a las membranas se les quitaron los anticuerpos contra los receptores dopaminérgicos con 2 lavados de 20 min a temperatura ambiente con buffer de elución (stripping; 62.5 mM Tris, 2% SDS, 100 mM β -Mercaptoetanol). Después de lo cual las membranas recibieron 4 lavados de 5 min con TBS-T y se incubaron por 1 h en buffer TBS-T con 5% de BSA. Para detectar la actina, las membranas de PVDF fueron incubadas 12 h a temperatura ambiente con anticuerpos anti-actina (Abcam) monoclonal, desarrollado en ratón y a una dilución de 1:5000.

Las membranas se lavaron durante 5 min 4 veces en TBS-T, y se incubaron 1hr con anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano (anti-ratón, policlonal, 1:5000, Sigma). Las membranas se lavaron por 5 cinco min 4 veces con TBS-T y dos veces con TBS. Después las membranas se incubaron con sustrato quimio-luminiscente HRP (BioRad) y se expusieron a placas radiográficas. La inmunoreactividad se

cuantificó densitométricamente con el software ImageJ (National Institutes of Health).

6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Con la finalidad de realizar los análisis estadísticos se utilizó el software SigmaPlot (Systat Software). Los datos se presentan como media \pm error estándar medio. Las diferencias significativas fueron identificadas realizando análisis factoriales de dos vías (ANOVAs de dos vías) seguidos de pruebas *Post-Hoc* Bonferroni en todos los casos excepto en las comparaciones de la estimación de receptores a dopamina. Para identificar diferencias significativas de receptores a dopamina se utilizaron pruebas t para grupos independientes. Solo aquellas diferencias con un valor de $p < 0.05$ fueron consideradas como significativas.

7. RESULTADOS

7.1. AUMENTO EN EL CONSUMO DEL LÍQUIDO AZUCARADO Y REDUCCIÓN EN EL CONSUMO DE ALIMENTO SÓLIDO DURANTE EL PERIODO DE EXPOSICIÓN AL AZÚCAR

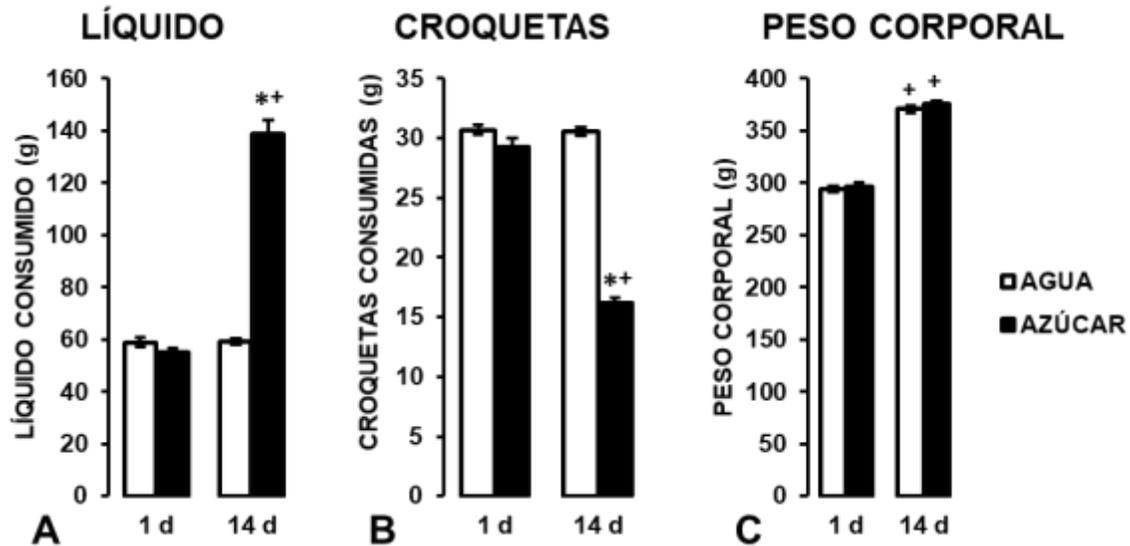
Las diferencias en el consumo de líquidos, alimento sólido y peso corporal en los días 1 y 14 del protocolo conductual se muestran en la figura 4. Un ANOVA de dos vías revela efectos significativos entre los grupos AGUA y AZÚCAR ($F_{(1,129)}=138.263$, $p < 0.01$), entre los días 1 y 14 ($F_{(1,129)}=302.781$, $p < 0.01$) y una interacción significativa entre factores ($F_{(1,129)}=297-789$, $p < 0.01$). El análisis *Post Hoc* empleando la prueba Bonferroni revela un aumento significativo en el consumo de líquido en el día 14 con respecto al día 1 en el grupo AZÚCAR ($p < 0.05$), pero no en el grupo AGUA ($p > 0.05$). Además, el día 14 el grupo AZÚCAR consume mayor cantidad de líquido que el grupo AGUA ($p < 0.05$; Fig. 4A).

También se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento (Fig 4B; efecto entre grupos: $F_{(1,129)}=231.796$, $p < 0.01$; efecto entre días: $F_{(1,129)}=210.590$, $p < 0.01$; interacción: $F_{(1,129)}=200.135$, $p < 0.01$). El consumo de croquetas del grupo AZÚCAR es menor el día 14 en comparación con el día 1 (Bonferroni: $p < 0.05$). A su vez, el día 14 el grupo AZÚCAR consume una cantidad menor de croquetas que el grupo AGUA ($p < 0.05$).

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el peso corporal entre los grupos, ya que ambos aumentaron el mismo peso durante los 14 días del periodo de exposición al azúcar (Fig. 3C; efecto entre grupos: $F_{(1,129)}=0.347$, $p=$

0.557; efecto entre días: $F_{(1,129)} = 1782.503$, $p < 0.01$; interacción: $F_{(1, 129)} = 0.490$, $p = 0.485$; Bonferroni = $p < 0.05$).

Figura 4. Cambios en el consumo de líquidos y alimento sólido, así como en el peso corporal durante los 14 días de consumo.

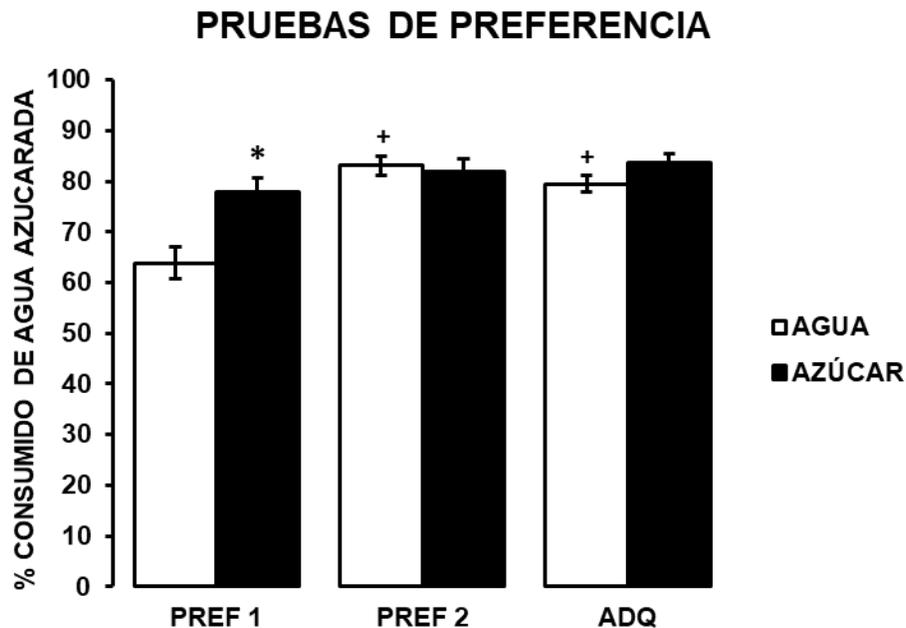


Cambios en el consumo de líquidos (Panel A) y alimento sólido (Panel B), así como en el peso corporal (Panel C) durante los 14 días de consumo. * = $p < 0.05$ vs grupo AGUA; + = $p < 0.05$ vs día 1. Grupo AGUA $n = 66$, grupo AZÚCAR $n = 65$.

7.2. AUMENTO EN LA PREFERENCIA POR AZÚCAR DEBIDO A LA EXPOSICIÓN AL AZÚCAR

Al finalizar el periodo de exposición al azúcar (día 21 en Fig. 1) se privó de líquidos a los sujetos experimentales para asegurar la motivación a beber. Un ANOVA de dos vías del porcentaje consumido de agua azucarada con respecto al total del líquido consumido durante las 2 pruebas de preferencia (días 22 y 23 en Fig. 1) y el día de adquisición del CAS (día 24 en Fig. 1) revela diferencias significativas entre los grupos ($F_{(1, 34)} = 7.788$, $p < 0.01$), así como entre los días ($F_{(2, 34)} = 16.487$, $p < 0.01$) y una interacción significativa entre factores ($F_{(2, 34)} = 5.805$, $p < 0.01$; ver Fig. 5). El análisis *Post Hoc* con la prueba Bonferroni revela diferencias significativas entre los grupos AGUA y AZÚCAR en la primera prueba de preferencia ($p < 0.05$); no obstante, durante la segunda prueba de preferencia y la adquisición del CAS, ambos grupos mostraron un consumo similar de azúcar ($p > 0.05$), debido al incremento significativo en el porcentaje de azúcar consumido por el grupo AGUA en la segunda prueba de preferencia y la adquisición del CAS ($p < 0.05$).

Figura 5. Preferencia por azúcar durante las pruebas de preferencia por el sabor (PREF 1 y PREF 2) y la adquisición del CAS (ADQ).

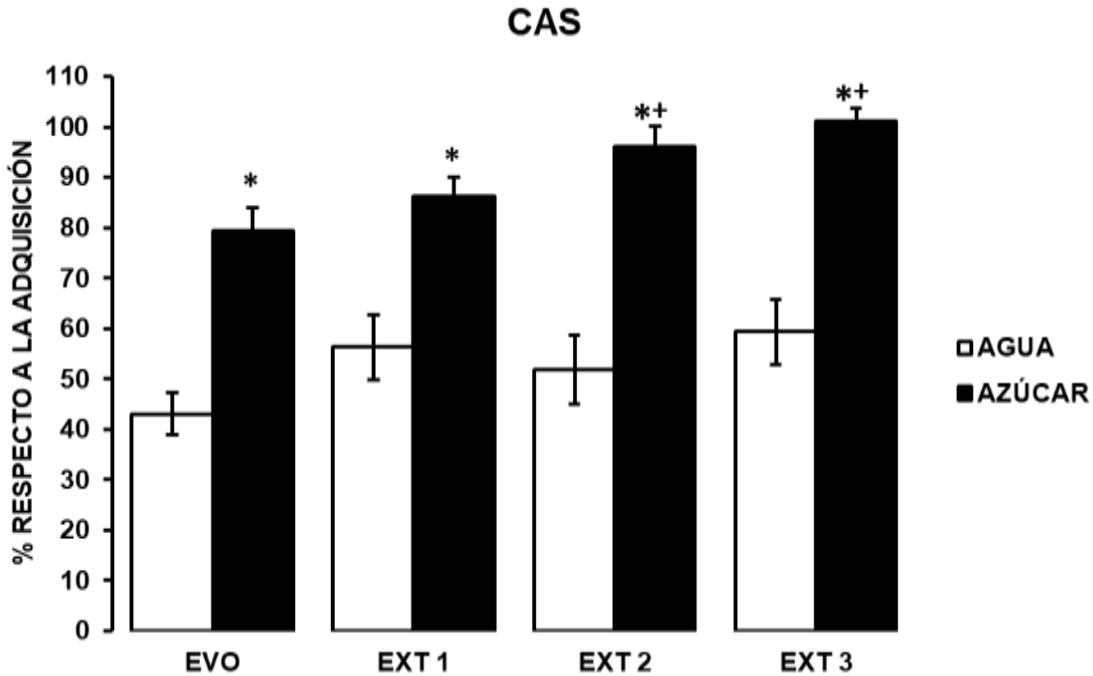


Los sujetos experimentales fueron inyectados bilateralmente con solución salina isotónica 20 min antes del consumo de líquidos el día de la adquisición del CAS. % CONSUMIDO DE AGUA AZUCARADA: $(\text{ml consumidos de agua azucarada} \times 100) / (\text{ml consumidos de agua azucarada} + \text{ml consumidos de agua simple})$. * = $P < 0.05$ vs grupo AGUA; + = $P < 0.05$ vs PREF 1. Grupo AGUA $n = 10$, grupo AZÚCAR $n = 9$.

7.3. AUMENTO EN LA IL DEL CAS Y ACELERACIÓN DE LA EXTINCIÓN DEL CAS DEBIDO A LA EXPOSICIÓN AL AZÚCAR

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje consumido de agua azucarada en proporción al porcentaje consumido de agua azucarada el día de la adquisición durante la evocación del CAS y los 3 días de extinción del CAS (ver Fig. 6). Un ANOVA de 2 vías del porcentaje consumido de agua azucarada en proporción al porcentaje consumido de agua azucarada el día de la adquisición reveló un efecto significativo entre los grupos ($F_{(1,51)}= 34.793$, $p < 0.01$), así como entre los días ($F_{(3,51)}= 4.990$, $p < 0.01$), pero no se encontró una interacción significativa ($F_{(3, 51)}= 2.421$, $p= 0.077$). Se encontraron diferencias significativas entre los grupos AGUA y AZÚCAR en la evocación de la memoria, del mismo modo que en los 3 días de extinción ($p < 0.05$, análisis *Post Hoc* empleando la prueba Bonferroni). Resulta pertinente hacer notar que mientras en la evocación del CAS se mide el grado de aversión adquirida, durante las extinciones los sujetos reaprenden la memoria apetitiva. El grupo AZÚCAR tuvo un consumo mayor de agua azucarada el día de la evocación y las extinciones en comparación con el grupo AGUA (Vease Fig. 6). Adicionalmente, el grupo AZÚCAR alcanzó un porcentaje de consumo de agua azucarada similar al observado durante el día de adquisición. Estos resultados indican una mayor IL del CAS después de 21 días de consumo de azúcar, al igual que la aceleración significativa de la extinción de la poca aversión adquirida, ya que, a diferencia del grupo AGUA, el grupo AZÚCAR incremento significativamente su consumo del líquido dulce en las extinciones 2 y 3 en comparación con el día de evocación ($p < 0.05$, Fig. 6).

Figura 6. Porcentaje consumido de agua azucarada en proporción al porcentaje consumido de agua azucarada el día de la adquisición durante la evocación del CAS (EVO) y los 3 días de extinción del CAS (EXT 1 a 3).



*Figura 6. Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje consumido de agua azucarada en proporción al porcentaje consumido de agua azucarada el día de la adquisición durante la evocación del CAS (EVO) y los 3 días de extinción del CAS (EXT 1 a 3). % RESPECTO A LA ADQUISICIÓN = (% consumido de agua azucarada el día de la evocación x 100)/(% consumido de agua azucarada el día de la adquisición) o % RESPECTO A LA ADQUISICIÓN = (% consumido de agua azucarada en el día de extinción x 100)/(% consumido de agua azucarada el día de la adquisición). * = $P < 0.05$ vs grupo AGUA; + = $P < 0.05$ vs EVO. Grupo AGUA $n = 10$, grupo AZÚCAR $n = 9$.*

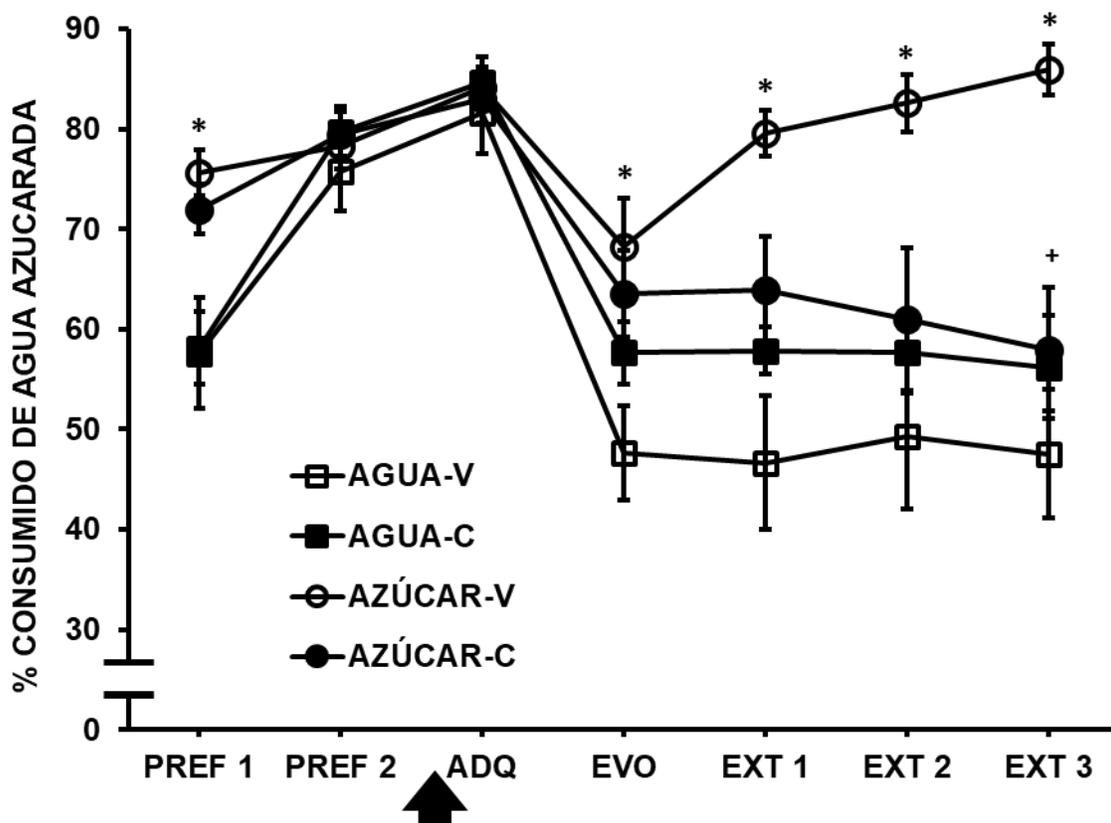
7.4. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS DE LA CPFm DURANTE LA ADQUISICIÓN DEL CAS ESTABILIZA LA MEMORIA AVERSIVA DEL SABOR

El efecto de las inyecciones de clenbuterol en la CPFm antes de la adquisición del CAS, en los grupos AGUA y AZÚCAR, se muestra en la figura 7. Un ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo entre grupos ($F_{(3,234)}= 11.628$, $p < 0.01$), así como entre los días ($F_{(6,234)}= 25.291$, $p < 0.01$) y una interacción significativa entre factores ($F_{(18,234)}= 3.292$, $p < 0.01$). Como se esperaba, las ratas con una exposición prolongada al azúcar (grupos AZÚCAR-V y AZÚCAR-C) presentaron un consumo mayor de azúcar en la primera prueba de preferencia por el sabor en comparación con el grupo AGUA-V (prueba *Post Hoc* Bonferroni; $p < 0.05$). El grupo AZÚCAR-V mostró una fuerte IL del CAS y no redujo el consumo de azúcar durante la evocación o las extinciones. El grupo AZÚCAR-V consume más azúcar que el grupo AGUA-V durante la evocación y extinciones del CAS ($p < 0.05$). El grupo AGUA-V mostró un decremento significativo en el consumo de azúcar durante la evocación y las 3 extinciones en comparación con el consumo el día de la adquisición ($p < 0.05$). Estos resultados indican que la exposición aguda al azúcar (20 min en las dos pruebas de preferencia) no produce una IL del CAS significativa, además de que la memoria aversiva del sabor se mantiene durante los 3 ensayos de extinción.

