



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**LAS NEURONAS GABAÉRGICAS DEL HIPOTÁLAMO LATERAL CODIFICAN Y
POTENCIAN LA PALATABILIDAD DE LA SACAROSA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

DIANA AKETZALI GARCÍA GUTIÉRREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. RANIER GUTIÉRREZ MENDOZA – CINVESTAV, ZACATENCO

COMITÉ TUTOR

DR. FRANCISCO SOTRES BAYÓN – INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

**DRA. MARÍA ISABEL MIRANDA SAUCEDO – INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA,
UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., MARZO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Agradezco la disposición que me brindó el Departamento de Farmacología del CINVESTAV para desempeñar este trabajo. Para su realización se contó con los siguientes financiamientos: Productos Medix 2347, Cátedra Marcos Moshinsky y Fundación Miguel Alemán, Problemas Nacionales 461 y Fronteras de la ciencia 63. Asimismo, se dispuso de la Beca de Doctorado CONACYT (CVU: 620150).

También agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma mater*, quien es responsable de mi formación académica y desarrollo personal. Agradezco al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por el sinnúmero de oportunidades educativas ofertadas para la formación de nuevos investigadores.

Al Dr. Ranier Gutiérrez, por el interés y tiempo invertido en mi formación académica. Por la dirección acertada de esta tesis doctoral e ilustrar las bases del quehacer científico.

Gracias al Dr. Francisco Sotres-Bayón y la Dra. Isabel Miranda Saucedo, por las múltiples críticas constructivas, sugerencias y consejos a lo largo de mi estancia doctoral.

A mis compañeros del Laboratorio de Neurobiología del Apetito: Claudia, Jorge, Alam, Roberto, Miguel, Esmeralda, Álvaro, Luis, Benjamín, Mónica, Nikte, Kalyan, Blanca, Liliana, Axel, Leopoldo, Sono, Janeth, Fabiola, Mario y Dr. Garibay. Muchas gracias por sus sugerencias y aportaciones en este proyecto, por siempre aligerar la carga de trabajo y por todo el tiempo vivido fuera de lab. ¡Los quiero, amigos! Asimismo, menciono la labor irremplazable en el desarrollo de este trabajo de Mario Gil Moreno y Fabiola Olvera Hernández.

Por último, agradezco a Juan de Dios Rodríguez-Callejas por su apoyo en la realización de la técnica de Inmunofluorescencia. A Víctor Manuel García Gómez por su auxilio en el mantenimiento de la cepa de ratones transgénicos VGAT-ChR2. A Sendi Adame-García por su disposición para resolver mis dudas experimentales durante la genotipificación de ratones transgénicos y sobre todo su amistad.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi papá, Héctor García, por siempre escucharme, apoyarme y motivarme en este camino largo y rocoso de la investigación neurocientífica. A mi mamá, Herlinda Gutiérrez, que está conmigo en mí hacer diario, y quien soy hoy. A René, Héctor y Hectorin, por los buenos y malos ratos a lo largo del posgrado.

A mi tía Rocío García, definitivamente no existe una mejor tía. Gracias infinitas por tu disposición y apoyo incondicional. Nunca podré pagar todo lo que has hecho por mí.

A mi Pulgas, que me ha acompañado y se ha desvelado sin protestar en la escritura de este manuscrito y artículo. Mi alegría al volver a casa después de una larga jornada de trabajo.

A mis queridos amigos: Rocío, Juan Manuel, Alejandro, Rodrigo, Karla, Yesenia, Esther, Ingrid y David. Gracias por todos los momentos de diversión fuera del laboratorio y por el sin número de conversaciones que usualmente no llegan a nada. Soy muy afortunada de tenerlos a mi lado, y sé que estarán presentes en los siguientes capítulos de mi vida.

Roberto, tenía pensado hacer un chiste sobre las quesadillas con queso y Tijuana, pero no podrá ser por el formato de examen derivado de la pandemia. Te agradezco por estar y soportar mis alegrías, tristezas, enojos y frustraciones. Si algo me queda claro, es que nosotros no conocemos el significado de fronteras territoriales.

¡A los ratones!