También, el análisis *Post Hoc* reveló que no existen diferencias significativas entre el grupo AZÚCAR-V y AZÚCAR-C en los días de adquisición, evocación y las extinciones 1 y 2, pero sí reveló una diferencia significativa el día de la extinción 3 ($p < 0.05$). Estos resultados indican que la activación de los receptores β -

adrenérgicos de la CPFm durante la adquisición del CAS estabiliza la memoria aversiva por más tiempo, ya que las inyecciones de clenbuterol en la CPFm retardan la extinción (retardan la recuperación de la preferencia por azúcar o estabilizan el trazo de memoria aversivo) después del consumo prolongado de azúcar (Fig. 7).

Figura 7. Efectos del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en la preferencia por azúcar durante el protocolo de CAS (ADQ, EVO y EXT 1 a 3) en los grupos AGUA y AZÚCAR.

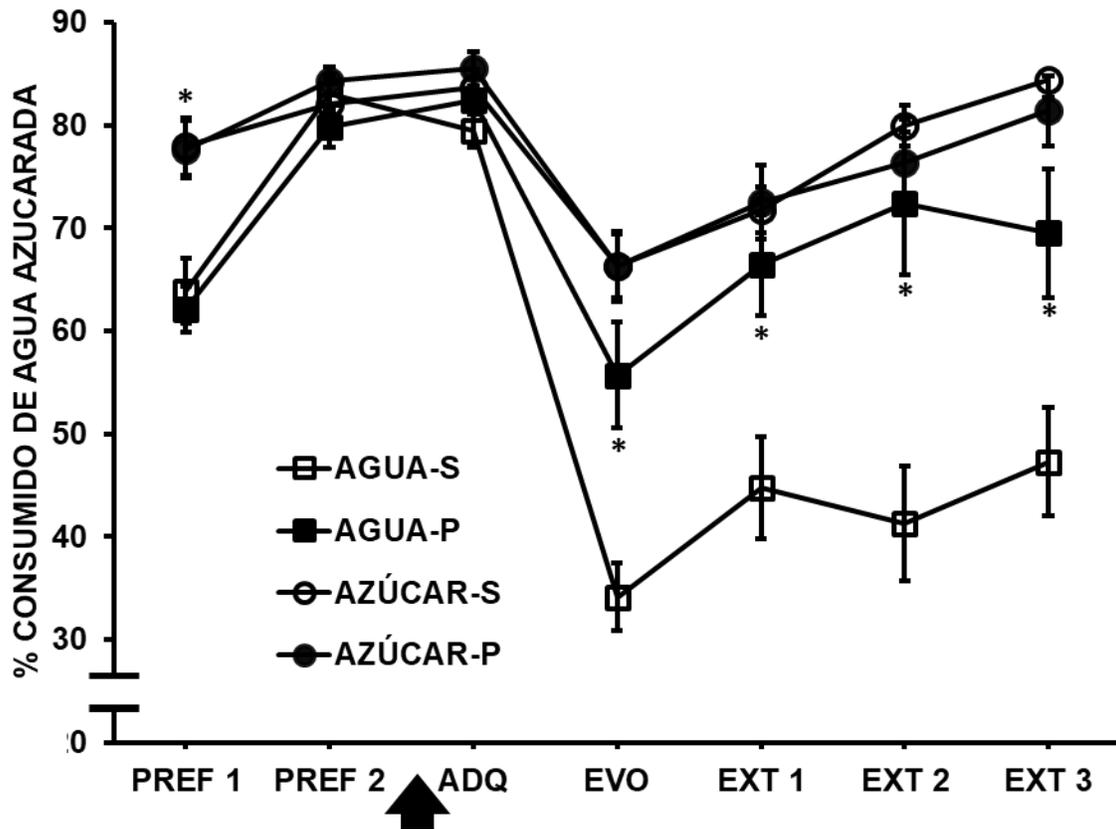


La flecha indica la inyección de clenbuterol en la CPFm 20 min antes de la adquisición del CAS. * = $P < 0.05$ vs grupo AGUA-V; + = $P < 0.05$ vs grupo AZÚCAR-V. Grupo AGUA-V $n = 10$, Grupo AGUA-C $n = 12$, grupo AZÚCAR-V $n = 10$, grupo AZÚCAR-C $n = 11$.

7.5. EL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS DE LA CPFm DURANTE LA ADQUISICIÓN DEL CAS INCREMENTA LA IL DEL CAS Y ACELERA LA EXTINCIÓN DEL CAS

El efecto de la inyección de propranolol en la CPFm antes de la adquisición del CAS en los grupos AGUA y AZÚCAR se muestran en la figura 8. Un ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo entre los grupos ($F_{(3,216)} = 14.917$, $p < 0.01$), así como entre los días ($F_{(6,216)} = 45.717$, $p < 0.01$) y una interacción significativa entre factores ($F_{(18, 216)} = 7.182$, $p < 0.01$). Las ratas con una exposición prolongada al azúcar (AZÚCAR-S y AZÚCAR-P) consumieron más azúcar el día de la primera preferencia por el sabor que los grupos AGUA-S y AGUA-P (Prueba *Post Hoc* Bonferroni; $p < 0.05$). El grupo AGUA-S mostró un decremento significativo en el consumo de azúcar en el día de evocación del CAS y las 3 extinciones del CAS ($p < 0.05$). Además, el grupo AGUA-P consumió una cantidad significativamente mayor de azúcar que el grupo AGUA-S en los días de evocación del CAS y las 3 extinciones del CAS ($p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos AZÚCAR-S y AZÚCAR-P, indicando que la inyección de propranolol en la CPFm incrementa la IL del CAS y acelera la extinción del CAS después de 2 días de exposición aguda al azúcar (20 min en las pruebas de preferencia por el sabor), pero no afecta la IL del CAS después de la exposición crónica al azúcar.

Figura 8. Efectos del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en la preferencia por azúcar durante el protocolo de CAS (ADQ, EVO y EXT 1 a 3) en los grupos AGUA y AZÚCAR.

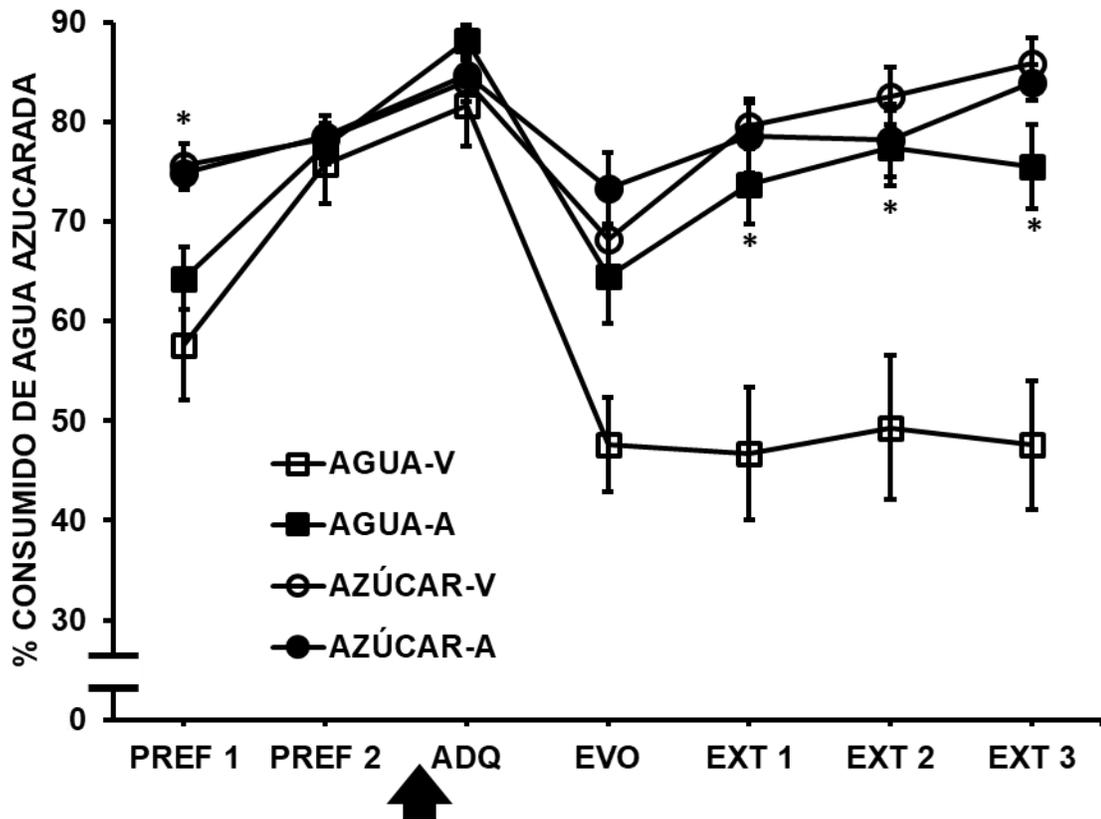


La flecha indica la inyección de propranolol en la CPFm 20 min antes de la adquisición del CAS. * = $P < 0.05$ vs grupo AGUA-S. Grupo AGUA-S $n = 10$, Grupo AGUA-P $n = 11$, grupo AZÚCAR-S $n = 9$, grupo AZÚCAR-P $n = 10$.

7.6. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DE LA CPFm DURANTE LA ADQUISICIÓN DEL CAS INCREMENTA LA IL DEL CAS Y ACELERA LA EXTINCIÓN DEL CAS

El efecto de la inyección de apomorfina en la CPFm antes de la adquisición del CAS en los grupos AGUA y AZÚCAR se muestran en la figura 9. Un ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo entre los grupos ($F_{(3,234)} = 15.848$, $p < 0.01$), así como entre los días ($F_{(6,234)} = 19.049$, $p < 0.01$) y una interacción significativa entre factores ($F_{(18, 234)} = 4.773$, $p < 0.01$). Las ratas con una exposición prolongada al azúcar (AZÚCAR-V y AZÚCAR-A) consumieron más azúcar el día de la primera preferencia por el sabor que los grupos AGUA-V y AGUA-A (Prueba *Post Hoc* Bonferroni; $p < 0.05$). El análisis *Post Hoc* revela diferencias significativas entre el grupo AGUA-V y AGUA-A durante los 3 días de extinción ($p < 0.05$). No obstante, después del día de adquisición del CAS no fueron encontradas diferencias significativas entre los grupos AZÚCAR-V y AZÚCAR-A, ni entre estos dos grupos y el grupo AGUA-A, lo que indica que la inyección de apomorfina en la CPFm acelera la extinción del CAS de manera similar a la exposición prolongada de azúcar.

Figura 9. Efectos de la activación de los receptores dopaminérgicos en la preferencia por azúcar durante el protocolo de CAS (ADQ, EVO y EXT 1 a 3) en los grupos AGUA y AZÚCAR.



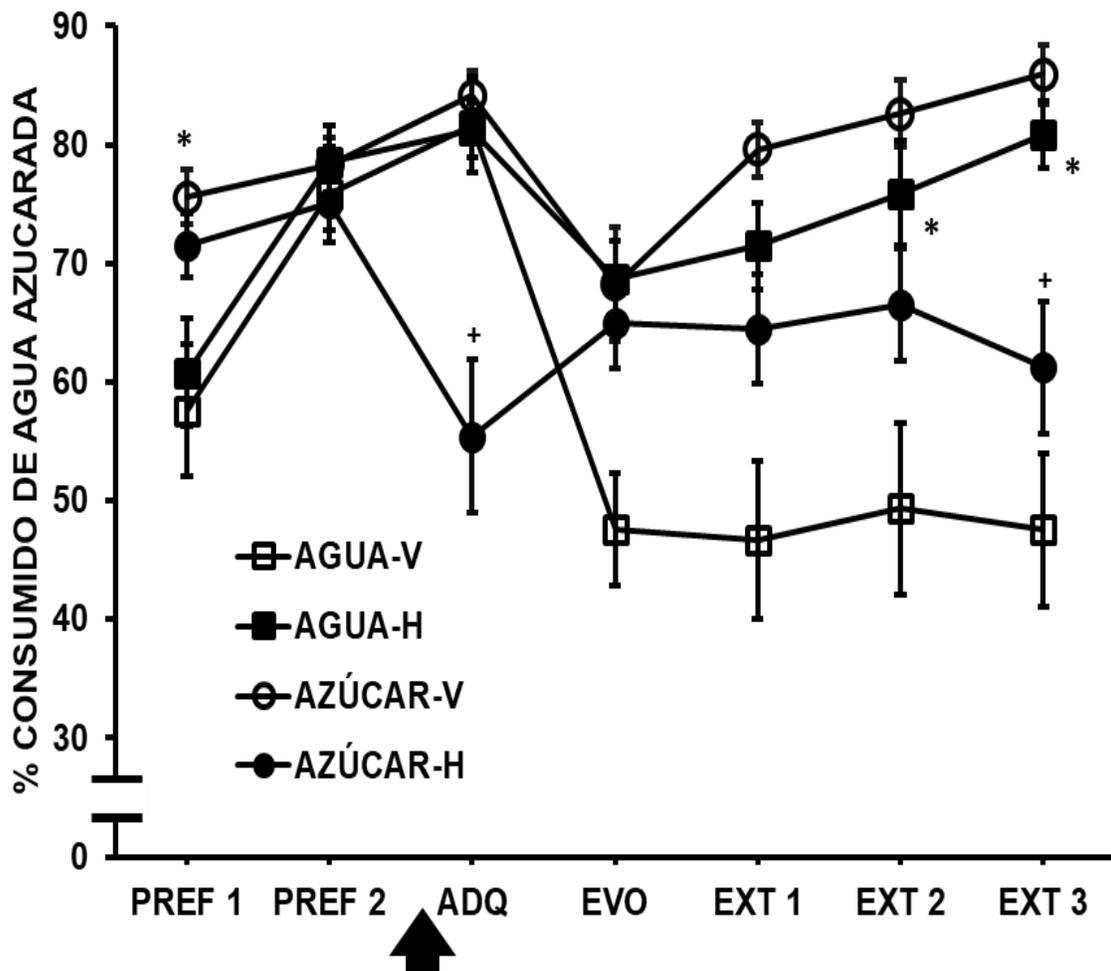
La flecha indica la inyección de apomorfina en la CPFm 20 min antes de la adquisición del CAS. * = $P < 0.05$ vs grupo AGUA-V. Grupo AGUA-V $n = 10$, Grupo AGUA-A $n = 12$, grupo AZÚCAR-V $n = 10$, grupo AZÚCAR-A $n = 11$.

7.7. EL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DE LA CPFm DURANTE LA ADQUISICIÓN DEL CAS IMPIDE LA EVOCACIÓN DE LA MEMORIA APETITIVA DESPUÉS DE UN CONSUMO PROLONGADO DE AZÚCAR Y ACELERA LA EXTINCIÓN DEL CAS DESPUÉS DE UN CONSUMO AGUDO DE AZÚCAR

El efecto de la inyección de haloperidol en la CPFm antes de la adquisición del CAS en los grupos AGUA y AZÚCAR se muestran en la figura 10. Un ANOVA de dos vía reveló un efecto significativo entre los grupos ($F_{(3,246)}= 12.457$, $p < 0.01$), así como entre los días ($F_{(6,246)}= 7.528$, $p < 0.01$) y una interacción significativa entre factores ($F_{(18, 246)}= 5.338$, $p < 0.01$). Las ratas con una exposición prolongada al azúcar (AZÚCAR-V y AZÚCAR-H) consumieron más azúcar el día de la primera preferencia por el sabor que los grupos AGUA-V y AGUA-H (Prueba *Post Hoc* Bonferroni; $p < 0.05$). El análisis *Post Hoc* reveló un consumo significativamente mayor de agua azucarada por parte del grupo AGUA-H en los días de las extinciones 2 y 3 en comparación con el grupo AGUA-V ($p < 0.05$). De manera peculiar, el grupo AZÚCAR-H consume menos agua azucarada en comparación con el grupo AZÚCAR-V el día de la adquisición del CAS ($p < 0.5$), lo que indica que la inyección de haloperidol en la CPFm impide la evocación de la memoria apetitiva después del consumo prolongado de azúcar. También, el grupo AZÚCAR-H presentó un consumo significativamente menor de agua azucarada en la extinción 3 en comparación con el grupo AZÚCAR-V ($p < 0.5$), lo cual indica que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos de la CPFm durante la adquisición del CAS estabiliza la memoria aversiva por más tiempo, demorando la extinción (retardando la

recuperación de la preferencia por azúcar) después del consumo prolongado de azúcar (Fig. 10). En conjunto, estos resultados indican que el bloqueo de los receptores a dopamina en la CPFm durante la adquisición del CAS tiene efectos diferentes en función del grado de exposición al azúcar.

Figura 10. Efectos del bloqueo de los receptores dopaminérgicos en la preferencia por azúcar durante el protocolo de CAS (ADQ, EVO y EXT 1 a 3) en los grupos AGUA y AZÚCAR.

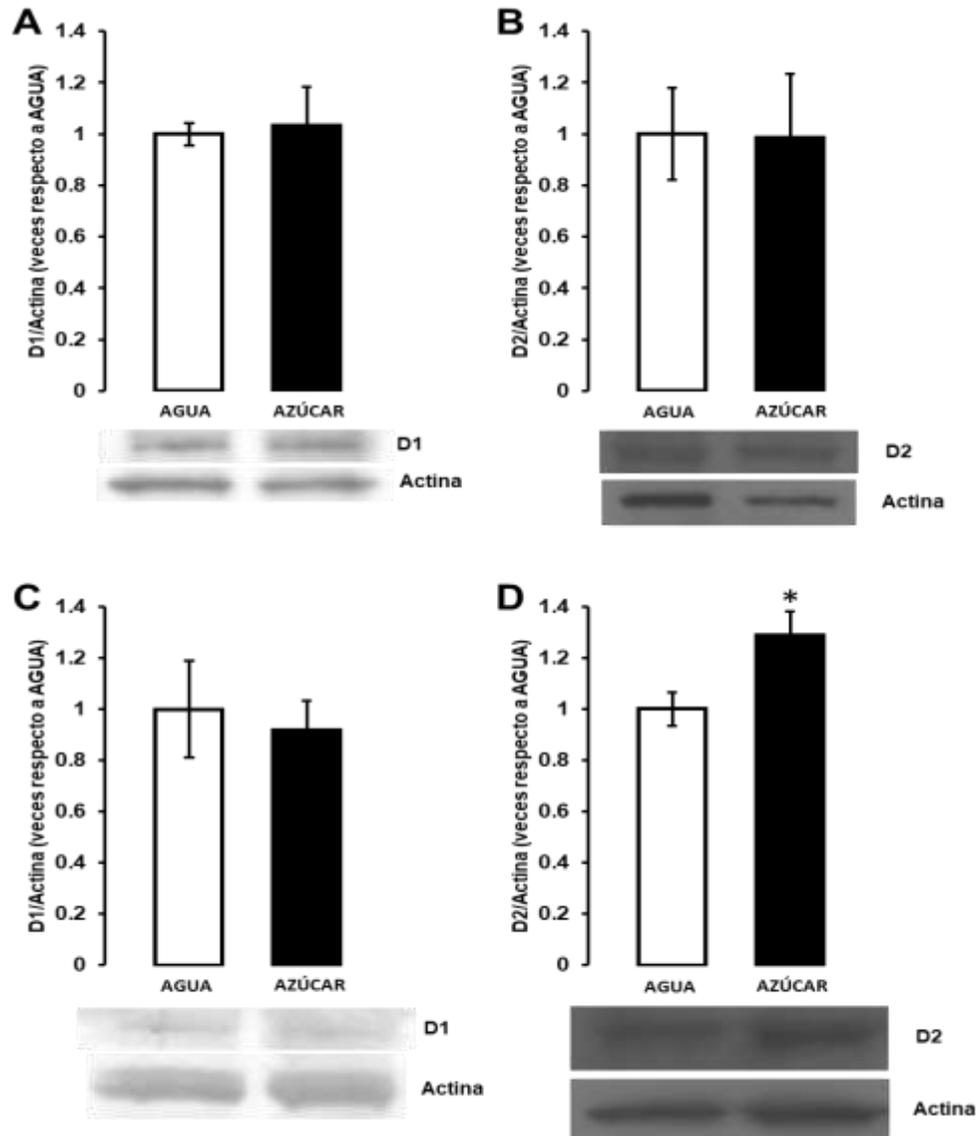


La flecha indica la inyección de haloperidol en la CPFm 20 min antes de la adquisición del CAS. *= $P < 0.05$ vs grupo AGUA-V; += $P < 0.05$ vs grupo AZÚCAR-V. Grupo AGUA-V $n = 10$, Grupo AGUA-H $n = 11$, grupo AZÚCAR-V $n = 10$, grupo AZÚCAR-H $n = 14$.

7.8. EL CONSUMO PROLONGADO DE AZÚCAR INCREMENTA LA CANTIDAD DE RECEPTORES D2 EN LA FRACCIÓN DE LAS MEMBRANAS CITOPLASMÁTICAS DE LA CPFm

Dado que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos en la CPFm reduce la preferencia por azúcar después del consumo prolongado de agua azucarada, y que la evidencia previa indica que el consumo de azúcar reduce la expresión de receptores a dopamina en el estriado (Colantuoni et al., 2001), nos propusimos evaluar la cantidad de los receptores D1 y D2 en terminales sinápticas aisladas y en la fracción de membranas citoplasmáticas de la CPFm. Los resultados muestran que el consumo prolongado de azúcar no modifica la cantidad de receptores D1 en sinaptosomas (Fig. 11A) ni en la fracción de membranas citoplasmáticas (Fig. 11C) de la CPFm. Asimismo, no se encontraron cambios significativos en la cantidad de receptores D2 en las terminaciones sinápticas aisladas (Fig. 11B). Sin embargo, un incremento significativo fue encontrado en la fracción de membranas citoplasmáticas de la CPFm después del consumo prolongado de azúcar ($t_{(16)} = -2.589$; $p < 0.05$; vease Fig. 9D).

Figura 11. Densidad óptica de los “blots” del receptor D1 (A y C) y del receptor D2 (B y D) dividida entre la densidad óptica de los correspondientes “blots” de actina como controles de cargado y expresado como partes proporcionales respecto al grupo AGUA (unidades del eje de las ordenadas: D1/Actina (veces respecto a AGUA) o D2/Actina (veces respecto a AGUA)).



*Panel A. Expresión del receptor D1 en sinaptosomas de la CPFm. Panel B. Expresión del receptor D2 en sinaptosomas de la CPFm. Panel C. Expresión del receptor D1 de la fracción de membranas citoplasmáticas de la CPFm. Panel D. Expresión del receptor D2 de la fracción de membranas citoplasmáticas de la CPFm. Las imágenes bajo las barras son muestras de los “blots” de los receptores D1 y D2 y sus respectivos “blots” de actina en los grupos AGUA (n= 9) y AZÚCAR (n= 9). * = P < 0.05 vs grupo AGUA.*

8. DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis doctoral muestran evidencia del cambio en la función de los receptores catecolaminérgicos después del consumo prolongado de azúcar, así como el aumento de los receptores a DA en la CPFm. Por un lado, la activación de los receptores β -adrenérgicos con clenbuterol demora la extinción de la memoria aversiva después del consumo prolongado de azúcar, mientras que el bloqueo con propranolol o la activación de los receptores dopaminérgicos con apomorfina incrementan la IL del CAS y aceleran la extinción, pero solamente en el grupo AGUA. Únicamente el bloqueo de los receptores dopaminérgicos con haloperidol reduce la preferencia por agua azucarada después del consumo prolongado de azúcar, aunque incrementa la IL del CAS y acelera la extinción de la memoria aversiva después del consumo agudo de azúcar. Además, después del consumo prolongado de azúcar se encontró un aumento de los receptores dopaminérgicos en la CPFm

Al igual que en reportes anteriores (Vera-Rivera et al., 2018), los resultados mostrados en el presente trabajo muestran que, durante el periodo de exposición al azúcar, los sujetos experimentales consumen mayor cantidad del líquido azucarado que lo que consumen de agua simple los sujetos del grupo control. Además, los sujetos del grupo AZÚCAR consumen menos cantidad de croquetas balanceadas para ratas que el grupo AGUA. De igual manera, no encontramos diferencias significativas en el peso corporal entre grupos, posiblemente debido a que la disminución en el consumo de alimento sólido compensa el aumento del consumo de azúcar (Fregoso, 2014).

Además, se encontró que 21 días de exposición al azúcar incrementan significativamente la preferencia por azúcar el día de la primera prueba de preferencia (día 22 del protocolo conductual; véase Fig. 1), reduce el grado de aversión condicionada medida el día de a la evocación del CAS (día 25) y esta aversión al sabor es lo suficientemente lábil para extinguirse dentro de los tres ensayos de extinción del protocolo. Esta evidencia indica que durante la exposición prolongada al azúcar se formó una memoria apetitiva del sabor que interfirió proactivamente con la formación de la memoria aversiva del sabor durante el CAS. Resulta pertinente destacar que aunque el consumo de azúcar por 20 min durante la primera prueba de preferencia por parte del grupo AGUA fue suficiente para igualar los consumos de azúcar en la segunda preferencia con los consumos del grupo AZÚCAR, el grado de interferencia del consumo agudo (20 min por 2 días) no produjo los mismos efectos en la IL del CAS, ni en las extinciones del CAS que la exposición prolongada, lo cual apoya la idea de que el grado de interferencia proactiva está en función de la magnitud de la exposición al sabor antes del CAS (De la Casa & Lubow, 1995). El incremento significativo en la IL del CAS después de la exposición prolongada a azúcar podría estar relacionada a la incapacidad de asociar nuevas consecuencias negativas a sabores dulces que son consumidos en exceso (*overeating*), lo cual es congruente con evidencia previa que ha mostrado en ratas la persistencia en la búsqueda de alimento apetitoso a pesar de existir el riesgo de recibir una descarga eléctrica (Johnson & Kenny, 2010; Latagliata, Patrono, Puglisi-Allegra, & Ventura, 2010). Esta evidencia sugiere que después del consumo prolongado de azúcar se puede desarrollar un patrón de consumo

perjudicial, caracterizado por persistir en el consumo a pesar de los efectos aversivos que acompañan a la ingestión.

En el presente trabajo se encontró que la activación de los receptores β -adrenérgicos no afectó la preferencia por azúcar en ninguno de los grupos (AGUA y AZÚCAR) y aunque no se encontraron diferencias significativas en la preferencia por azúcar el día de la evocación de CAS debidas a la activación de estos receptores, si se encontró que este tratamiento farmacológico estabiliza la memoria aversiva después del consumo prolongado de azúcar, previniendo que la aversión condicionada se extinga dentro de los tres ensayos de extinción del protocolo. De acuerdo con estudios previos, la activación de los receptores β -adrenérgicos en la CPFm mejora la memoria de trabajo, mejora la estabilidad la memoria aversiva, acelera la extinción de la memoria aversiva y acelera la adquisición del aprendizaje operante, lo que sugiere que la activación de estos receptores en la CPFm desempeña un papel general en la consolidación de la memoria (Do-Monte et al., 2010; Mingote et al., 2004; Ramos et al., 2005; Zhou et al., 2013). A pesar de que no se encontró ninguna diferencia significativa entre el grupo AGUA-V y AGUA-C, si se encontró que la activación de los receptores β -adrenérgicos de la CPFm estabiliza la memoria aversiva del sabor en el grupo AZÚCAR (Fig. 7). Además, el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos de la CPFm reduce el grado de aversión adquirida en el grupo AGUA (Fig. 8) lo que implica que después del consumo prolongado de azúcar existe una deficiencia en la activación de los receptores β -adrenérgicos de la CPFm, la cual es revertida por la administración de clenbuterol

que estabiliza la memoria (Fig. 7) y esta deficiencia es emulada por el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en el grupo AGUA (Fig. 8).

Este resultado concuerda con evidencia previa que reporta que la administración de propranolol en la CPFm antes del entrenamiento de CAS reduce la aversión condicionada al sabor (Reyes-López et al., 2010). Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia significativa en el grupo AZÚCAR debida a la administración de propranolol, lo que fortalece la idea de que después del consumo prolongado de azúcar existe una deficiencia en la activación de los receptores β -adrenérgicos de la CPFm, la cual es emulada por la administración de propranolol, reduciendo la aversión condicionada y acelerando la extinción de esta aversión. Además, esta idea es apoyada por el hecho de que mientras la administración sistémica del antagonista de los receptores β -adrenérgicos, el *dl-4-[2 hydroxy-3-isopropylaminopropoxy]-indole*, durante la adquisición del CAS reduce la aversión condicionada al sabor, el tratamiento opuesto la incrementa (Kral & St Omer, 1972).

Asimismo, la activación de los receptores a DA con apomorfina en la CPFm durante la adquisición del CAS disminuyó la aversión condicionada durante la evocación del CAS y aceleró la extinción de esta aversión en el grupo AGUA. Este resultado concuerda con evidencia previa que reporta que la administración de apomorfina en la CPFm incrementa la inhibición latente del miedo condicionado (Broersen et al., 1996). Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia significativa en el grupo AZÚCAR debida a la administración de apomorfina, lo que sugiere que la actividad dopaminérgica de la CPFm se encuentra alterada después del consumo prolongado de azúcar.

Con respecto al bloqueo de los receptores dopaminérgicos en la CPFm durante la adquisición del CAS, se encontró que este tratamiento redujo la aversión condicionada durante la evocación del CAS y aceleró la extinción de esta aversión en el grupo AGUA. Este resultado concuerda con reportes previos que muestran que la administración sistémica de antagonistas de los receptores D1 o administraciones locales en la corteza insular o en la amígdala, así como la denervación de las terminales dopaminérgicas en la CPFm antes de la adquisición del CAS impide la formación de la memoria aversiva (Berman et al., 2000; Fenu et al., 2009; Hernádi et al., 2000; Miranda et al., 2003). El hecho de que tanto el bloqueo como la activación de los receptores a DA impidan la adquisición del CAS en el grupo AGUA puede parecer contradictorio, sin embargo se ha documentado el efecto en U invertida de los receptores dopaminérgicos D1 sobre la memoria de trabajo, donde poca estimulación o mucha estimulación del sistema dopaminérgico tiene un efecto perjudicial (Vijayraghavan, Wang, Birnbaum, Williams, & Arnsten, 2007; Zahrt, Taylor, Mathew, & Arnsten, 1997). En el presente trabajo se encontró que tanto el bloqueo como la activación farmacológica de los receptores a dopamina impide la formación de la memoria aversiva del sabor, reduciendo la aversión adquirida y haciéndola más lábil a la extinción.

A pesar de que se ha reportado que el consumo de azúcar incrementa la liberación de dopamina (Mingote et al., 2004) y el bloqueo sistémico de los receptores D2 con raclopride reduce la preferencia por sacarosa (Hsiao & Smith, 1995), en el presente trabajo se encontró que el bloqueo de los receptores a dopamina con haloperidol en la CPFm redujo la preferencia por agua azucarada en

el grupo AZÚCAR, pero no en el grupo AGUA, lo que sugiere que después del consumo prolongado de azúcar existe una alteración en los receptores dopaminérgicos que hace sensibles a los sujetos experimentales al tratamiento con haloperidol, lo cual coincide con reportes previos donde el consumo de una dieta obesogénica hace más sensibles a los sujetos experimentales a los efectos del bloqueo de los receptores dopaminérgicos con SCH23390 y raclopride (Pritchett & Hajnal, 2011). Estos resultados indican que el consumo prolongado de azúcar puede desencadenar un patrón de consumo perjudicial, caracterizado por persistir en el consumo de sabores dulces a pesar de los efectos aversivos que acompañan su ingestión como resultado, en parte, de las alteraciones en el sistema dopaminérgico.

Finalmente, nuestros resultados indican que el consumo prolongado de azúcar incrementa los receptores a dopamina D2 en la fracción de las membranas citoplasmáticas de la CPFm. Reportes previos indican que existe un aumento de la liberación de dopamina extracelular en la CPFm cuando se consumen alimentos dulces, y que a diferencia de lo que ocurre en el NAcc, esta respuesta no decae a pesar de que se consuma repetidamente estos alimentos dulces (Bassareo et al., 2002; De Luca, 2014; Feenstra et al., 1999; Gambarana et al., 2003; Mingote et al., 2004). Estos reportes aunados al hecho de que la dopamina induce la reubicación de los receptores D2 dentro de la célula (Celver, Sharma, & Koo, 2010) indican que durante el consumo prolongado de azúcar existe un aumento de los receptores D2 en la fracción de las membranas citoplasmáticas de la CPFm debido a un aumento de la actividad dopaminérgica. Aunque no se ha encontrado un reporte similar al nuestro, sí se ha documentado que el consumo de azúcar reduce los

niveles del receptor D2 en el estriado (Bello, Lucas, & Hajnal, 2002; Colantuoni et al., 2001), lo que demuestra que los efectos del consumo de azúcar son diferentes en las distintas regiones del cerebro. Dado que se ha vinculado a la actividad dopaminérgica de la CPFm con la flexibilidad conductual (Arnsten & Li, 2004; Lanser, Ellenbroek, Zitman, Heeren, & Cools, 2001), la alteración del sistema dopaminérgico debido al consumo prolongado de azúcar podría estar afectando esta función de la CPFm, por lo cual los sujetos experimentales perseveran en el consumo a pesar de las consecuencias negativas que lo acompañan, no obstante resulta pertinente remarcar que es necesaria más investigación para dilucidar las causas del aumento en de los receptores dopaminérgicos y las implicaciones funcionales de este fenómeno.

El consumo excesivo y el aumento en el consumo de azúcar, así como la persistencia en el consumo a pesar de las consecuencias negativas son considerados como indicios de adicción (Avena, 2007; Johnson & Kenny, 2010; Latagliata et al., 2010). Esta incapacidad de asociar el consumo de agua azucarada con las consecuencias negativas podría deberse una alteración en la capacidad de aprender en general, ya que se han reportado déficits en el aprendizaje espacial después del consumo de un régimen rico en carbohidratos (Noble, Hsu, Liang, & Kanoski, 2017). En el presente trabajo encontramos la interferencia proactiva de la memoria apetitiva sobre un nuevo aprendizaje aversivo asociado al nuevo sabor después del consumo prolongado de azúcar. Esta interferencia proactiva es modulada de manera diferente por los sistemas dopaminérgicos y β -adrenérgicos.

9. CONCLUSIÓN

En resumen, los resultados encontrados en el presente trabajo son:

1. El consumo prolongado de azúcar incrementa la preferencia por agua azucarada, reduce la adquisición de la memoria aversiva y acelera su extinción.
2. La activación de los receptores β -adrenérgicos durante la adquisición del CAS impide la extinción de la memoria aversiva después del consumo prolongado de azúcar.
3. El bloqueo de los receptores β -adrenérgicos durante la adquisición del CAS reduce la adquisición de la memoria aversiva y acelera su extinción, únicamente en el grupo sin el consumo prolongado de azúcar.
4. La activación de los receptores a dopamina durante la adquisición del CAS reduce la adquisición de la memoria aversiva y acelera su extinción, únicamente en el grupo sin el consumo prolongado de azúcar.
5. El bloqueo de los receptores a dopamina durante la adquisición del CAS reduce la adquisición de la memoria aversiva y acelera su extinción, únicamente en el grupo sin el consumo prolongado de azúcar.
6. El bloqueo de los receptores a dopamina durante la adquisición del CAS impide la evocación de la memoria apetitiva altamente familiar e impide la extinción de la memoria aversiva después del consumo prolongado de azúcar.

En conjunto, estos resultados dan evidencia del cambio en la función de los receptores catecolaminérgicos después del consumo prolongado de azúcar, así como el aumento de los receptores dopaminérgicos en la CPFm, lo cual está asociado con la dificultad de adquirir un nuevo aprendizaje aversivo.