ÍNDICE

1. LISTADO DE ABREVIATURAS.....	1
2. RESUMEN.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. ANTECEDENTES.....	4
4.1 Estudios clásicos del Hipotálamo Lateral.....	4
4.2 Palatabilidad.....	6
4.3 La palatabilidad y el Hipotálamo Lateral.....	7
4.4 Clasificación de los grupos neuronales del Hipotálamo Lateral.....	8
4.5 Manipulaciones neuronales en el HL y el control de la ingesta.....	10
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
6. HIPOTÉISIS GENERAL.....	16
7. OBJETIVOS.....	16
7.1 Objetivo general.....	16
7.2 Objetivos particulares.....	16
8. METODO.....	17
8.1 Sujetos.....	17
8.2 Procedimientos quirúrgicos.....	17
8.3 Histología e Inmunofluorescencia.....	18
8.4 Estímulos gustativos.....	19
8.5 Electrofisiología.....	20
8.6 Estimulación optogenética.....	21
8.7 Protocolos conductuales y análisis.....	22
8.7.1 Parámetros de estimulación optogenética.....	22
8.7.2 Actividad neuronal registrada durante la prueba de acceso breve y clasificación de las respuestas relacionadas a la palatabilidad.....	23
8.7.3 Tarea de fotoidentificación (Optotagging).....	25
8.7.4 Protocolo de lazo abierto con una opción.....	26
8.7.5 Protocolo de lazo abierto con tres opciones.....	26
8.7.6 Protocolo lazo abierto en un campo abierto.....	27
8.7.7 Protocolo de lazo cerrado con tres opciones.....	28
8.7.8 Protocolo de lazo cerrado con diferentes opciones en el puerto central... ..	28
8.7.9 Protocolo de lazo cerrado en un campo abierto.....	29
8.7.10 Protocolo lazo cerrado (una sola botella).....	29

8.7.11 Fotoestimulación durante una prueba de acceso breve	30
9. RESULTADOS	32
9.1 Parámetros de fotoestimulación	32
9.2 Las neuronas del Hipotálamo Lateral codifican las respuestas oromotoras de palatabilidad a sacarosa.....	33
9.3 Rastreo dinámico de las neuronas del HL relacionadas a palatabilidad, a lo largo de la sesión de la prueba de acceso breve	36
9.4 Una subpoblación de neuronas HL ^{Vgat+} identificadas optogenéticamente codifican la palatabilidad de la sacarosa.....	37
9.5 Las neuronas no-GABAérgicas del HL codifican negativamente la palatabilidad de la sacarosa.....	39
9.6 La activación de las neuronas HL ^{Vgat+} promueven el consumo de la sacarosa	41
9.7 La activación de las neuronas HL ^{Vgat+} en el protocolo de lazo abierto induce la ingesta por la concentración más alta de sacarosa disponible	43
9.8 La activación de las neuronas HL ^{Vgat+} en el protocolo de lazo abierto incrementa el tiempo de permanencia y promueve el consumo del estímulo sólido más palatable	47
9.9 El protocolo de fotoestimulación de lazo cerrado en las neuronas HL ^{Vgat+} promueve el consumo por el estímulo más cercano	50
9.10 Después de repetidas estimulaciones sobre las neuronas HL ^{Vgat+} , la correlación entre el consumo ligado al láser y las autoestimulaciones incrementa	53
9.11 El efecto de aproximación evocado por la fotoestimulación del lazo cerrado también ocurre ante estímulos sólidos.....	54
9.12 La activación de las neuronas HL ^{Vgat+} es recompensante y promueve el lengüeteo en un bebedero vacío.....	56
9.13 Cuando la sacarosa está disponible la activación de las neuronas HL ^{Vgat+} no promueve la ingesta de estímulos gustativos aversivos ni tolera estímulos nocivos.....	57
9.14 La activación de las neuronas GABAérgicas incrementa el consumo de quinina, pero sólo cuando los animales están privados de agua.....	60
9.15 La activación de las neuronas GABAérgicas mejora la palatabilidad de los estímulos gustativos	62
10. DISCUSIÓN.....	65
11. CONCLUSION	71
12. REFERENCIAS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La estimulación eléctrica en HL induce la alimentación y es recompensante.	5
Figura 2. El HL posee dos subpoblaciones neuronales que codifican los sabores palatables y aversivos.	8
Figura 3. Grupos neuronales del HL.	10
Figura 4. La fotoestimulación de las neuronas glutamatérgicas del HL en animales privados de alimento suprime la ingesta de alimento y es aversiva.	11
Figura 5. La modulación optogenética de las neuronas GABAérgicas del HL es bidireccional durante la conducta de ingesta y recompensa.	12
Figura 6. La fotoestimulación de la proyección GABAérgica HL→AVT promueve la interacción social y la exploración de objetos.	14
Figura 7. Estabilidad en la actividad unitaria registrada en el HL a lo largo de la prueba de acceso breve y optotagging.	21
Figura 8. La fotoestimulación a 50 Hz promueve la respuesta neuronal más robusta.	32
Figura 9. Las neuronas del HL procesan la información relacionada a la palatabilidad de la sacarosa.	35
Figura 10. Las neuronas relacionadas a palatabilidad del HL rastrean los cambios en la tasa de lengüeteo promovidos por la palatabilidad de la sacarosa a lo largo de la sesión.	37
Figura 11. Una subpoblación de las neuronas HL ^{Vgat+} codifican la palatabilidad de la sacarosa.	40
Figura 12. La fotoestimulación a 50 Hz índice el mayor consumo en ratones saciados VGAT-ChR2.	42
Figura 13. La activación de las neuronas HL ^{Vgat+} en el protocolo de lazo abierto genera un sesgo hacia el consumo más palatable disponible sin promover sobreconsumo.	44
Figura 14. La probabilidad de lengüeteo incrementa en función de la distancia.	46
Figura 15. La activación de las neuronas HL ^{Vgat+} incrementa el tiempo de permanencia y el consumo de una dieta alta en grasas.	48
Figura 16. La activación de las neuronas HL ^{Vgat+} incrementa el tiempo de permanencia al estímulo sólido más palatable.	49
Figura 17. Si la fotoestimulación ocurre cerca del estímulo gustativo menos palatable, activación de las neuronas HL ^{Vgat+} inducen su consumo a pesar de la disponibilidad de sacarosa.	52