10. REFERENCIAS

- Akirav, I., Khatsrinov, V., Vouimba, R.-M., Merhav, M., Ferreira, G., Rosenblum, K., & Maroun, M. (2006). Extinction of conditioned taste aversion depends on functional protein synthesis but not on NMDA receptor activation in the ventromedial prefrontal cortex. *Learning & Memory*, 13(3), 254–258.
- Armelagos, G. J. (2014). Brain evolution, the determinates of food choice, and the omnivore's dilemma. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(10), 1330–1341.
- Arnsten, A., & Li, B. (2004). Neurobiology of executive functions: Catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biological Psychiatry*, 57:1377–1384
- Aston-Jones, G., Chiang, C., & Alexinsky, T. (1991). Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. *Progress in Brain Research*, 88, 501–520.
- Aultman, J. M., & Moghaddam, B. (2001). Distinct contributions of glutamate and dopamine receptors to temporal aspects of rodent working memory using a clinically relevant task. *Psychopharmacology*, 153(3), 353–364.
- Avena, N. M. (2007). Examining the addictive-like properties of binge eating using an animal model of sugar dependence. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 15(5), 481–491.
- Baldwin, A. E., Sadeghian, K., & Kelley, A. E. (2002). Appetitive instrumental learning requires coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the medial prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*, 22(3), 1063–1071.
- Balleine, B. W., & Dickinson, A. (1998). Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology*, 37(4-5), 407–419.

- Bassareo, V., De Luca, M. A., & Di Chiara, G. (2002). Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 22(11), 4709–4719.
- Bello, N. T., Lucas, L. R., & Hajnal, A. (2002). Repeated sucrose access influences dopamine D2 receptor density in the striatum. *Neuroreport*, 13(12), 1575–1578.
- Benes, F. M., Vincent, S. L., Molloy, R., & Khan, Y. (1996). Increased interaction of dopamine-immunoreactive varicosities with GABA neurons of rat medial prefrontal cortex occurs during the postweanling period. *Synapse*, 23(4), 237–245.
- Berman, D. E., & Dudai, Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, 291(5512), 2417–2419.
- Berman, D. E., Hazvi, S., Neduva, V., & Dudai, Y. (2000). The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *The Journal of Neuroscience*, 20(18), 7017–7023.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(3), 209–217.
- Bethus, I., Muscat, R., & Goodall, G. (2006). Dopamine manipulations limited to preexposure are sufficient to modulate latent inhibition. *Behavioral Neuroscience*, 120(3), 554–562.
- Birrell, J. M., & Brown, V. J. (2000). Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *The Journal of Neuroscience*, 20(11), 4320–4324.
- Bouton, M. E. (2011). Learning and the persistence of appetite: extinction and the motivation to eat and overeat. *Physiology & Behavior*, 103(1), 51–58.
- Bouton, M. E., & Peck, C. A. (1992). Spontaneous recovery in cross-motivational transfer (counterconditioning). *Animal Learning & Behavior*, 20(4), 313–321.

- Boyson, S. J., McGonigle, P., & Molinoff, P. B. (1986). Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *The Journal of Neuroscience*, 6(11), 3177–3188.
- Broersen, L. M., Heinsbroek, R. P., de Bruin, J. P., & Olivier, B. (1996). Effects of local application of dopaminergic drugs into the medial prefrontal cortex of rats on latent inhibition. *Biological Psychiatry*, 40(11), 1083–1090.
- Bubser, M., & Koch, M. (1994). Prepulse inhibition of the acoustic startle response of rats is reduced by 6-hydroxydopamine lesions of the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, 113(3-4), 487–492.
- Bubser, M., & Schmidt, W. J. (1990). 6-Hydroxydopamine lesion of the rat prefrontal cortex increases locomotor activity, impairs acquisition of delayed alternation tasks, but does not affect uninterrupted tasks in the radial maze. *Behavioural Brain Research*, 37(2), 157–168.
- Bures, J., Bermudez-Rattoni, F., & Yamamoto, T. (1998). *Conditioned Taste Aversion*. England; Oxford University Press.
- Carpenter, J. A. (1958). A comparison of stimulus-presentation procedures in taste-preference experiments. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 51(5), 561–564.
- Caynas, S. (2010). *Participación de los receptores muscarínicos en la corteza insular durante la formación de memorias de reconocimiento olfativo*. (Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.)
- Celver, J., Sharma, M., & Koo, A. (2010). RGS9-2 mediates specific inhibition of agonist-induced internalization of D2-dopamine receptors. *Journal of Neurochemistry*, 114(3), 739–749.
- Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444(7117), 288–294.

- Colantuoni, C., Schwenker, J., McCarthy, J., Rada, P., Ladenheim, B., Cadet, J. L., ... Hoebel, B. G. (2001). Excessive sugar intake alters binding to dopamine and mu-opioid receptors in the brain. *Neuroreport*, 12(16), 3549–3552.
- Corbit, L. H., & Balleine, B. W. (2003). The role of prelimbic cortex in instrumental conditioning. *Behavioural Brain Research*, 146(1-2), 145–157.
- De Araujo, I. E., & Simon, S. A. (2009). The gustatory cortex and multisensory integration. *International Journal of Obesity*, 33 Suppl 2, S34–43.
- De la Casa, G., & Lubow, R. E. (1995). Latent inhibition in conditioned taste aversion: the roles of stimulus frequency and duration and the amount of fluid ingested during preexposure. *Neurobiology of Learning and Memory*, 64(2), 125–132.
- De Luca, M. A. (2014). Habituation of the responsiveness of mesolimbic and mesocortical dopamine transmission to taste stimuli. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 8, 21.
- Dela Cruz, J. A. D., Coke, T., Karagiorgis, T., Sampson, C., Icaza-Cukali, D., Kest, K., ... Bodnar, R. J. (2015). c-Fos induction in mesotelencephalic dopamine pathway projection targets and dorsal striatum following oral intake of sugars and fats in rats. *Brain Research Bulletin*, 111, 9–19.
- Dias, R., & Honey, R. C. (2002). Involvement of the rat medial prefrontal cortex in novelty detection. *Behavioral Neuroscience*, 116(3), 498–503.
- Ding, H. K., Teixeira, C. M., & Frankland, P. W. (2008). Inactivation of the anterior cingulate cortex blocks expression of remote, but not recent, conditioned taste aversion memory. *Learning & Memory*, 15(5), 290–293.
- Do-Monte, F. H. M., Kincheski, G. C., Pavesi, E., Sordi, R., Assreuy, J., & Carobrez, A. P. (2010). Role of beta-adrenergic receptors in the ventromedial prefrontal cortex during contextual fear extinction in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 94(3), 318–328.
- Donoghue, J. P., & Wise, S. P. (1982). The motor cortex of the rat: cytoarchitecture and microstimulation mapping. *The Journal of Comparative Neurology*, 212(1), 76–88.

- Dudai, Y. (2004). *Memory from A to Z: Keywords, Concepts, and Beyond*. England; Oxford University Press.
- Ellenbroek, B. A., Knobbout, D. A., & Cools, A. R. (1997). The role of mesolimbic and nigrostriatal dopamine in latent inhibition as measured with the conditioned taste aversion paradigm. *Psychopharmacology*, 129(2), 112–120.
- Emson, P. C., Koob, G., & Iversen, L. L. (1977). Origin of dopaminergic afferents to the rat frontal cortex. *British Journal of Pharmacology*, 60(2), 270–271.
- Feenstra, M. G., Botterblom, M. H., & Mastebroek, S. (2000). Dopamine and noradrenaline efflux in the prefrontal cortex in the light and dark period: effects of novelty and handling and comparison to the nucleus accumbens. *Neuroscience*, 100(4), 741–748.
- Feenstra, M. G., Botterblom, M. H., & van Uum, J. F. (1995). Novelty-induced increase in dopamine release in the rat prefrontal cortex in vivo: inhibition by diazepam. *Neuroscience Letters*, 189(2), 81–84.
- Feenstra, M. G., Teske, G., Botterblom, M. H., & De Bruin, J. P. (1999). Dopamine and noradrenaline release in the prefrontal cortex of rats during classical aversive and appetitive conditioning to a contextual stimulus: interference by novelty effects. *Neuroscience Letters*, 272(3), 179–182.
- Feenstra, M. G., Vogel, M., Botterblom, M. H., Joosten, R. N., & de Bruin, J. P. (2001). Dopamine and noradrenaline efflux in the rat prefrontal cortex after classical aversive conditioning to an auditory cue. *The European Journal of Neuroscience*, 13(5), 1051–1054.
- Fenu, S., Rivas, E., & Di Chiara, G. (2009). Differential involvement of dopamine D1 receptors in morphine- and lithium-conditioned saccharin avoidance. *Physiology & Behavior*, 96(1), 73–77.
- Ferrer, J. M., Sanguinetti, A. M., Vives, F., & Mora, F. (1983). Effects of agonists and antagonists of D1 and D2 dopamine receptors on self-stimulation of the medial

prefrontal cortex in the rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 19(2), 211–217.

Ferry, B., & McGaugh, J. L. (1999). Clenbuterol administration into the basolateral amygdala post-training enhances retention in an inhibitory avoidance task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 72(1), 8–12.

Floresco, S. B., Magyar, O., Ghods-Sharifi, S., Vexelman, C., & Tse, M. T. L. (2006). Multiple dopamine receptor subtypes in the medial prefrontal cortex of the rat regulate set-shifting. *Neuropsychopharmacology*, 31(2), 297–309.

Fregoso, D. J. (2014). *Efecto del consumo crónico de sabores dulces sobre la formación de la memoria gustativa: función de la actividad colinérgica cortical*. (Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.).

Fuxe, K., Hökfelt, T., & Ungerstedt, U. (1970). Morphological and functional aspects of central monoamine neurons. *In International review of neurobiology*. (13), 93–126.

Gabbott, P. L. A., Warner, T. A., Jays, P. R. L., & Bacon, S. J. (2003). Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat. *Brain Research*, 993(1-2), 59–71.

Gabbott, P. L., Dickie, B. G., Vaid, R. R., Headlam, A. J., & Bacon, S. J. (1997). Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. *The Journal of Comparative Neurology*, 377(4), 465–499.

Gal-Ben-Ari, S., & Rosenblum, K. (2011). Molecular mechanisms underlying memory consolidation of taste information in the cortex. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 87, 1-15.

Gálosi, R., Hajnal, A., Petykó, Z., Hartmann, G., Karádi, Z., & Lénárd, L. (2015). The role of catecholamine innervation in the medial prefrontal cortex on the regulation of body weight and food intake. *Behavioural Brain Research*, 286, 318–327.

Gambarana, C., Masi, F., Leggio, B., Grappi, S., Nanni, G., Scheggi, S., Tagliamonte, A. (2003). Acquisition of a palatable-food-sustained appetitive behavior in satiated

rats is dependent on the dopaminergic response to this food in limbic areas. *Neuroscience*, 121(1), 179–187.

Garcia, J., Hankins, W. G., & Rusiniak, K. W. (1974). Behavioral regulation of the milieu interne in man and rat. *Science*, 185(4154), 824–831.

Gill, T. M., Castaneda, P. J., & Janak, P. H. (2010). Dissociable roles of the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens core in goal-directed actions for differential reward magnitude. *Cerebral Cortex*, 20(12), 2884–2899.

Gonzalez, María C, Kramar, C. P., Tomaiuolo, M., Katche, C., Weisstaub, N., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2014). Medial prefrontal cortex dopamine controls the persistent storage of aversive memories. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 408.

Gonzalez, Maria Carolina, Villar, M. E., Igaz, L. M., Viola, H., & Medina, J. H. (2015). Dorsal medial prefrontal cortex contributes to conditioned taste aversion memory consolidation and retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 126, 1–6.

Granon, S., Vidal, C., Thinus-Blanc, C., Changeux, J. P., & Poucet, B. (1994). Working memory, response selection, and effortful processing in rats with medial prefrontal lesions. *Behavioral Neuroscience*, 108(5), 883–891.

Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2010). Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *Journal of Neurochemistry*, 114(1), 226–236.

Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2012). Post-acquisition release of glutamate and norepinephrine in the amygdala is involved in taste-aversion memory consolidation. *Learning & Memory*, 19(6), 231–238.

Haggard, P., & de Boer, L. (2014). Oral somatosensory awareness. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 47, 469–484.

- Heidbreder, C. A., & Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(6), 555–579.
- Hernádi, I., Karádi, Z., Vígh, J., Petykó, Z., Egyed, R., Berta, B., & Lénárd, L. (2000). Alterations of conditioned taste aversion after microiontophoretically applied neurotoxins in the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Research Bulletin*, 53(6), 751–758.
- Holland, P. C., & Gallagher, M. (2003). Double dissociation of the effects of lesions of basolateral and central amygdala on conditioned stimulus-potentiated feeding and Pavlovian-instrumental transfer. *The European Journal of Neuroscience*, 17(8), 1680–1694.
- Holland, P. C., & Petrovich, G. D. (2005). A neural systems analysis of the potentiation of feeding by conditioned stimuli. *Physiology & Behavior*, 86(5), 747–761.
- Hoover, W. B., & Vertes, R. P. (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Structure & Function*, 212(2), 149–179.
- Horst, N. K., & Laubach, M. (2013). Reward-related activity in the medial prefrontal cortex is driven by consumption. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 56, 1-15
- Hsiao, S., & Smith, G. P. (1995). Raclopride reduces sucrose preference in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 50(1), 121–125.
- Izaki, Y., Hori, K., & Nomura, M. (1998). Dopamine and acetylcholine elevation on lever-press acquisition in rat prefrontal cortex. *Neuroscience Letters*, 258(1), 33–36.
- Jo, Y. S., Lee, J., & Mizumori, S. J. Y. (2013). Effects of prefrontal cortical inactivation on neural activity in the ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience*, 33(19), 8159–8171.
- Johnson, P. M., & Kenny, P. J. (2010). Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nature Neuroscience*, 13(5), 635–641.

- Kral, P. A., & St Omer, V. V. (1972). Beta-adrenergic receptor involvement in the mediation of learned taste aversions. *Psychopharmacologia*, 26(1), 79–83.
- Kubota, T., Hirota, K., Yoshida, H., Takahashi, S., Anzawa, N., Ohkawa, H., Matsuki, A. (1999). Effects of sedatives on noradrenaline release from the medial prefrontal cortex in rats. *Psychopharmacology*, 146(3), 335–338.
- Kutlu, M. G., Burke, D., Slade, S., Hall, B. J., Rose, J. E., & Levin, E. D. (2013). Role of insular cortex D₁ and D₂ dopamine receptors in nicotine self-administration in rats. *Behavioural Brain Research*, 256, 273–278.
- Lacroix, L., Spinelli, S., Heidbreder, C. A., & Feldon, J. (2000). Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. *Behavioral Neuroscience*, 114(6), 1119–1130.
- Land, B. B., Narayanan, N. S., Liu, R.-J., Gianessi, C. A., Brayton, C. E., Grimaldi, D. M., ... DiLeone, R. J. (2014). Medial prefrontal D1 dopamine neurons control food intake. *Nature Neuroscience*, 17(2), 248–253.
- Lanser, M. G., Ellenbroek, B. A., Zitman, F. G., Heeren, D. J., & Cools, A. R. (2001). The role of medial prefrontal cortical dopamine in spontaneous flexibility in the rat. *Behavioural Pharmacology*, 12(3), 163–171.
- Latagliata, E. C., Patrono, E., Puglisi-Allegra, S., & Ventura, R. (2010). Food seeking in spite of harmful consequences is under prefrontal cortical noradrenergic control. *BMC Neuroscience*, 11, 15, 1-15.
- Lifshitz, F., & Lifshitz, J. Z. (2014). Globesity: the root causes of the obesity epidemic in the USA and now worldwide. *Pediatric Endocrinology Reviews*, 12(1), 17–34.
- Lin, P. Y., Wang, S. P., Tai, M. Y., & Tsai, Y. F. (2010). Differential involvement of medial prefrontal cortex and basolateral amygdala extracellular signal-regulated kinase in extinction of conditioned taste aversion is dependent on different intervals of extinction following conditioning. *Neuroscience*, 171(1), 125–133.
- Lubow, R. E. (1973). Latent inhibition. *Psychological Bulletin*, 79(6), 398–407.

- Malkusz, D. C., Banakos, T., Mohamed, A., Vongwattanakit, T., Malkusz, G., Saeed, S., Bodnar, R. J. (2012). Dopamine signaling in the medial prefrontal cortex and amygdala is required for the acquisition of fructose-conditioned flavor preferences in rats. *Behavioural Brain Research*, 233(2), 500–507.
- Maroun, M., Kavushansky, A., Holmes, A., Wellman, C., & Motanis, H. (2012). Enhanced extinction of aversive memories by high-frequency stimulation of the rat infralimbic cortex. *Plos One*, 7(5), 1-8.
- Mason, S. T., & Fibiger, H. C. (1979). Noradrenaline and extinction of conditioned taste aversion in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, 25(2), 206–216.
- McGaughy, J., Ross, R. S., & Eichenbaum, H. (2008). Noradrenergic, but not cholinergic, deafferentation of prefrontal cortex impairs attentional set-shifting. *Neuroscience*, 153(1), 63–71.
- Mennella, J. A. (2014). Ontogeny of taste preferences: basic biology and implications for health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(3), 704S–711S.
- Mickley, G. A., Kenmuir, C. L., Yocom, A. M., Wellman, J. A., & Biada, J. M. (2005). A role for prefrontal cortex in the extinction of a conditioned taste aversion. *Brain Research*, 1051(1-2), 176–182.
- Miner, L. H., Schroeter, S., Blakely, R. D., & Sesack, S. R. (2003). Ultrastructural localization of the norepinephrine transporter in superficial and deep layers of the rat prelimbic prefrontal cortex and its spatial relationship to probable dopamine terminals. *The Journal of Comparative Neurology*, 466(4), 478–494.
- Mingote, S., de Bruin, J. P. C., & Feenstra, M. G. P. (2004). Noradrenaline and dopamine efflux in the prefrontal cortex in relation to appetitive classical conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 24(10), 2475–2480.
- Miranda, M I, LaLumiere, R. T., Buen, T. V., Bermudez-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (2003). Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. *The European Journal of Neuroscience*, 18(9), 2605–2610.