Figura 18. La repetición continua de la activación de las neuronas HL ^{Vgat+} a lo largo de los días incrementa el consumo ligado a la fotoestimulación.	53
Figura 19. La fotoestimulación de las neuronas HL ^{Vgat+} es recompensante y promueve la exploración del estímulo más cercano.	55
Figura 20. La activación de las neuronas HL ^{Vgat+} no inducen el consumo de sabores amargos ni de estímulos aversivos, pero promueve el sobreconsumo de sacarosa.	59
Figura 21. Bajo el estado de privación de agua, la activación de las neuronas GABAérgicas del HL fomentan el consumo de estímulos aversivos.	61
Figura 22. La activación de las neuronas GABAérgicas del HL mejora la palatabilidad a agua y sacarosa.	64

1. LISTADO DE ABREVIATURAS

HL. Hipotálamo Lateral.

HL^{Vgat+}. Neuronas GABAérgicas del Hipotálamo Lateral.

HL^{Vglut2+}. Neuronas glutamatérgicas del Hipotálamo Lateral.

ATV. Área Tegmental Ventral.

DMH. Núcleo Dorsomedial del Hipotálamo.

VMH. Núcleo Ventromedial del Hipotálamo.

ZI. Zona Inserta

NTS. Núcleo del Tracto Solitario.

NAc shell. Núcleo Accumbens porción shell.

NLET. Núcleo del Lecho de la Estría Terminal.

ARC. Núcleo Arcuato.

AgRP. Neuronas relacionadas a la proteína Agouti.

MCH. Hormona Concentradora de Melanina.

Nts. Neurotensina

ChR2. Canal de Rodopsina 2.

eYFP. Facilitador de la proteína amarillo fluorescente.

VGAT. Transportador vesicular a GABA

VGLUT2. Transportador vesicular a glutamato.

VGAT-ChR2. Cepa de ratones transgénica que contiene el ChR2 en las neuronas que expresan el VGAT

WT. Cepa de ratones silvestres utilizados como grupo control.

EEIC. Estimulación eléctrica intracraneal.

IP. Índice de palatabilidad.

IEE. Intervalo entre ensayos.

PSTH. Histograma de Tiempo Periestímulo.

CUMSUM. Suma acumulativa.

DAG. Dieta alta en grasas.

SA. Saliva Artificial

2. RESUMEN

La sacarosa es atractiva para la mayor parte de las especies del mundo animal, no sólo por la sensación dulce que induce, sino por su palatabilidad positiva (es decir, promueve el incremento de respuestas oromotoras en función del aumento de la concentración de sacarosa). Aunque la palatabilidad es un atributo sensorial importante, actualmente se desconoce los tipos celulares que codifican y modulan la palatabilidad de la sacarosa. Estudios previos en ratones han reportado que la activación de las neuronas GABAérgicas del Hipotálamo Lateral (HL^{Vgat+}) promueven una conducta voraz en el consumo de alimentos. En este trabajo, utilizamos registros electrofisiológicos y estimulación optogenética (mediante la implantación de optrodos en el hipotálamo lateral) para medir la palatabilidad de la sacarosa mientras ratones transgénicos de la cepa VGAT-ChR2 realizaron la prueba de acceso breve. Encontramos una subpoblación de neuronas HL^{Vgat+} que codifican las respuestas a palatabilidad, las cuales incrementan (o disminuyen) su tasa de disparo en función de la respuesta oromotoras (lengüeteo) que es inducida por la sacarosa. Además, realizamos experimentos optogenéticos, en los cuales el ratón podía escoger entre tres estímulos gustativos disponibles, agua, sacarosa al 3 o 18%. La activación de las neuronas HL^{Vgat+} promovió consistentemente el consumo por el estímulo más palatable disponible (sacarosa al 18%). Sin embargo, si la activación de estas neuronas es cercana al estímulo menos palatable, algunos ratones VGAT-ChR2 prefieren consumir agua a sacarosa al 18%. Inesperadamente, la activación de las neuronas HL^{Vgat+} incrementa el consumo de quinina, pero sólo durante el estado de privación de agua, mientras que, en animales saciados, falla al promover el consumo y la tolerancia a estímulos aversivos. Por el contrario, estas neuronas promueven el sobreconsumo de sacarosa cuando es el estímulo más cercano. Además, experimentos con estímulos sólidos confirmaron que la activación de estas neuronas incrementa el tiempo de interacción con el estímulo más palatable disponible. Concluimos que las neuronas HL^{Vgat+} incrementan la motivación de la ingesta de alimentos, a través de la potenciación de la palatabilidad del estímulo gustativo más cercano disponible.

2. SUMMARY

Sucrose is attractive to most species in the animal kingdom, not only because it induces a sweet taste sensation but also for its positive palatability (i.e., oromotor responses elicited by increasing sucrose concentrations). Although palatability is such an important sensory attribute, it is currently unknown which cell-types encode and modulate sucrose's palatability. Studies in mice have shown that activation of GABAergic LHA $^{Vgat+}$ neurons evokes voracious eating; however, it is not known whether these neurons would be driving consumption by increasing palatability. Using optrode recordings, we measured sucrose's palatability while VGAT-ChR2 transgenic mice performed a brief access sucrose test. We found a subpopulation of LHA $^{Vgat+}$ neurons encodes palatability by increasing (or decreasing) their activity as a function of the increment in licking responses evoked by sucrose concentrations. Optogenetic gain of function experiments, where mice were able to choose among available water, 3%, or 18% sucrose solution uncovered that opto-stimulation of LHA $^{Vgat+}$ neurons consistently promoted higher intake of the most palatable stimulus (18% sucrose). In contrast, if they self-stimulated near the less palatable stimulus, some VGAT-ChR2 mice preferred water over 18% sucrose. Unexpectedly, activation of LHA $^{Vgat+}$ neurons increased quinine intake but only during water deprivation, since in sated animals, they failed to promote quinine intake or tolerate an aversive stimulus. Conversely, these neurons promoted overconsumption of sucrose when it was the nearest stimulus. Also, experiments with solid foods further confirmed that these neurons increased food interaction time with the most palatable food available. We conclude that LHA $^{Vgat+}$ neurons increase the drive to consume, but it is potentiated by the palatability and proximity of the tastant.

3. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una epidemia que continúa creciendo rápidamente a nivel mundial. Actualmente en México, cerca de tres cuartas partes (72.5%) de los adultos padecen de sobrepeso u obesidad (OECD, 2019). Uno de los principales factores que inducen obesidad es el sobreconsumo de alimentos altamente palatables y calóricos, especialmente aquellos que contienen altos niveles de azúcares. Se ha hipotetizado que el sobreconsumo de este tipo de alimentos puede afectar a regiones cerebrales involucradas en la alimentación homeostática y la ingesta hedónica (Rossi and Stuber, 2018; Formolo et al., 2019). La alimentación homeostática, es definida como el balance entre el consumo de comida y el gasto energético, y es necesaria para la sobrevivencia del individuo (Rossi and Stuber, 2018). Mientras, que la ingesta hedónica es promovida por pistas sensoriales, como el olor, o el placer que evoca el sabor de un alimento, típicamente con un alto contenido en grasas y azúcares, y puede ocurrir en ausencia de una necesidad calórica (Butler and Eckel, 2018). Ambos procesos están íntimamente ligados con el hipotálamo lateral (HL) y su interacción con otros circuitos cerebrales.

El HL es una de las regiones cerebrales más interconectadas; recibe aferencias y envía proyecciones a regiones intra-hipotalámicas y extra-hipotalámicas; lo cual le permite controlar funciones cognitivas, motoras y endocrinas. Se localiza en la región posterior al Área Preóptica y anterior al Área Tegmental Ventral (ATV). Limita con los bordes del Núcleo Dorsomedial del Hipotálamo (DMH), el Núcleo Ventromedial del Hipotálamo (VMH), el Núcleo Arcuato (ARC) y la zona inserta (ZI) (Berthoud and Münzberg, 2011; Kurt et al., 2017). El inicio de su estudio remonta a las décadas de 50's y 60', a través de experimentos donde se realizaron lesiones y estimulación eléctrica intracraneal.

4. ANTECEDENTES

4.1 Estudios clásicos del Hipotálamo Lateral

El HL se le denominó como el “centro de alimentación”, a partir de los estudios realizados con lesiones electrolíticas en ratas que indujeron hipofagia y adipsia hasta provocar su muerte (Anand and Brobeck, 1951; Teitelbaum and Epstein, 1962). Mientras, la lesión en el VMH induce consumo de alimento y ganancia de peso (Hetherington and Ranson, 1940). Asimismo, la lesión química en el HL con ácido kaínico, causa la ablación de sus somas y suprime la ingesta de alimento y agua (Stricker et al., 1978; Grossman and Grossman, 1982).