- Miranda, Maria Isabel. (2012). Taste and odor recognition memory: the emotional flavor of life. *Reviews in the Neurosciences*, 23(5-6), 481–499.
- Miranda, María Isabel. (2011). El sabor de los recuerdos: formación de la memoria gustativa. *Revista Digital Universitaria*, 3(12), 1-14.
- Miranda, Maria Isabel, Rodríguez-García, G., Reyes-López, J. V., Ferry, B., & Ferreira, G. (2008). Differential effects of beta-adrenergic receptor blockade in basolateral amygdala or insular cortex on incidental and associative taste learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1), 54–61.
- Mora, F., & Myers, R. D. (1977). Brain self-stimulation: direct evidence for the involvement of dopamine in the prefrontal cortex. *Science*, 197(4311), 1387–1389.
- Moscarello, J. M., Ben-Shahar, O., & Ettenberg, A. (2007). Dynamic interaction between medial prefrontal cortex and nucleus accumbens as a function of both motivational state and reinforcer magnitude: a c-Fos immunocytochemistry study. *Brain Research*, 1169, 69–76.
- Muir, J. L., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1996). The cerebral cortex of the rat and visual attentional function: dissociable effects of mediofrontal, cingulate, anterior dorsolateral, and parietal cortex lesions on a five-choice serial reaction time task. *Cerebral Cortex*, 6(3), 470–481.
- Nelson, A. J. D., Thur, K. E., Marsden, C. A., & Cassaday, H. J. (2010). Catecholaminergic depletion within the prelimbic medial prefrontal cortex enhances latent inhibition. *Neuroscience*, 170(1), 99–106.
- Newman, L. A., Darling, J., & McGaughy, J. (2008). Atomoxetine reverses attentional deficits produced by noradrenergic deafferentation of medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, 200(1), 39–50.
- Nicholas, A. P., Pieribone, V. A., & Hökfelt, T. (1993). Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience*, 56(4), 1023–1039.

- Noble, E. E., Hsu, T. M., Liang, J., & Kanoski, S. E. (2017). Early-life sugar consumption has long-term negative effects on memory function in male rats. *Nutritional Neuroscience*, 1–11.
- Nolfi, S., & Floreano, D. (1999). Learning and Evolution. *Autonomous Robots*, 7(1), 89–113.
- Núñez-Jaramillo, L., Ramírez-Lugo, L., Herrera-Morales, W., & Miranda, M. I. (2010). Taste memory formation: latest advances and challenges. *Behavioural Brain Research*, 207(2), 232–248.
- Orsini, C. A., Heshmati, S. C., Garman, T. S., Wall, S. C., Bizon, J. L., & Setlow, B. (2018). Contributions of medial prefrontal cortex to decision making involving risk of punishment. *Neuropharmacology*, 139, 205–216.
- Osorio-Gómez, D., Guzmán-Ramos, K., & Bermúdez-Rattoni, F. (2016). Differential involvement of glutamatergic and catecholaminergic activity within the amygdala during taste aversion retrieval on memory expression and updating. *Behavioural Brain Research*, 307, 120–125.
- Osorio-Gómez, D., Guzmán-Ramos, K., & Bermúdez-Rattoni, F. (2017). Memory trace reactivation and behavioral response during retrieval are differentially modulated by amygdalar glutamate receptors activity: interaction between amygdala and insular cortex. *Learning & Memory*, 24(1), 14–23.
- Paine, T. A., Asinof, S. K., Diehl, G. W., Frackman, A., & Leffler, J. (2013). Medial prefrontal cortex lesions impair decision-making on a rodent gambling task: reversal by D1 receptor antagonist administration. *Behavioural Brain Research*, 243, 247–254.
- Parabucki, A., & Netser, S. (2014). Origin of palatability coding in medial prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*, 34(12), 4121–4122.
- Parent, M. A., Amarante, L. M., Liu, B., Weikum, D., & Laubach, M. (2015). The medial prefrontal cortex is crucial for the maintenance of persistent licking and the expression of incentive contrast. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 9, 23, 1-14.

- Park, H.-Y., Park, K.-H., Kim, Y.-S., Shin, S.-G., Chung, M.-H., & Park, C.-W. (1996). Quantitative Autoradiography of Beta-1 and Beta-2 Adrenergic Receptor and Cellular Localization of mRNA for Beta-1 Adrenergic Receptor in Rat Brain. *Molecules and Cells*, 6(4), 456–462.
- Phillips, A. G., Ahn, S., & Floresco, S. B. (2004). Magnitude of dopamine release in medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on a delayed response task. *The Journal of Neuroscience*, 24(2), 547–553.
- Popkin, B. M., Adair, L. S., & Ng, S. W. (2012). Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition Reviews*, 70(1), 3–21.
- Prado-Alcalá, R. A., Medina, A. C., López, N. S., & Quirarte, G. L. (2012). Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Reviews in the Neurosciences*, 23(5-6), 501–508.
- Pritchett, C. E., & Hajnal, A. (2011). Obesogenic diets may differentially alter dopamine control of sucrose and fructose intake in rats. *Physiology & Behavior*, 104(1), 111–116.
- Ramírez, M., Alba, F., Vives, F., Mora, F., & Osorio, C. (1983). Monoamines and self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat. *Revista Española de Fisiología*, 39(4), 351–356.
- Ramírez-Lugo, L., Peñas-Rincón, A., Ángeles-Durán, S., & Sotres-Bayon, F. (2016). Choice behavior guided by learned, but not innate, taste aversion recruits the orbitofrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*, 36(41), 10574–10583.
- Ramos, B. P., & Arnsten, A. F. T. (2007). Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacology & Therapeutics*, 113(3), 523–536.
- Ramos, B. P., Colgan, L., Nou, E., Ovadia, S., Wilson, S. R., & Arnsten, A. F. T. (2005). The beta-1 adrenergic antagonist, betaxolol, improves working memory performance in rats and monkeys. *Biological Psychiatry*, 58(11), 894–900.

- Revusky, S. H., & Bedarf, E. W. (1967). Association of illness with prior ingestion of novel foods. *Science*, 155(3759), 219–220.
- Reyes-López, J., Nuñez-Jaramillo, L., Morán-Guel, E., & Miranda, M. I. (2010). Differential effects of beta-adrenergic receptor blockade in the medial prefrontal cortex during aversive and incidental taste memory formation. *Neuroscience*, 169(1), 195–202.
- Robertson, A., Laferrière, A., & Milner, P. M. (1982). Development of brain stimulation reward in the medial prefrontal cortex: facilitation by prior electrical stimulation of the sulcal prefrontal cortex. *Physiology & Behavior*, 28(5), 869–872.
- Rodríguez-García, G., & Miranda, M. I. (2016). Opposing Roles of Cholinergic and GABAergic Activity in the Insular Cortex and Nucleus Basalis Magnocellularis during Novel Recognition and Familiar Taste Memory Retrieval. *The Journal of Neuroscience*, 36(6), 1879–1889.
- Sahakian, B. J., Sarna, G. S., Kantamaneni, B. D., Jackson, A., Hutson, P. H., & Curzon, G. (1985). Association between learning and cortical catecholamines in non-drug-treated rats. *Psychopharmacology*, 86(3), 339–343.
- Santana, N., & Artigas, F. (2017). Laminar and cellular distribution of monoamine receptors in rat medial prefrontal cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11, 87, 1-13.
- Santana, N., Mengod, G., & Artigas, F. (2009). Quantitative analysis of the expression of dopamine D1 and D2 receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 19(4), 849–860.
- Sara, S. J., Dyon-Laurent, C., & Hervé, A. (1995). Novelty seeking behavior in the rat is dependent upon the integrity of the noradrenergic system. *Brain Research. Cognitive Brain Research*, 2(3), 181–187.
- Schalomon, P. M., Robertson, A. M., & Laferriere, A. (1994). Prefrontal cortex and the relative associability of taste and place cues in rats. *Behavioural Brain Research*, 65(1), 57–65.

- Sesack, S. R., Hawrylak, V. A., Matus, C., Guido, M. A., & Levey, A. I. (1998). Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *The Journal of Neuroscience*, 18(7), 2697–2708.
- Shehadi, K., & Maroun, M. (2013). Different effects of low frequency stimulation to infralimbic prefrontal cortex on extinction of aversive memories. *Brain Research*, 1490, 111–116.
- Sibley, D. R., & Monsma, F. J. (1992). Molecular biology of dopamine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13(2), 61–69.
- Sotres-Bayon, F., Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2006). Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex. *Biological Psychiatry*, 60(4), 329–336.
- Stefanik, M. T., Moussawi, K., Kupchik, Y. M., Smith, K. C., Miller, R. L., Huff, M. L., ... LaLumiere, R. T. (2013). Optogenetic inhibition of cocaine seeking in rats. *Addiction Biology*, 18(1), 50–53.
- Summers, R. J., Papaioannou, M., Harris, S., & Evans, B. A. (1995). Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat brain. *British Journal of Pharmacology*, 116(6), 2547–2548.
- Swinburn, B. A., Sacks, G., Hall, K. D., McPherson, K., Finegood, D. T., Moodie, M. L., & Gortmaker, S. L. (2011). The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*, 378(9793), 804–814.
- Thomas, T., Fang, Y., Yuriev, E., & Chalmers, D. K. (2016). Ligand binding pathways of clozapine and haloperidol in the dopamine D2 and D3 receptors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(2), 308–321.
- Touzani, K., Bodnar, R. J., & Sclafani, A. (2010). Acquisition of glucose-conditioned flavor preference requires the activation of dopamine D1-like receptors within the medial prefrontal cortex in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 94(2), 214–219.

- Van den Oever, M. C., Spijker, S., Li, K. W., Jiménez, C. R., Koya, E., Van der Schors, R. C., ... Smit, A. B. (2006). A proteomics approach to identify long-term molecular changes in rat medial prefrontal cortex resulting from sucrose self-administration. *Journal of Proteome Research*, 5(1), 147–154.
- Vera-Rivera, G., Miranda, M. I., Rangel-Hernandez, A., Badillo-Juarez, D., Fregoso-Urrutia, D., & Caynas-Rojas, S. (2018). Effects of chronic sugar and non-caloric sweetener consumption on taste preferences and new aversive learning. *Nutritional Neuroscience*. 4, 1-11.
- Vertes, R. P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, 51(1), 32–58.
- Vijayraghavan, S., Wang, M., Birnbaum, S. G., Williams, G. V., & Arnsten, A. F. T. (2007). Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory. *Nature Neuroscience*, 10(3), 376–384.
- Wang, Z., & Rebec, G. V. (1998). Neuroethological assessment of amphetamine-induced behavioral changes and their reversal by neuroleptics: focus on the amygdala and nucleus accumbens. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 22(5), 883–905.
- Weingarten, H. P. (1983). Conditioned cues elicit feeding in sated rats: a role for learning in meal initiation. *Science*, 220(4595), 431–433.
- Wilkinson, L. S., Humby, T., Killcross, A. S., Torres, E. M., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1998). Dissociations in dopamine release in medial prefrontal cortex and ventral striatum during the acquisition and extinction of classical aversive conditioning in the rat. *The European Journal of Neuroscience*, 10(3), 1019–1026.
- Woods, S. C. (2009). The control of food intake: behavioral versus molecular perspectives. *Cell Metabolism*, 9(6), 489–498.
- Yang, S.-T., Shi, Y., Wang, Q., Peng, J.-Y., & Li, B.-M. (2014). Neuronal representation of working memory in the medial prefrontal cortex of rats. *Molecular Brain*, 7(1), 61.

Zahrt, J., Taylor, J. R., Mathew, R. G., & Arnsten, A. F. (1997). Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *The Journal of Neuroscience*, 17(21), 8528–8535.

Zhou, H.-C., Sun, Y.-Y., Cai, W., He, X.-T., Yi, F., Li, B.-M., & Zhang, X.-H. (2013). Activation of β 2-adrenoceptor enhances synaptic potentiation and behavioral memory via cAMP-PKA signaling in the medial prefrontal cortex of rats. *Learning & Memory*, 20(5), 274–284.

11. ANEXOS

11. 1. ARTÍCULO PUBLICADO

ARTICLE IN PRESS

Behavioural Brain Research xxx (xxxx) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr



Research report

Differential function of medial prefrontal cortex catecholaminergic receptors after long-term sugar consumption

Seraid Caynas-Rojas^a, Gabriela Rodríguez-García^a, Ilse Delint-Ramírez^b, María Isabel Miranda^{a,*}

^a Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla, Querétaro, 76230, Mexico

^b Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 64460, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Taste memory
Dopamine
Beta-adrenergic receptors
Appetitive behavior
Latent inhibition
Extinction

ABSTRACT

The medial prefrontal cortex (mPFC) has reciprocal projections with many cerebral structures that are crucial in the control of food ingestion behavior and reward processing; Thus the mPFC has an important function in taste memory recognition. Previous results indicate that long-term consumption of sugar produces changes in appetitive re-learning and suggest that this could trigger an escalating consumption due to the inability to learn new negative consequences related to the same taste. Further evidence suggests that general identity reward value could be encoded in the mPFC. Therefore, the purpose of this study was to evaluate in rats whether after 21 days of sugar consumption the increase in sweet taste preference and latent inhibition of conditioned taste aversion (CTA) were affected differentially by pharmacological activation or blockage of dopaminergic and β -adrenergic receptors, in the mPFC, during CTA acquisition. Results showed that after long-term sugar exposure, mPFC activation of β -adrenergic receptors with clenbuterol delayed aversive memory extinction, but the blockade with propranolol or activation of dopaminergic receptors with apomorphine increased CTA latent inhibition and accelerated aversive memory extinction only after acute sugar exposure. Only dopaminergic blockade with haloperidol prevented sweet taste preference expression after long-term sugar consumption, increased CTA latent inhibition and accelerated extinction after acute sugar exposure. Taken together, the present data provide evidence that catecholaminergic receptors in the mPFC after prolonged sugar consumption underwent functional changes related to re-learning and new aversive taste learning.

1. Introduction

Preference for sweet food has evolutionary roots because most sweet tastes are related to a quick, high source of energy that is linked with a positive hedonic value. Even though taste recognition is frequently an instinctive response that forms part of an innate behavioral repertoire, it usually includes brain processes recalling past experiences associated with the same taste. The proper identification of foods includes the recollection of several characteristics associated with taste that help to determine the probability of survival and reproduction [1,2]. It is also undeniable that the associative learning processes underlying the consumption of palatable foods contribute to pathological overeating behavior [3]. In this regard, there is evidence in rodent models that long-term consumption of hedonic flavors, like sucrose, induces significant physiological changes as observed in some stages of obesity in humans [4].

Sweet tastes activate brain learning and reward circuitry through fast sensory inputs and slow post-ingestive consequences that modulate subsequent food intake and seeking behavior [5]. Particularly, one of

the structures that has an important function during taste memory recognition is the medial prefrontal cortex (mPFC). This cortex is an association area that has reciprocal projections with many cerebral structures that are crucial for controlling food ingestion behavior, taste processing and learning [6–11]. For example, there is evidence in rodents that the mPFC has a significant function in both the acquisition and the retrieval of conditioned taste aversion (CTA) [12–14] in which an aversion to a novel taste (CS) is acquired when the taste is followed by digestive malaise (unconditioned stimulus, US), resulting in an aversive taste memory. Specifically, the selective denervation of the catecholaminergic mPFC pathways prevents taste memory formation and its retrieval [14,15], and the noradrenergic receptors blockade in the mPFC prevents CTA acquisition [16]. Moreover, mPFC is also required during CTA extinction [12,13,17], altogether indicating an important role of mPFC and its catecholaminergic activity during memory formation and taste recall.

We recently found that after 14 days of *ad libitum* consumption of 10% sugared water, appetitive memory significantly increased in rats [18]. Based on diverse evidence, novel sweet tastes induce an appetitive

* Corresponding author.

E-mail address: mimndami@unam.mx (M.I. Miranda).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.06.009>

Received 29 January 2018; Received in revised form 7 June 2018; Accepted 8 June 2018
0166-4328/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

response, leading to a preference measured as an increase in consumption [1]. Accordingly, the continuous consumption of sugar increases the latent inhibition (LI) of CTA in proportion to the degree of exposure to the same taste. Since taste memory is formed during sweet taste “pre-exposure”, the aversive taste memory will not be as strong as a regular CTA induced without pre-exposure to the taste [19]. Thus, LI is the ability of a pre-exposed nonreinforced stimulus to inhibit later stimulus-response learning, and it enables the study of the proactive interference of prior appetitive learning in a new aversive association [20]. Accordingly, conditioned sugar aversion is significantly disrupted after one or more days of exposure, and the appetitive memory is more easily reestablished (e.g., acceleration of aversive memory extinction) [18]. The evidence indicates that long-term consumption of sugar produces changes in appetitive re-learning and suggests that long-term consumption of sugar could trigger an escalating consumption due to the inability to learn new negative consequences associated with the same taste. This effect highlights important aspects of reward-based decisions, where taste “value” cannot be properly updated after extensive familiarity. Previous work suggests that general identity reward value is encoded in the mPFC, demonstrating that humans and other animals with damage to the mPFC have difficulty changing their decisions [21–23]. However, the way in which brain activity in the mPFC changes to reflect the value after familiarization for specific rewards remains little understood.

Therefore, the purpose of this study was to evaluate whether the increase in preference and LI of CTA are affected differentially by pharmacological activation or blockage of catecholaminergic receptors in the mPFC after 21 days of sugar consumption. Injections in the mPFC of 1) clenbuterol, a β -adrenergic receptor agonist; 2) propranolol, a nonselective β -adrenergic receptor antagonist; 3) apomorphine, a dopaminergic receptor agonist; and 4) haloperidol, a dopaminergic receptor antagonist, were made during appetitive memory retrieval/CTA acquisition. Another objective was to evaluate whether prolonged exposure to sugar modifies the expression of dopamine receptors in the mPFC using western blot analysis.

2. Material & methods

2.1. Animals

A total of 171 male Wistar rats (270–310 g at the beginning of experiments, *Instituto de Neurobiología* breeding colony, Mexico) were used. Rats were housed individually and maintained at 23 °C; room lights went on at 9:00 p.m. and off at 9:00 a.m. All behavioral procedures were done between 10:00 a.m. and 4 p.m. during the dark phase of the cycle. Food and water were available *ad libitum* until the behavioral procedures began. The experiments were performed in accordance with the Mexican Laws for Animal Care (Norma Oficial Mexicana SAGARPA) and the relevant rules set forth by the Mexican Ministry of Health. The experimental protocol was approved by our institutional Animal Care Committee (*Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM*) and confirmed to be in compliance with the National Institutes of Health *Guidelines for the Care and Use of Laboratory Rats* (NIH publication 80-23, revised 1996).

2.2. Experimental procedures

Rats used for pharmacological mPFC manipulations were subjected to the same 28-day behavioral protocol (Fig. 1); starting with long-term consumption measurements, followed by 2 days of taste preference tests, and then CTA training, to evaluate the LI effect of long-term sugar consumption; finally, aversive memory and its extinction were evaluated for 3 days.

2.2.1. Long-term consumption

Rats were subjected to 21-day *ad libitum* consumption of 10% sugar

water solution (commercial sugar cane, Zulka*, composed mainly of 99% Sucrose; SUGAR group) or tap water (WATER-control group) as the only liquid. During the initial 14 days, body weight, food pellets and liquid consumed were measured every day; 600 ml bottles were refilled every two days and the same amount of food pellets (200 g, Lab Diet* 5001 Rodent Diet) was maintained daily after weighing.