Por otro lado, a través de la estimulación eléctrica intracraneal (EEIC) en el HL, se ha demostrado que ésta región cerebral es parte de los neurocircuitos relacionados a las conductas de ingesta y recompensa (Figura 1) (Delgado and Anand, 1953; Olds and Milner, 1954). Se ha observado que las ratas incrementan el número de palanqueos para ser estimuladas, y si el alimento está disponible, la estimulación eléctrica promueve la conducta de ingesta (Figura 1B) (Delgado and Anand, 1953; Mendelson, 1967; Mogenson and Stevenson, 1967; Coons and Cruce, 1968). La conducta de ingesta causada por la EEIC en el HL se le conoce como alimentación ligada a la estimulación, y se mantiene pocos segundos después de que cesa la estimulación (Hoebel and Teitelbaum, 1962). También se ha reportado que ante la presencia de sabores dulces, la tasa de EEIC incrementa, contrario a lo que sucede cuando sólo se presentan estímulos gustativos amargos, disminuyendo el número de veces que el animal se estimula (Figura 1C) (Phillips and Mogenson, 1968; Poschel, 1968). Estos hallazgos sugieren una interacción entre la EEIC y la palatabilidad del sabor.

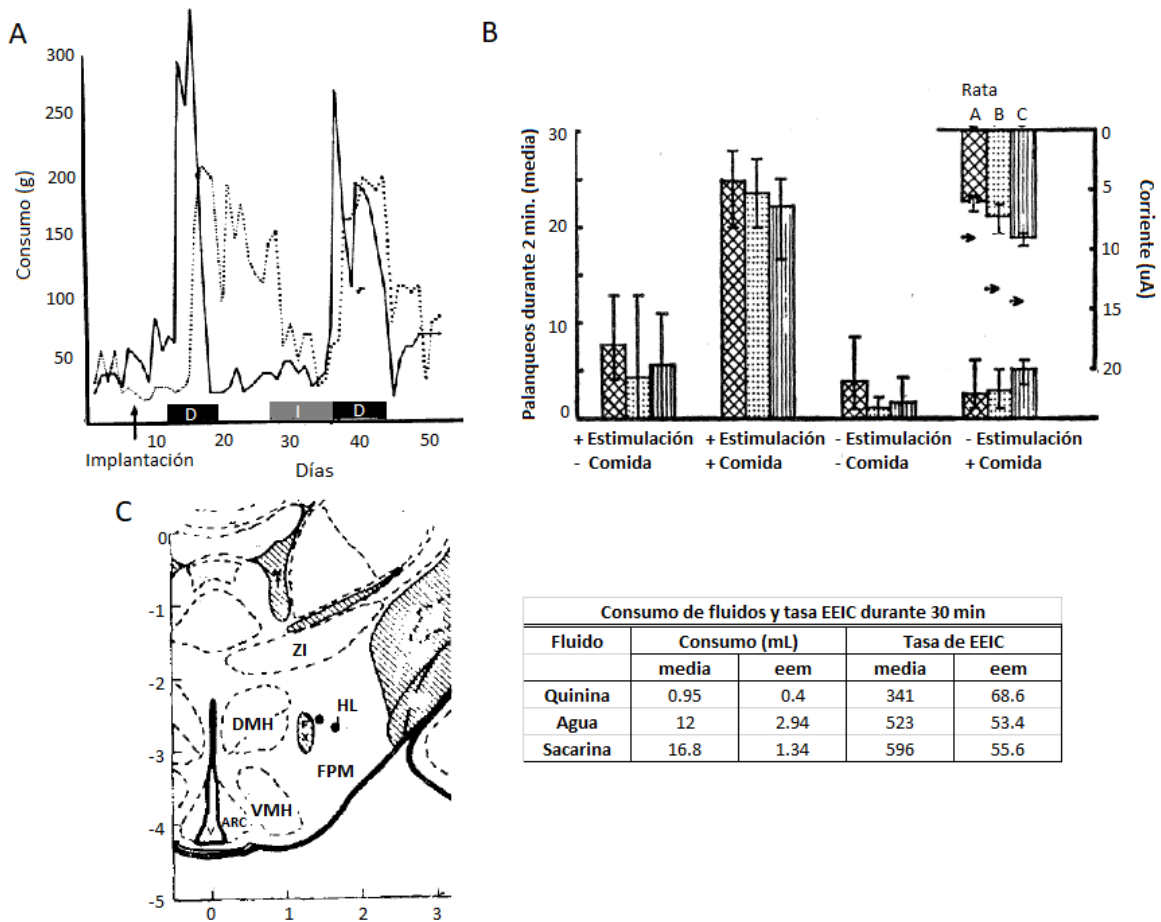


Figura 1. La estimulación eléctrica en el HL induce la alimentación y es recompensante. **A.** La EEIC unilateral del HL incrementa el consumo de alimentos sólidos (línea sólida) o líquidos (línea punteada), durante los periodos de manipulación experimental (rectángulos negro y gris). La flecha indica el día de implantación del electrodo de estimulación. Hemisferio derecho (D), hemisferio izquierdo (I). Modificado de Delgado & Anand, 1953. **B.** La gráfica ilustra cuatro condiciones experimentales. Se observa que ante la presencia de alimento aumenta el número de palanqueos asociados a la EEIC. La gráfica superior derecha indica la corriente que se aplicó en cada sujeto. Las barras y las fechas muestran los umbrales requeridos para promover la conducta de ingesta y la conducta de autoestimulación en ausencia de alimento, respectivamente. Modificado de Coons & Cruce, 1968. **C. Panel izquierdo,** sitios donde se realizó la EEIC (puntos negros). Media de la tasa de EEIC asociada al consumo estímulos negativos, neutros y dulces. Modificado de Phillips y Mogenson, 1968.

Dada la conexión del HL con diferentes regiones cerebrales de la vía del procesamiento gustativo, se ha relacionado con el procesamiento de palatabilidad del sabor. En el siguiente apartado definiremos el concepto de palatabilidad en roedores y la participación del HL.

4.2 Palatabilidad

El percepto de un sabor se refiere a la integración de múltiples atributos sensoriales, como son las cualidades gustativas básicas (salado, dulce, amargo, ácido, umami), la palatabilidad del estímulo gustativo (su valor hedónico), o la intensidad (el grado de concentración del estímulo) (Breslin, 2013; Gutierrez et al., 2020). En el caso de la sacarosa, además de ser una cualidad gustativa dulce, también evoca un valor hedónico o palatable, que resulta sumamente atractivo su consumo a lo largo de diversas especies de animales.

En roedores, la palatabilidad es medida como el incremento (o la disminución) de las respuestas oromotoras debido a la concentración de un sabor (Spector et al., 1998). Para medir el reporte de palatabilidad, se desarrolló una tarea conductual llamada “*prueba de acceso breve*”, la cual consiste en permitir el consumo de un sabor por un corto periodo de tiempo (< 10 s), esto limita el impacto de los efectos post-ingestivos (Young et al., 1963). Para los sabores hedónicamente positivos, como la sacarosa, los roedores incrementan el número de lengüeteos y el tamaño de la ráfaga del lengüeteo en función de la concentración, y disminuye la tasa de lengüeteos ante el incremento de la concentración de estímulos negativos, como la quinina (Spector and Smith, 1984; Davis and Perez, 1993; Hsiao and Fan, 1993). En este trabajo, definimos operacionalmente a la palatabilidad de la sacarosa, como las respuestas oromotoras hedónicamente positivas evocadas por el incremento de la concentración de la sacarosa (Berridge and Grill, 1983; Spector et al., 1998; Villavicencio et al., 2018). Específicamente, el incremento en la tasa de lengüeteos o el tamaño de la ráfaga de lengüeteos. Esta definición de palatabilidad no debe ser confundida con la sensación consciente de placer que los humanos experimentan ante un sabor (Grill and Berridge KC, 1985; Sclafani, 1991).

4.3 La palatabilidad y el Hipotálamo Lateral

La información sensorial gustativa llega al Núcleo del Tracto Solitario (NTS), el primer relevo de la vía del procesamiento gustativo, a través de los pares craneales VII (facial), IX (glossofaríngeo) y X (vago). En roedores, las neuronas sensibles al gusto del NTS envían eferencias al Núcleo Parabraquial, segundo relevo de la vía del procesamiento gustativo. Este núcleo envía proyecciones a diferentes estructuras cerebrales relacionadas a la ingesta de alimento y la memoria gustativa, entre ellas se encuentra el HL. Se ha reportado que las lesiones con ácido iboténico en el HL afectan la adquisición del condicionamiento de preferencia o aversión al sabor (Touzani and Sclafani, 2002), e incrementa la preferencia y tolerancia por sabores dulces y amargos, respectivamente (Ferssiwi et al., 1987). Además, diversos estudios han implicado al HL con el procesamiento de la palatabilidad. A través de registros electrofisiológicos de la actividad unitaria, se ha encontrado que las neuronas del HL responden ante estímulos nocivos (un choque eléctrico o el pinchar la cola de un roedor), estímulos recompensantes (la EEIC seguida del lengüeteo en un sipper) (Ono et al., 1986) y diferentes cualidades gustativas (Norgren, 1970; Schwartzbaum, 1988; Yamamoto et al., 1989) con un valor hedónico positivo (p. ej. sacarosa) o negativo (p. ej. quinina) (Norgren, 1970), y su respuesta está segregada anatómicamente (Schwartzbaum, 1988). Recientemente, Li y col., descubrieron dos poblaciones neuronales del HL con actividad funcional antagónica. El primer grupo neuronal se modula ante la presencia de estímulos gustativos palatables, como sacarosa y NaCl, y el segundo responde ante estímulos aversivos, como quinina o ácido cítrico (Figura 2). Sin embargo, éstos estudios no pudieron definir la identidad del grupo neuronal implicado en el procesamiento de palatabilidad del HL.