2.2.2. Surgery

After 14 days of exposure to either water or sugar, on day 15 rats were anesthetized with i.p. ketamine (70 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg) and by stereotaxic surgery were implanted bilaterally with 12 mm, 23-gauge stainless-steel cannulae aimed 2 mm above the mPFC according to the Paxinos and Watson atlas [24] (antero-posterior + 3.0 mm, lateral \pm 0.5 mm from Bregma and ventral, -2.0 mm ventral from skull surface). Cannula guides were fixed to the skull with dental acrylic cement and anchored with two surgical screws placed in the skull. Stylets were inserted into the cannulae to prevent clogging; after surgery all rats received an oral dose of tramadol (0.01 mg/20 μ l); then, during the 7-day recovery period they were carefully checked for health issues. During these 7 days the control group was exposed to water while the sugar group had *ad libitum* access to both sugar and water, resulting in 21 days of exposure to sugar before the preference tests began (Fig. 1).

2.2.3. Taste preference test

On the evening of day 21, all rats were liquid-deprived for 18 h. During the next 2 days, the preference between sugar and water was tested (SUGAR PREFERENCES, Fig. 1). The preference test protocol was carried out by presenting, on opposite sides of the home cage lid, two graduated 50-ml tubes, one filled with water and another filled with 10% sugar solution. The tubes were switched every 2 min for 20 min. During each of the 2 preference trials (PREF 1–2), the graduated tubes were presented at the same time of day, and the progress of sugar preference over water was evaluated by measuring sugar consumption as the percentage of fluid consumed per day as follows: “% Sugar Consumption” = (sugar ml \times 100) / (sugar ml + water ml).

2.2.4. Drug injections

On day 24 (Fig. 1), animals were sub-divided into 6 groups and then bilaterally injected in the mPFC 20 min before CTA acquisition. Just before injections, patency stylets were removed, and 30-gauge injection needles were inserted into the stainless steel cannulae. The injection needles protruded 2.0 mm beyond the cannulae. The injectors were connected via polyethylene tubing to 10- μ l microsyringes driven by an injection pump (Carnegie Medicine, Stockholm, Sweden). Rats in each group received bilateral microinjections of the following: 1) 0.9% saline solution (SAL group). 2) Dimethyl sulfoxide at 10% in physiological saline (0.05 μ l/0.5 μ l; Sigma/Aldrich; VEH group); both saline and vehicle control groups were needed due to the different solubility of drugs. 3) Clenbuterol (10 ng/0.5 μ l; Sigma/Aldrich; CLEN group). 4) Propranolol (2.5 μ g/0.5 μ l; Sigma/Aldrich; PRO group). 5) Apomorphine (9 μ g/0.5 μ l; Sigma/Aldrich; APO group), or 6) haloperidol (0.5 μ g/0.5 μ l; Sigma/Aldrich; HALO group). Similar total volume of solution (0.5 μ l per injection locus) was delivered over 1 min in all groups. Injection needles were left inside cannulae for one additional minute to allow diffusion of the injected solution into the tissue and to minimize suction of the liquid back along the injection track. Agonist and antagonist doses were based on previous behavioral studies that demonstrated modulating effects of catecholaminergic receptor manipulations in learning tasks [16,25–29].

2.2.5. Conditioned taste aversion (CTA) and aversion memory extinction

On day 24 (Fig. 1), 20 min after mPFC injections, CTA acquisition was carried out presenting two graduated bottles, one filled with water and another filled with sugar solution, in the same way as the sugar preferences described above; then thirty minutes after the sugar drinking

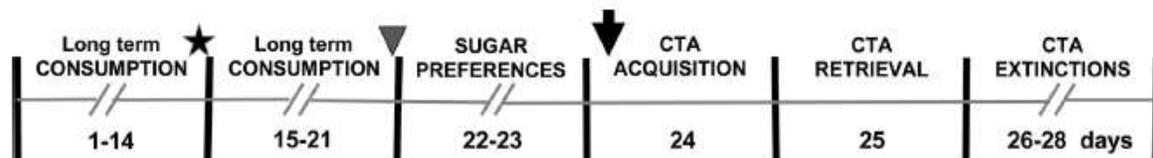


Fig. 1. Behavioral protocol; the star indicates cannulae implantation surgery on day 14. After 21 days of water or sugar *ad libitum*, rats were liquid deprived for 18 h before 2 taste preferences (arrowhead). All drug infusions were done 15 min before CTA acquisition (arrow). After retrieval day, 3 aversive memory extinction trials were performed.

period, rats were injected i.p. with LiCl (0.3 M, 127.2 mg/Kg body weight) to induce gastric malaise. One day later, aversive memory retrieval was tested (day 25, Fig. 1), presenting again for 20 min two graduated bottles, one filled with water and another with sugar solution but without an i.p. injection. The strength of CTA was considered as the reduction of sugar preference during retrieval compared to the preference during CTA acquisition ($\% \text{ Acquisition} = \% \text{ SUGAR consumption during retrieval} \times 100 / \% \text{ SUGAR consumption during acquisition day}$).

Finally, during the next 3 days, aversive memory extinction for sugar was evaluated in the same conditions as the retrieval (days 26–28, Fig. 1). Extinction was considered when consumption reached similar levels to those observed during the CTA acquisition ($\% \text{ Acquisition} = \% \text{ SUGAR consumption during extinction} \times 100 / \% \text{ SUGAR consumption during acquisition day}$).

2.3. Histology

One day after completing the third extinction trial, rats were deeply anaesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with 4% formaldehyde in 0.9% saline. The brains were placed in formaldehyde overnight and then transferred to a 30% buffered sucrose solution and stored at 4 °C. Coronal sections (50 μm thick) were cut through the area of interest, then stained with cresyl violet and inspected under stereoscopic light. Data from 40 rats with injector tips located outside the mPFC were excluded from the analysis (Fig. 2A).

2.4. Extraction of synaptosomes and cytosol/plasma membrane subcellular fractions: mPFC dissection

An independent cohort of 18 rats was used. After completion of long-term consumption (21 days), rats were sacrificed by decapitation and brains were removed and cut into 2 mm-thick coronal slices using a plastic matrix to dissect the mPFC bilaterally. The forceps minor of the corpus callosum were used as reference points, and the area between the forceps minor was excised (Fig. 2B). Tissue was homogenized in 500 μl of solution "A" (0.32 M sucrose, 0.5 mM CaCl_2 , 1 mM NaHCO_3 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM NaF, 2 mM Sodium orthovanadate, β -

glycerophosphate and complete protease inhibitor cocktail [Roche, Mannheim, Germany]). Following homogenization (twelve strokes for pinched-off synaptic endings) with a Teflon glass homogenizer, the sample was centrifuged for 10 min at $1000 \times g$ to remove the nucleus and cellular debris. After that, the supernatant was centrifuged for 15 min at $15,000 \times g$ to obtain the cytosol/plasma membrane fraction. The resulting pellet, containing synaptosomes, was resuspended in 1 ml of solution "B" (0.32 M sucrose, 1 mM NaHCO_3 , 1 mM NaF, 2 mM Sodium orthovanadate, β -glycerophosphate and complete protease inhibitor cocktail) and centrifuged in a discontinuous sucrose gradient, 1 ml each of 0.85, 1.0, and 1.2 M sucrose in solution B for 2 h at $82,500 \times g$. The band between 1.0 and 1.2 M containing the synaptosomes was carefully aspirated with a pipette.

2.5. Western blot analysis for DA receptors

Protein concentration was determined with the Bradford assay. Synaptosomes and cytosol/plasma membrane lysate containing 10 μg of protein were loaded from each subject and separated through 10% SDS-PAGE (TRIS 0.5 M pH 6.8, TRIS 1.5 M pH 8.8, 30% Acrylamide/Bis Solution, 10% SDS, TEMED, 10% APS; Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and then transferred onto a nitrocellulose membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked for 1 h in TBS-T (10 mM TRIS, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) containing 5% BSA and then incubated overnight at room temperature with primary antibodies from the following sources: Anti-Dopamine D1 Receptor (Calbiochem, Darmstadt, Germany) and Anti-Dopamine D2 receptor (Millipore, Billerica, MA, USA). The membranes were washed four times for 5 min in TBS-T and incubated for 1 h with HRP-conjugated secondary antibody (Millipore, Billerica, MA, USA). Proteins were detected by ECL and exposed to X-ray Hyperfilms, which were scanned and quantified densitometrically with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda).

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SigmaPlot software package (Systat Software, San Jose, CA). Data for each variable were

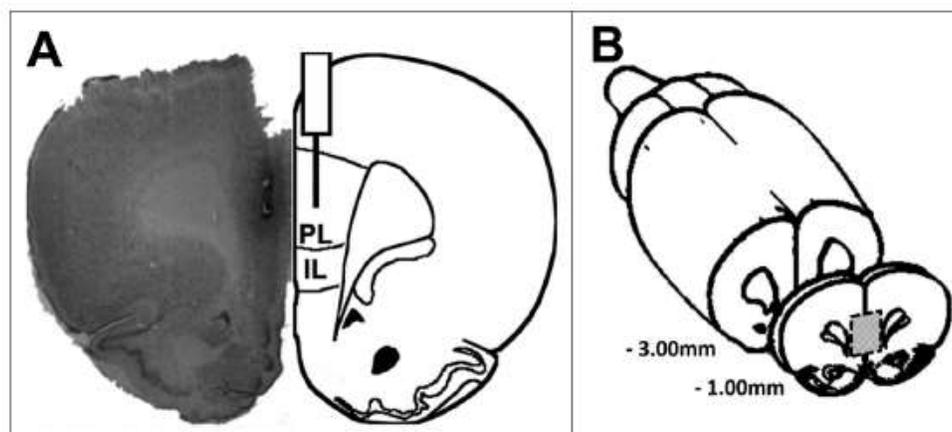


Fig. 2. A. Representative microphotograph and schematic drawing depicting the injection site in the mPFC (PL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex). B. Schematic representation of the mPFC anterior-caudal brain area; the gray square indicates the dissected region for extraction of synaptosomes and subcellular fractions of cytosol/plasma membranes for dopamine receptor quantification.

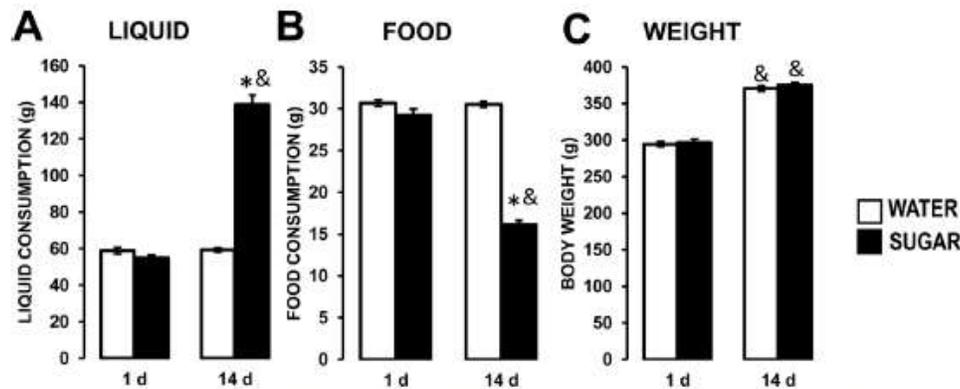


Fig. 3. Changes in liquid (A) and food (B) consumption as well as in body weight (C) during the first day (1 d) and after 14 days (14 d) of consumption. (* $P < 0.05$ vs WATER group; $\&$ $P < 0.05$ vs Day 1). WATER group $n = 65$, SUGAR group $n = 66$.

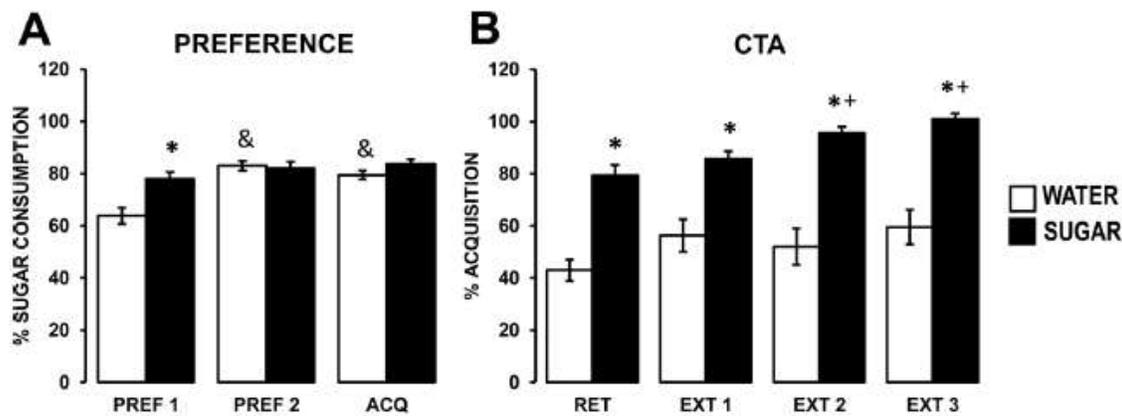


Fig. 4. A. Taste preference tests after 21 days of sugar or water consumption (Percentage of sugar consumption during PREF 1–2 and during CTA acquisition (ACQ); * $P < 0.05$ vs WATER; $\&$ $P < 0.05$ vs PREF 1). Rats were bilaterally injected in the mPFC with isotonic saline 15 min before liquid presentation during CTA acquisition. B. Conditioned taste aversion (CTA) for sugar. Percentage of sugar consumed with respect to CTA acquisition during CTA retrieval (RET) and 3 aversive memory extinction tests (EXT 1–3) (% Acquisition = % SUGAR consumption during retrieval or extinction \times 100 / % SUGAR consumption during acquisition day). WATER group $n = 10$, SUGAR group $n = 9$; * $P < 0.05$ vs. WATER; + $P < 0.05$ vs WATER during RET.

presented as mean \pm standard error (SE). Statistical differences were evaluated using factorial measures analysis of variance (two-way ANOVA) of body weight, food and liquid intake on the first day and after 14 days of sweetener consumption. Also, two-way ANOVAs were carried out to evaluate group and treatment differences in percentage of sugar consumption during preference trials, acquisition, aversive memory retrieval, and between aversive memory extinction trials. They were followed by pair-wise multiple comparison procedures (Bonferroni *post-hoc* test) when appropriate. Differences in protein expression between WATER and SUGAR groups were evaluated by unpaired *t*-test. P values < 0.05 were considered significant; all data values are expressed as means \pm standard errors of the mean (SEMs).

3. Results

3.1. Long-term sugar consumption increases sweet liquid intake and reduces food ingestion

Differences in liquid, food consumption or body weight, between the first day and 14 days after consumption are shown in Fig. 3. A two-way ANOVA of liquid consumption revealed significant effect of treatment liquid ($F_{(1,129)} = 138.263$, $P < 0.01$), and effect of liquid exposure days ($F_{(1,129)} = 302.781$, $P < 0.01$) as well interaction between these two factors ($F_{(1,129)} = 297.789$, $P < 0.01$). Bonferroni *post-hoc* analysis revealed a significant difference in water and sugar consumption between day 1 and day 14 in the SUGAR group ($P < 0.05$), but not in the WATER group ($P > 0.05$). Also, the SUGAR

group consumed a large amount of liquid on day 14 compared with the WATER group ($P < 0.05$; Fig. 3A). Furthermore, significant differences were found regarding food consumption (Fig. 3B; effect of treatment liquid: $F_{(1,129)} = 231.796$, $P < 0.01$; effect of liquid exposure days: $F_{(1,129)} = 210.590$, $P < 0.01$; interaction: $F_{(1,129)} = 200.135$, $P < 0.01$). The SUGAR group significantly reduced pellet consumption on day 14 compared with day 1, as well as compared with the WATER group on day 14 (Bonferroni = $P < 0.05$). However, the WATER control group maintained the same food consumption from days 1 to 14 (Fig. 3B). Conversely, any significant differences in body weight were observed between groups after, since both groups increased body weight after 14 days (Fig. 3C; effect of treatment liquid: $F_{(1,129)} = 0.347$, $P = 0.557$; effect of liquid exposure days: $F_{(1,129)} = 1782.503$, $P < 0.01$; interaction: $F_{(1,129)} = 0.490$, $P = 0.485$; Bonferroni = $P < 0.05$).

3.2. Long-term sugar consumption increases sweet taste preference and LI of CTA and accelerates aversive memory extinction

Taste preference trials were carried out after 14 days of sugar or water consumption and 18 h of restricted access to liquid (Days 22–23, Fig. 1). A two-way ANOVA of sugar consumption percentage (over water) during 2 preference tests and CTA acquisition (Fig. 4A) revealed a significant effect of treatment liquid ($F_{(1,34)} = 7.788$, $P < 0.01$), as well as between liquid exposure days ($F_{(2,34)} = 16.487$, $P < 0.01$) and significant interaction between these two factors ($F_{(2,34)} = 5.805$, $P < 0.01$). Bonferroni *post-hoc* analysis revealed a significant difference

between SUGAR and WATER groups during the first preference test ($P < 0.05$); however, during the second preference and acquisition, both groups showed similar sugar consumptions ($P > 0.05$) since there was a significant increase in the percentage of sugar consumption in the WATER group during preference day 2 and acquisition compared with day 1 ($P < 0.05$) (Fig. 4A).

During CTA retrieval and 3 days of aversive memory extinction (Fig. 4B), a two-way ANOVA of acquisition percentage revealed a significant effect of treatment liquid ($F_{(1,51)} = 34.793$, $P < 0.01$), as well as between liquid exposure days ($F_{(3,51)} = 14.990$, $P < 0.01$) but no significant interaction ($F_{(3, 51)} = 2.421$, $P = 0.077$). Differences between groups during memory retrieval (RET), as well as during the 3 extinction days were found ($P < 0.05$, Bonferroni *post-hoc* analysis). The SUGAR group during retrieval and extinctions showed a significantly higher consumption, reaching similar percentage consumptions as observed during the acquisition day. This result indicates a higher LI of CTA after 21 days of sugar consumption, as well as a significant extinction acceleration of the small aversion memory observed during retrieval day and during the first extinction day, since the SUGAR group significantly increased consumption during extinction 2 and 3, compared with retrieval day ($P < 0.05$, Fig. 4B).