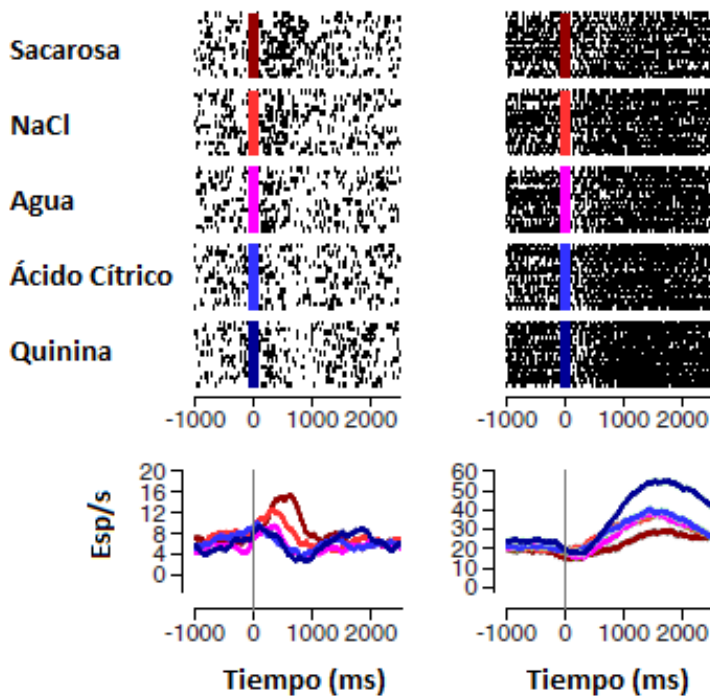


Figura 2. El HL posee dos subpoblaciones neuronales que codifican los sabores palatables y aversivos. Las gráficas tipo ráster ilustran dos ejemplos de neuronas que respondieron ante diferentes sabores en una prueba de acceso breve. Los rectángulos verticales indican los ensayos donde se presentó sacarosa (rojo oscuro), NaCl (rojo), agua (rosa), ácido cítrico (azul) y quinina (azul oscuro). Cada marca negra representa una espiga. Se observa una respuesta diferencial ante la presentación de sabores palatables (*panel izquierdo*) o aversivos (*panel derecho*). Las gráficas de abajo muestran el PSTH de la tasa de disparo (Espigas/s; Esp/s) para cada tipo de ensayo. Todas las gráficas están alineadas al momento de la entrega del sabor (Tiempo 0). Modificado de Li et al. 2013.

4.4 Clasificación de los grupos neuronales del Hipotálamo Lateral

EL HL es una región heterogénea, compuesta por diversos grupos celulares, identificados genéticamente por los neuropéptidos y neurotransmisores que expresan (Bonnavion et al., 2016; Mickelsen et al., 2019) (Figura 3). Algunos de los tipos neuronales definidos por el neuropéptido que contienen son los siguientes: 1) Hormona concentradora de melanina (MCH, por sus siglas en inglés). Participan en la regulación de la ingesta y el balance del ciclo sueño-vigilia. Se ha encontrado que la sobreexpresión del neuropéptido MCH induce hiperfagia, obesidad y resistencia a insulina (Ludwig et al., 2001), mientras que la delección de las neuronas MCH provoca hipofagia y adelgazamiento (Shimada et al., 1998). 2) Orexina/Hipocretina. Estas neuronas están principalmente implicadas en la regulación del estado de alertamiento (arousal) (de Lecea, 2015). También se ha encontrado que la

activación quimiogénica¹ de estas neuronas induce la conducta de ingesta y la regulación del metabolismo (Inutsuka et al., 2014). 3) Neurotensina (Nts). Este grupo de neuronas es abundante en el HL (Kahn et al., 1980). Recientemente se reportó que su activación quimiogénica promueve el consumo voraz de líquidos (Kurt et al., 2019). Se ha encontrado que estas neuronas co-expresan receptores de melanocortina-4 y leptina (Bonnavion et al., 2016; Brown et al., 2017; Mickelsen et al., 2019). 4) Galanina. Se ha descrito que esta subpoblación contiene receptores a leptina y Nts (Berthoud and Münzberg, 2011; Mickelsen et al., 2019) y son parte de una fracción de las neuronas GABAérgicas del HL (Qualls-Creekmore et al., 2017). Su activación quimiogénica está relacionada con la conducta apetitiva y la búsqueda de alimentos palatables, como pellets de sacarosa o líquidos con alto contenido calórico, pero no induce su consumo (Qualls-Creekmore et al., 2017). Por otro lado, las poblaciones más extensas en el este núcleo son las neuronas glutamatérgicas, que expresan el transportador vesicular a glutamato 2 (VGLUT2, por sus siglas en inglés), y las neuronas GABAérgicas, las cuales contienen el transportador vesicular a GABA (VGAT, por sus siglas en inglés) (Jennings et al., 2015; Stuber and Wise, 2016; Mickelsen et al., 2019).