3.3. Activation of β -adrenergic receptors in the mPFC during CTA induces a mild effect on the strength of aversive memory formation

The effects of clenbuterol injections in the mPFC before CTA acquisition, on rats with long-term exposure to sugar (S) or water (W), are shown in Fig. 5. A two-way ANOVA revealed a significant effect of treatment ($F_{(3,234)} = 11.628$, $P < 0.01$), as well as between days ($F_{(6,234)} = 25.291$, $P < 0.01$) and significant interaction ($F_{(18, 234)} = 3.292$, $P < 0.01$). As expected, rats with long-term exposure to sugar (S-VEH and S-CLEN groups) had significantly higher consumption during first preference (Bonferroni *post-hoc* analysis; $P < 0.05$). The S-VEH group also showed a strong LI of CTA and did not decrease sugar consumption during retrieval and during any of the 3 extinction trials. The S-VEH group consumption significantly differed from that of control rats (W-VEH) during retention and extinction trials ($P < 0.05$). The control W-VEH group showed a significant decrement of sugar consumption during retention and 3 extinction trials compared with the consumption during acquisition ($P < 0.05$). This result indicates that acute exposure to sugar (20 min/2 preference tests) did not induce a significant LI of CTA, and an aversion memory remained after 3 extinction trials. Furthermore, *post-hoc* analysis revealed a non-significant effect of clenbuterol injection during acquisition, retrieval, and extinctions 1 and

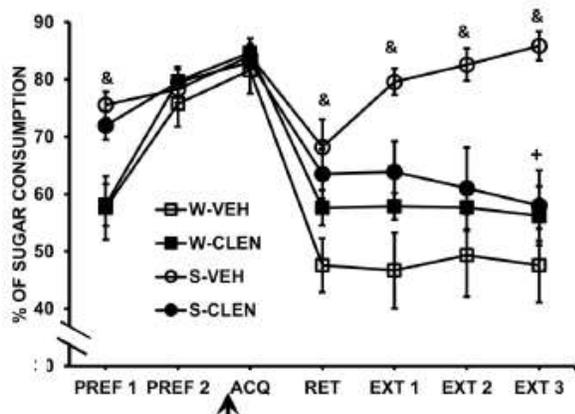


Fig. 5. Effects of clenbuterol injections before CTA acquisition (arrow) on percentage of sugar consumption during CTA acquisition (ACQ), aversive memory retrieval (RET) and memory extinction tests (EXT 1–3). (WATER-VEH $n = 10$, WATER-CLEN $n = 12$, SUGAR-VEH $n = 10$; SUGAR-CLEN $n = 11$; + $P < 0.05$ vs. SUGAR-VEH; & vs. WATER-VEH).

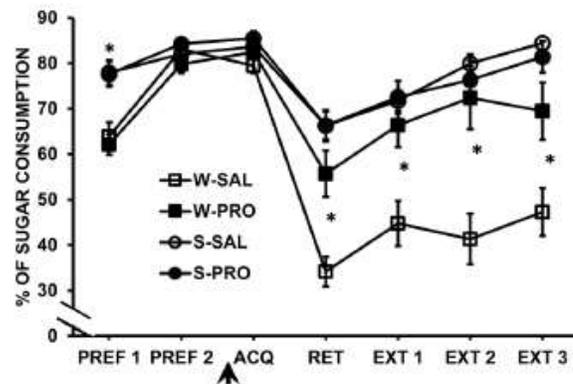


Fig. 6. Effects of propranolol injections before CTA acquisition (arrow) on percentage of sugar consumption during CTA acquisition (ACQ), aversive memory retrieval (RET) and memory extinction tests (EXT 1–3). (WATER-SAL $n = 10$, WATER-PROP $n = 11$, SUGAR-SAL $n = 9$; SUGAR-PROP $n = 10$; * $P < 0.05$ vs. WATER-SAL).

2 between groups; however, during extinction 3 there was a significant decrease in consumption in the groups subjected to long-term exposure to sugar and injected with clenbuterol (S-CLEN) compared with the S-VEH group ($P < 0.05$; Fig. 5). Altogether, these results indicate that agonism of β -adrenergic receptors in the mPFC during CTA acquisition induces a mild effect on the strength of aversive memory, since clenbuterol injections delayed CTA extinction (i.e., retarded sugar preference recovery) after long-term exposure to sugar (Fig. 5).

3.4. Blockade of β -adrenergic receptors in the mPFC during CTA acquisition increases LI of CTA and accelerates CTA extinction only after short-term sugar exposure

The effects of propranolol mPFC injections before CTA acquisition on rats with long-term exposure to sugar (S) or water (W) are shown in Fig. 6. A two-way ANOVA revealed a significant effect of treatment ($F_{(3,216)} = 14.917$, $P < 0.01$), as well as between days ($F_{(6,216)} = 45.717$, $P < 0.01$) and significant interaction ($F_{(18, 216)} = 7.182$, $P < 0.01$). As expected, rats with long-term exposure to sugar (S-SAL and S-PROP groups) had significantly higher consumption during first preference (Bonferroni *post-hoc* analysis; $P < 0.05$). The control W-SAL group showed a significant decrement of sugar consumption during retention (RET) and the 3 extinction trials compared with the consumption during acquisition ($P < 0.05$). However, *post-hoc* analysis also revealed a significantly higher consumption of sugar in the W-PRO group during retention and the 3 extinction trials compared with the control W-SAL group ($P < 0.05$). During and after CTA acquisition, non-significant differences between long-term sugar groups, S-SAL and S-PRO, and the W-PRO group were observed, indicating that propranolol mPFC injections increase LI of CTA and accelerate CTA extinction after 2 days of acute sugar exposure (20 min/2 preference tests) but have no effect on LI after long-term sugar exposure.

3.5. Activation of dopaminergic receptors in mPFC during CTA acquisition increases LI of CTA and accelerates CTA extinction only after short-term exposure to sugar

The effects of apomorphine mPFC injections before CTA acquisition, on rats with long-term exposure to sugar (S) or water (W), are shown in Fig. 7. A Two-way ANOVA revealed a significant effect of treatment ($F_{(3,234)} = 15.848$, $P < 0.01$), as well as between days ($F_{(6,234)} = 19.049$, $P < 0.01$) and significant interaction ($F_{(18, 234)} = 4.773$, $P < 0.01$). As expected, S-VEH and S-APO groups had significantly higher consumption of sugar during the first preference (Bonferroni *post-hoc* analysis; $P < 0.05$). The control W-VEH group

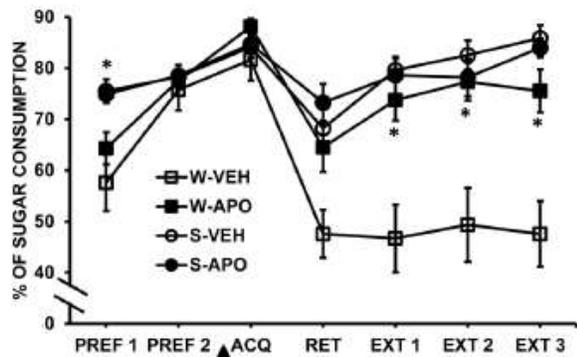


Fig. 7. Effects of apomorphine injections before CTA acquisition (arrow) on percentage of sugar consumption during CTA acquisition (ACQ), aversive memory retrieval (RET) and memory extinction tests (EXT 1–3). (WATER-VEH $n = 10$, WATER-APOM $n = 12$, SUGAR-VEH $n = 10$; SUGAR-APOM $n = 11$; * $P < 0.05$ vs WATER-VEH).

showed a significant decrease in sugar consumption during retention (RET) and 3 extinction trials compared with the consumption during acquisition ($P < 0.05$). However, *post-hoc* analysis revealed significantly higher consumption of sugar in the W-APO group during the 3 extinction trials compared with the control W-VEH group ($P < 0.05$). During and after CTA acquisition, non-significant differences between long-term sugar groups, S-VEH and S-APO, and the W-APO group were observed, indicating that apomorphine mPFC injections increase LI of CTA to similar levels as observed after long-term sugar consumption, as well as accelerate CTA extinction after 2 days of acute sugar exposure (20 min/2 preference tests), but have no effect on LI after long-term sugar exposure.

3.6. The blockade of dopaminergic receptors in the mPFC prevents preference for sweet taste after long-term sugar consumption and accelerates CTA extinction after acute sugar exposure

The effects of haloperidol mPFC injections before CTA acquisition, on rats with long-term exposure to sugar (S) or water (W), are shown in Fig. 8. A two-way ANOVA revealed a significant effect of treatment ($F_{(3,246)} = 12.457$, $P < 0.01$), as well as between days ($F_{(6,246)} = 7.528$, $P < 0.01$) and significant interaction ($F_{(18,246)} = 5.338$, $P < 0.01$). As expected, rats subjected to long-term exposure to sugar (S-VEH and S-HALO groups) had significantly higher consumption during the first preference (Bonferroni *post-hoc* analysis; $P < 0.05$). The control W-VEH group showed a significant decrement

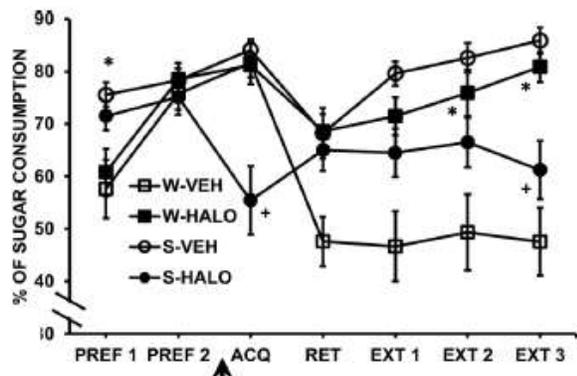


Fig. 8. Effects of haloperidol injections before CTA acquisition (arrow) on percentage of sugar consumption during CTA acquisition (ACQ), aversive memory retrieval (RET) and memory extinction tests (EXT 1–3). (WATER-VEH $n = 10$, WATER-HALO $n = 11$, SUGAR-VEH $n = 10$; SUGAR-HALO $n = 14$; * $P < 0.05$ vs WATER-VEH; + $P < 0.05$ vs SUGAR-VEH).

of sugar consumption during retention (RET) and 3 extinction trials compared with the consumption during acquisition ($P < 0.05$). However, *post-hoc* analysis revealed a higher consumption of sugar in the W-HALO group during extinctions 2 and 3 compared with the control W-VEH group ($P < 0.05$). Interestingly, a significant difference between long-term sugar groups was found during acquisition day; the S-HALO group had significantly less consumption than the control S-VEH group ($P < 0.05$), indicating an effect of haloperidol on sugar preference observed during the acquisition trial in rats subjected to long-term exposure to sugar. Also, the S-HALO group showed a significantly lower consumption during extinction 3, indicating a significant delay in sugar preference recuperation compared with the S-VEH group. Altogether, these results indicate that antagonism of dopaminergic receptors in the mPFC during CTA acquisition has an opposite effect depending on the duration of sugar exposure. sugar preference increases (i.e., CTA extinction accelerates) after acute sugar exposure and taste preference expression decreases after long-term sugar consumption.

3.7. Long-term sugar consumption increases dopamine D2 receptors in mPFC cytosol/plasma membranes

Given that manipulations of mPFC dopamine receptors reduced sugar preference after long-term consumption, and that previous evidence indicates that sugar exposure alters dopamine receptor expression in the striatum [30], we also evaluated whether long-term sugar consumption induces changes in D1 and D2 dopamine receptor expression in the mPFC. Receptor expression was measured in both the isolated synaptic terminals and the cytosol/plasma membrane subcellular fraction. The results showed no significant changes in the expression of D1 (Fig. 9A) or D2 (Fig. 9B) synaptic receptors, and no changes in D1 receptor expression (Fig. 9C) in cytosol/plasma membranes after long-term sugar consumption. However, a significant increase of D2 receptors in the cytosol/plasma membrane subcellular fraction ($t(16) = -2.589$; $P = 0.020$; Fig. 9D) was observed after long-term sugar consumption.

4. Discussion

The findings in the present research indicate that long-term sugar consumption produces changes in appetitive and aversive learning. These changes are differentially affected by pharmacological manipulations of β -adrenergic and dopaminergic receptors in the mPFC. First, we replicated previous results that demonstrate that long-term consumption of sugar increases sweet liquid consumption and reduces food intake [18]. Sugar solution intake increased from the first day and throughout the 14 days of measurements; although food intake decreased significantly in rats exposed to sugar, body weight gain rate observed between rats that drank sugar or water did not significantly change. This similar body weight increment indicates that the behavioral and pharmacological effects reported here, in young adult rats, are not influenced by other important variables related to excessive body weight, which could complicate the interpretation of the present results.

Second, we found that 21 days of sugar exposure induced a significant preference for sugar and increased LI of CTA, reflected as a significant deficit in the conditioned sugar aversion, while also accelerating the appetitive response after conditioning (e.g., accelerating sugar preference during extinction trials). Long-term sugar exposure induced a greater preference for sweetness over water, which indicates a robust appetitive taste memory formation due to high familiarity. Although an acute exposure to sugar (e.g., 20 min/day) was sufficient to induce a significant preference for sugar, only longer exposure (21 days) was able to produce a significant increment in the LI of CTA and a rapid recovery of sugar preference after the aversive association (e.g., acceleration of extinction); indicating that prolonged sugar consumption causes a proactive interference in the CTA depending on the length

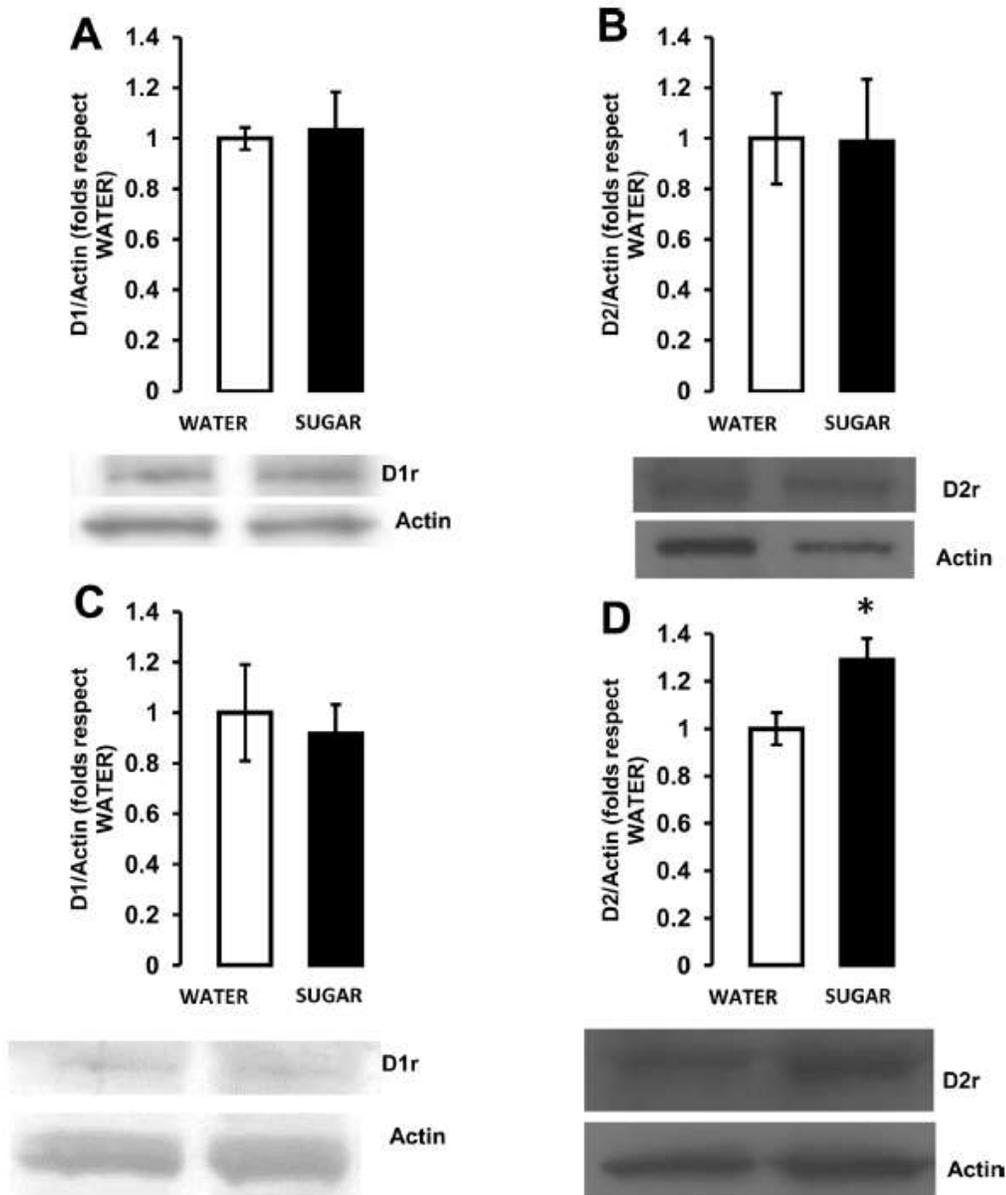


Fig. 9. Optical density of blot of D1 (A and C) and D2 (B and D) receptors divided by the optical density of its corresponding actin blots as load control and normalized as folds with respect to the WATER control group (Y-axis units: D1/Actin [folds respect WATER]). A) Expression of D1 receptors in synaptosomes. B) Expression of D2 receptors in synaptosomes. C) Expression of D1 receptors in cytosol/plasma membranes. D) Expression of D2 receptors in cytosol/plasma membranes. Images below the graphs are representative blots of dopamine D1r and D2r receptors and actin for both WATER (control) group $n = 9$; and SUGAR group $n = 9$. * = $P < 0.05$ vs WATER.

of stimulus pre-exposition, as reported previously [19]. The significant increase in LI of CTA after long-term sugar consumption could be related to the inability to learn new negative consequences associated with sweets flavors; and it is congruent with previous evidence showing that rats persist in seeking palatable food even when there is a risk of receiving an electric shock [31,32], which suggests that after long-term consumption of palatable food, a pattern of maladaptive behavior could develop, characterized by persisting in the consumption despite the adverse effects after ingestion.

The third important finding was the differential effect of pharmacological activation or blockage of catecholaminergic receptors in the mPFC after long-term sugar consumption. We found that activation of β -adrenergic receptors, by injecting clenbuterol in the mPFC during CTA acquisition, did not affect the preference for sugar expression and had a slight, but not significant, effect on LI of CTA induced by acute or long-term sugar exposure. However, clenbuterol significantly prevented the rapid reinstatement of sugar preference observed after CTA retrieval in rats subjected to long-term exposure to sugar, causing a significantly lower consumption of sugar during the extinction sessions (Fig. 5). This result concurs with other evidence showing that administration of

clenbuterol in the mPFC improves retention of the aversive memory after fear conditioning [33], and with the evidence that denbuterol injections into the amygdala improve aversive memory retention of the inhibitory avoidance [25]. Particularly, the dose of clenbuterol used in this experiment affected the appetitive response observed after 3 days of extinction trials, of the attenuated aversive conditioning by the prior exposure to sugar for 21 days, but not after acute exposure, suggesting that β -adrenergic receptors respond incrementally after prolonged sugar consumption. Moreover, the blockade of β -adrenergic receptors with propranolol in the mPFC during CTA acquisition significantly increased the LI and accelerated the aversive memory extinction observed after acute sugar exposure; however, the same dose of propranolol did not cause changes in LI of CTA or in the rate of sugar preference during extinction trials, observed after 21 days of sugar consumption. This result agrees with the evidence that injections of propranolol in the mPFC prevent CTA acquisition of novel tastes like saccharin [16]. These data also indicate that noradrenergic activity is required in the mPFC during CTA when sugar is novel or familiar (acute presentations for two days). However, after prolonged sugar consumption and high familiarity (more than 21 days), the β -adrenergic receptor function was

unaltered during CTA acquisition, since the same dose of propranolol did not affect the LI or any preference increment induced by prolonged sugar exposure. In addition, similar effects were observed after propranolol blockade and apomorphine activation in the mPFC during CTA acquisition. Injections of apomorphine increased LI of CTA and accelerated CTA extinction only after acute sugar exposure. This is consistent with other results showing that apomorphine in the mPFC increases the degree of interference produced by pre-exposure to the conditioned stimulus during the conditioned emotional response protocol; i.e., it increases the LI of suppression of lever pressing for food in the presence of a light cue conditioned to a foot shock [26]. Overall, this evidence suggests that dopaminergic activation in the mPFC could increase the LI of different conditionings. The present results show that LI is significantly attenuated after prolonged consumption of sugar because rats that consumed sugar for 21 days did not express any change in consumption, despite being injected with the same apomorphine dose, which significantly altered both the CTA and the memory extinction after acute sugar intake.

Interestingly, we found that blockade of dopaminergic receptors with haloperidol in the mPFC, during CTA acquisition, was the only treatment that generated changes in sugar preference expression after long-term consumption. After prolonged sugar consumption, haloperidol injections just before sugar consumption significantly decreased sugar preference observed during CTA acquisition but did not alter the LI of CTA the following day or the degree of sugar preference until the third extinction, when sugar preference was significantly diminished, suggesting that blockade of dopaminergic receptors reduces sugar preference after long-term consumption. Nevertheless, a similar haloperidol dose after acute sugar exposure, increases sugar preference during LI and aversive memory extinction process (Fig. 8).

Previous reports have shown that systemic administration of dopaminergic antagonists reduces taste preference [34]; however, to this day there is no evidence of the specific dopaminergic activity function in the cortex. The present results show that dopaminergic function is necessary during familiar taste re-learning, and that after long-term sugar consumption, the function of dopaminergic receptors is altered significantly during the recognition of a highly familiar sweet taste and during the appetitive re-learning. These changes in appetitive re-learning differentially involve dopaminergic activity and suggest that long-term consumption of sugar could trigger an escalating consumption due to the inability to learn new negative consequences related to the same taste, as a result of deficits in the dopaminergic system.

Finally, our results indicate that long-term sugar consumption increases dopamine D2 receptors in mPFC cytosol/plasma membranes and agree with the fact that consumption of sweet food increases extracellular dopamine in the mPFC [35–37] and with the discovery of agonist-induced relocation of D2-dopamine receptors [38]. Moreover, the increase of D2 receptors in the cytosol/plasma membranes extracted from the striatum of rats injected with a single dose of amphetamine has been reported [39], and consumption of palatable foods modifies the expression of dopaminergic receptors in the striate [30,40], suggesting that D2 receptor increments are related to rewarding stimuli and the dopaminergic increase in the mPFC. The significant increase in the number of dopaminergic receptors in the cytosol/plasma membranes extracted from the mPFC of rats highly familiarized with sugar, contributes to the hypothesis that the mPFC is among the structures responsible for inhibitory control and habit formation and is also a necessary structure for appetitive and aversive learning [41–43]. Furthermore, the present data are related to previous evidence that correlates alterations in the dopaminergic and noradrenergic systems with pathological consumption of palatable foods [30,44–49]. However, further research is necessary to explain the causes of this dopaminergic receptor increase and its functional implications.

Excessive consumption and intake escalation of sugar have been associated with some signs of addiction [50]. Our results show that

long-term sugar consumption induced an intake escalation that produced a persistent preference for sugar, even if negative consequences were associated with the taste, a hallmark of addiction symptoms [31,32]. This non-flexible behavior after prolonged sugar consumption could be considered as an alteration in learning processes that could be also related to deficits in spatial learning and memory after consumption of a high-carbohydrate diet [51]. Here we found a proactive interference for a new aversive memory (CTA) due to low or high familiarity. This interference could be differentially modulated by the activation of β -adrenergic receptors and a blockade of dopaminergic receptors, indicating the importance of catecholaminergic neurotransmission in the mPFC during memory formation and highlighting the differences between minor or enhanced learning [52,53]. In particular, sub-regions of the prefrontal cortex and their projections to other brain regions have been shown to differentially modulate drug-seeking and extinction behavior. There is a growing body of evidence showing that manipulation of neuronal plasticity can alter extinction learning and could be related to drug-seeking behavior reactivation during addiction relapse [54]. Altogether, the present results provide evidence of functional changes in catecholaminergic receptors after prolonged sugar consumption, indicating that high sugar familiarity modifies the function and expression of dopaminergic receptors in the mPFC, which are associated with appetitive re-learning and new aversive learning.

Funding

Seraid Caynas is a doctoral student from *Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas*, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 375146 from CONACYT. This work was supported by PAPIITIN204615, IN201018 and CONACyT252379.

Acknowledgments

We thank Shaun Harris and Jessica Gonzalez-Norris for editing the final version of this manuscript. We also thank Ángela Gabriela Vera-Rivera, José Alejandro Rangel-Hernández, Leonor Casanova, Lourdes Ayala and Martín García for their technical assistance.

References

- [1] L. Núñez-Jammillo, L. Ramírez-Lugo, W. Herrera-Morales, M.I. Miranda, Taste memory formation: latest advances and challenges, *Behav. Brain Res.* 207 (2) (2010) 232–248.
- [2] J. Bures, F. Bermudez-Rattoni, T. Yamamoto, *Conditioned Taste Aversion*, Oxford University Press, 1998.
- [3] G.K.W. Frank, Altered brain reward circuits in eating disorders: chicken or egg? *Curr. Psychiatry Rep.* 15 (10) (2013) 396.
- [4] N. Jurdak, R.B. Kanarek, Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats, *Physiol. Behav.* 96 (1) (2009) 1–5.
- [5] A.J. Tulloch, S. Murray, R. Vaicekonyte, N.M. Avena, Neural responses to macronutrients: hedonic and homeostatic mechanisms, *Gastroenterology* 148 (6) (2015) 1205–1218.
- [6] R.P. Vertes, Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat, *Synapse* 51 (1) (2004) 32–58.
- [7] P.L.A. Gabbott, T.A. Warner, P.R.L. Jays, S.J. Bacon, Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat, *Brain Res.* 993 (1–2) (2003) 59–71.
- [8] A. Parabucki, S. Netser, Origin of palatability coding in medial prefrontal cortex, *J. Neurosci.* 34 (12) (2014) 4121–4122.
- [9] N.K. Horst, M. Laubach, Reward-related activity in the medial prefrontal cortex is driven by consumption, *Front. Neurosci.* 7 (2013) 56.
- [10] J.A.D. Dela Cruz, T. Coke, T. Kamgiorgis, C. Sampson, D. Icaza-Cukali, K. Kest, R. Ranaldi, R.J. Bodnar, c-Fos induction in mesotelencephalic dopamine pathway projection targets and dorsal striatum following oral intake of sugars and fats in rats, *Brain Res. Bull.* 111 (2015) 9–19.
- [11] R. Gálosi, A. Hajnal, Z. Petykó, G. Hartmann, Z. Karádi, L. Lénárd, The role of catecholamine innervation in the medial prefrontal cortex on the regulation of body weight and food intake, *Behav. Brain Res.* 286 (2015) 318–327.
- [12] G.A. Mickley, C.L. Kenmuir, A.M. Yocom, J.A. Wellman, J.M. Biada, A role for prefrontal cortex in the extinction of a conditioned taste aversion, *Brain Res.* 1051 (1–2) (2005) 176–182.
- [13] M.C. Gonzalez, M.E. Villar, L.M. Igaz, H. Viola, J.H. Medina, Dorsal medial prefrontal cortex contributes to conditioned taste aversion memory consolidation and

- retrieval, *Neurobiol. Learn. Mem.* 126 (2015) 1–6.
- [14] I. Hernádi, Z. Karádi, J. Vigh, Z. Petykó, R. Egyed, B. Berta, L. Lénárd, Alterations of conditioned taste aversion after microiontophoretically applied neurotoxins in the medial prefrontal cortex of the rat, *Brain Res. Bull.* 53 (6) (2000) 751–758.
- [15] R.M. Sullivan, M.M. Dufresne, D. Siontas, S. Chehab, J. Townsend, F. Laplante, Mesocortical dopamine depletion and anxiety-related behavior in the rat: sex and hemisphere differences, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 54 (2014) 59–66.
- [16] J. Reyes-López, L. Nuñez-Jaramillo, E. Morán-Guel, M.I. Miranda, Differential effects of beta-adrenergic receptor blockade in the medial prefrontal cortex during aversive and incidental taste memory formation, *Neuroscience* 169 (1) (2010) 195–202.
- [17] M. Maroun, A. Kavushansky, A. Holmes, C. Wellman, H. Motanis, Enhanced extinction of aversive memories by high-frequency stimulation of the rat infralimbic cortex, *PLoS One* 7 (5) (2012) p. e35853.
- [18] G. Vera-Rivera, M.I. Miranda, A. Rangel-Hernandez, D. Badillo-Juárez, D. Fregoso-Urrutia, S. Caynas-Rojas, Effects of caloric or non-caloric sweetener long-term consumption on taste preferences and new aversive learning, *Nutr. Neurosci.* 4 (June) (2018) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1080/1028415X.2018.1478654> [Epubahead of print] PMID:29862893.
- [19] G. De la Casa, R.E. Lubow, Latent inhibition in conditioned taste aversion: the roles of stimulus frequency and duration and the amount of fluid ingested during pre-exposure, *Neurobiol. Learn. Mem.* 64 (2) (1995) 125–132.
- [20] R.E. Lubow, Latent inhibition, *Psychol. Bull.* 79 (6) (1973) 398–407.
- [21] D.J. Levy, P.W. Glimcher, Comparing apples and oranges: using reward-specific and reward-general subjective value representation in the brain, *J. Neurosci.* 31 (41) (2011) 14693–14707.
- [22] D. McNamee, A. Rangel, J.P. O'Doherty, Category-dependent and category-independent goal-value codes in human ventromedial prefrontal cortex, *Nat. Neurosci.* 16 (4) (2013) 479–485.
- [23] J.D. Howard, J.A. Gottfried, P.N. Tobler, T. Kahnt, Identity-specific coding of future rewards in the human orbitofrontal cortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (16) (2015) 5195–5200.
- [24] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed., Academic Press, London, 2007.
- [25] B. Ferry, J.L. McGaugh, Clenbuterol administration into the basolateral amygdala post-training enhances retention in an inhibitory avoidance task, *Neurobiol. Learn. Mem.* 72 (1) (1999) 8–12.
- [26] L.M. Broersen, R.P. Heinsbroek, J.P. de Bruin, B. Olivier, Effects of local application of dopaminergic drugs into the medial prefrontal cortex of rats on latent inhibition, *Biol. Psychiatry* 40 (11) (1996) 1083–1090.
- [27] M.G. Kurlu, D. Burke, S. Slade, B.J. Hall, J.E. Rose, E.D. Levin, Role of insular cortex D₂ and D₃ dopamine receptors in nicotine self-administration in rats, *Behav. Brain Res.* 256 (2013) 273–278.
- [28] T. Thomas, Y. Fang, E. Yuriev, D.K. Chalmers, Ligand binding pathways of clozapine and haloperidol in the dopamine D₂ and D₃ receptors, *J. Chem. Inf. Model.* 56 (2) (2016) 308–321.
- [29] Z. Wang, G.V. Rebec, Neuroethological assessment of amphetamine-induced behavioral changes and their reversal by neuroleptics: focus on the amygdala and nucleus accumbens, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 22 (5) (1998) 883–905.
- [30] C. Colantuoni, J. Schwenker, J. McCarthy, P. Rada, B. Ladenheim, J.L. Cadet, G.J. Schwartz, T.H. Moran, B.G. Hoebel, Excessive sugar intake alters binding to dopamine and mu-opioid receptors in the brain, *Neuroreport* 12 (16) (2001) 3549–3552.
- [31] E.C. Latagliata, E. Patrono, S. Puglisi-Allegra, R. Ventura, Food seeking in spite of harmful consequences is under prefrontal cortical noradrenergic control, *BMC Neurosci.* 11 (2010) 15.
- [32] P.M. Johnson, P.J. Kenny, Dopamine D₂ receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats, *Nat. Neurosci.* 13 (5) (2010) 635–641.
- [33] H.-C. Zhou, Y.-Y. Sun, W. Cai, X.-T. He, F. Yi, B.-M. Li, X.-H. Zhang, Activation of β_2 -adrenoceptor enhances synaptic potentiation and behavioral memory via cAMP-PKA signaling in the medial prefrontal cortex of rats, *Learn. Mem.* 20 (5) (2013) 274–284.
- [34] W.Z. Yu, R.M. Silva, A. Sclafani, A.R. Delamater, R.J. Bodnar, Role of D(1) and D(2) dopamine receptors in the acquisition and expression of flavor-preference conditioning in sham-feeding rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67 (3) (2000) 537–544.
- [35] S. Fallon, E. Shearman, H. Sershen, A. Lajtha, Food reward-induced neurotransmitter changes in cognitive brain regions, *Neurochem. Res.* 32 (10) (2007) 1772–1782.
- [36] V. Bassareo, M.A. De Luca, G. Di Chiara, Differential expression of motivational stimulus properties by dopamine in nucleus accumbens shell versus core and prefrontal cortex, *J. Neurosci.* 22 (11) (2002) 4709–4719.
- [37] S. Mingote, J.P.C. de Bruin, M.G.P. Feenstra, Noradrenergic and dopamine efflux in the prefrontal cortex in relation to appetitive classical conditioning, *J. Neurosci.* 24 (10) (2004) 2475–2480.
- [38] J. Celver, M. Sharma, A. Kooor, RGS9-2 mediates specific inhibition of agonist-induced internalization of D₂-dopamine receptors, *J. Neurochem.* 114 (3) (2010) 739–749.
- [39] W. Sun, N. Ginovart, F. Ko, P. Seeman, S. Kapur, In vivo evidence for dopamine-mediated internalization of D₂-receptors after amphetamine: differential findings with [3H]raclopride versus [3H]spiperone, *Mol. Pharmacol.* 63 (2) (2003) 456–462.
- [40] N.T. Bello, L.R. Lucas, A. Hajnal, Repeated sucrose access influences dopamine D₂ receptor density in the striatum, *Neuroreport* 13 (12) (2002) 1575–1578.
- [41] M.G. Lanser, B.A. Ellenbroek, F.G. Zimman, D.J. Heeren, A.R. Cools, The role of medial prefrontal cortical dopamine in spontaneous flexibility in the rat, *Behav. Pharmacol.* 12 (3) (2001) 163–171.
- [42] A. Arnsten, B. Li, Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions, *Biol. Psychiatry* 57 (June) (2005) 1377–1384.
- [43] G.D. Petrovich, Forebrain circuits and control of feeding by learned cues, *Neurobiol. Learn. Mem.* 95 (2) (2011) 152–158.
- [44] K.S. Burger, E. Stice, Variability in reward responsivity and obesity: evidence from brain imaging studies, *Curr. Drug Abuse Rev.* 4 (3) (2011) 182–189.
- [45] N.T. Bello, C.-Y. Yeh, J.L. Verpeut, A.L. Walters, Binge-like eating attenuates ni-soxetine feeding suppression, stress activation, and brain norepinephrine activity, *PLoS One* 9 (4) (2014) p. e93610.
- [46] C.E. Pritchett, A. Hajnal, Obesogenic diets may differentially alter dopamine control of sucrose and fructose intake in rats, *Physiol. Behav.* 104 (1) (2011) 111–116.
- [47] N.D. Volkow, G.J. Wang, J.S. Fowler, D. Tomasi, R. Baler, Food and drug reward: overlapping circuits in human obesity and addiction, *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 11 (2012) 1–24.
- [48] P.M. Klenowski, M.R. Shariff, A. Belmer, M.J. Fogarty, E.W.H. Mu, M.C. Bellingham, S.E. Bartlett, Prolonged consumption of sucrose in a binge-like manner, alters the morphology of medium spiny neurons in the nucleus accumbens shell, *Front. Behav. Neurosci.* 10 (2016) 54.
- [49] P. Rada, M.E. Bocarsly, J.R. Banson, B.G. Hoebel, S.F. Leibowitz, Reduced accumbens dopamine in Sprague-Dawley rats prone to overeating a fat-rich diet, *Physiol. Behav.* 101 (3) (2010) 394–400.
- [50] N.M. Avena, Examining the addictive-like properties of binge eating using an animal model of sugar dependence, *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 15 (5) (2007) 481–491.
- [51] E.E. Noble, T.M. Hsu, J. Liang, S.E. Kanoski, Early-life sugar consumption has long-term negative effects on memory function in male rats, *Nutr. Neurosci.* (2017) 1–11.
- [52] S. Tronel, M.G.P. Feenstra, S.J. Sara, Noradrenergic action in prefrontal cortex in the late stage of memory consolidation, *Learn. Mem.* 11 (4) (2004) 453–458.
- [53] D.C. Malkusz, T. Banakos, A. Mohamed, T. Vongwattanakit, G. Malkusz, S. Saeed, S. Martinez, T. Bohn, F. Mahmud, C. Liss, A. Rozvi, K. Touzani, A. Sclafani, R.J. Bodnar, Dopamine signaling in the medial prefrontal cortex and amygdala is required for the acquisition of fructose-conditioned flavor preferences in rats, *Behav. Brain Res.* 233 (2) (2012) 500–507.
- [54] J.T. Gass, L.J. Chandler, The plasticity of extinction: contribution of the prefrontal cortex in treating addiction through inhibitory learning, *Front. Psychiatry* 24 (2013) 46.