¹**Quimiogénica.** Técnica que se basa en el uso de receptores diseñados exclusivamente para activar drogas de diseño (DREADDS, por sus siglas en inglés), para activar o inhibir selectivamente vías señalización intracelular definidas por su grupo neuronal. Para ello se administra un ligando sintético (como la molécula CNO) que es permeable a la barrera hematoencefálica, el cual se une selectivamente a estos receptores para desencadenar vías de señalización intracelular.

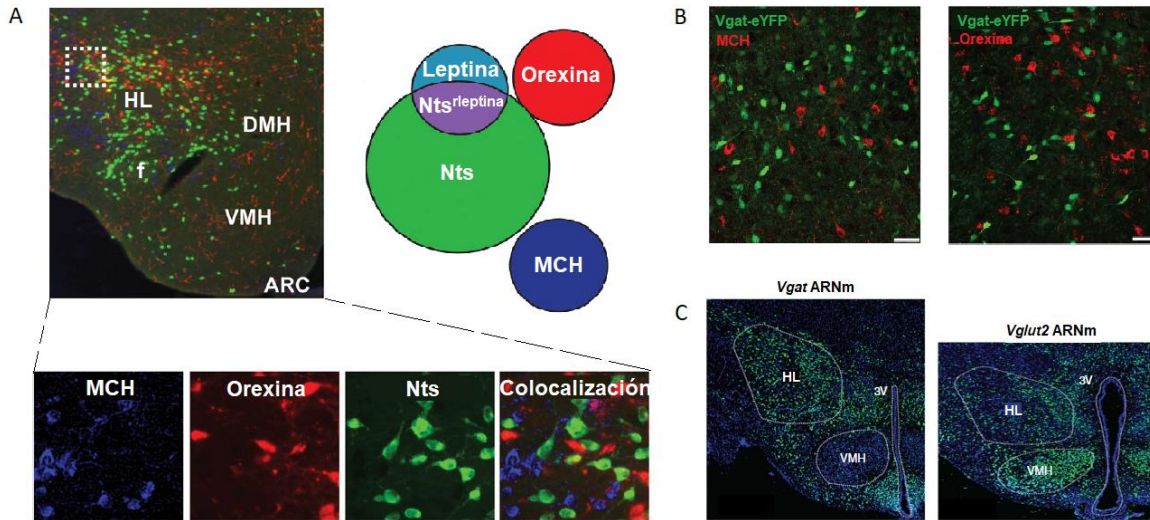


Figura 3. Grupos neuronales del HL. **A.** Imagen representativa de la distribución de los grupos neuronales del HL que expresan neuropéptidos (*panel izquierdo*). Fue determinada por una inmunofluorescencia contra MCH (azul), Orexina (rojo) y Neurotensina (verde). El cuadrado blanco punteado indica el empalme de estos grupos neuronales. En la parte de abajo se observa la imagen de cada uno de ellos. El diagrama de Venn (*panel derecho*) ilustra el tamaño y la distribución relativa de estos grupos neuronales. Modificado de Brown et al. 2017. **B.** Las neuronas GABAérgicas que expresan el Vgat (verde) en el HL no colocalizan con las neuronas que contienen los neuropéptidos MCH y Orexina (rojo). Modificado de Jennings et al. 2015. **C.** El HL contiene una mezcla de neuronas inhibitorias y excitatorias. Imágenes de la técnica hibridación *in situ* para marcar la expresión del Vgat (*panel izquierdo*) y el Vglut2 (*panel derecho*). Modificado de Stuber & Wise, 2016. HL, Hipotálamo Lateral; DMH, Núcleo Dorsomedial del Hipotálamo; VMH, Núcleo Ventromedial del Hipotálamo; ARC, Núcleo Arcuato; 3V, Tercer Ventrículo; Nts, Neurotensina; rleptina, Receptor a leptina; MCH, Hormona Concentradora de Melanina; Vgat, Transportador vesicular a GABA; Vglut2, Transportador vesicular a glutamato 2. ARNm, Ácido ribonucleico mensajero; eYFP, Facilitador de la proteína amarillo fluorescente.

4.5 Manipulaciones neuronales en el HL y el control de la ingesta

A pesar de que el HL contiene diferentes grupos neuronales, la investigación actual se ha centrado en la manipulación de neuronas excitatorias e inhibitorias que orquestan el control de la ingesta y la recompensa. La activación optogenética² de las neuronas glutamatérgicas del HL (HL^{Vglut2+}), reduce el consumo de alimento y es aversiva (Figura 4) (Jennings et al., 2013). La ablación de los somas glutamatérgicos de este núcleo incrementa el consumo de

² **Optogenética.** Técnica que utiliza opsinas microbianas y luz para activar o inhibir selectivamente grupos neuronales genéticamente definidos.

alimento y la ganancia de peso (Stamatakis et al., 2016). Recientemente se encontró que su actividad neuronal disminuye en modelos de obesidad inducida por una dieta alta en grasas, sugiriendo que estas neuronas representan la señal de freno para detener la ingesta de alimento (Rossi et al., 2019).

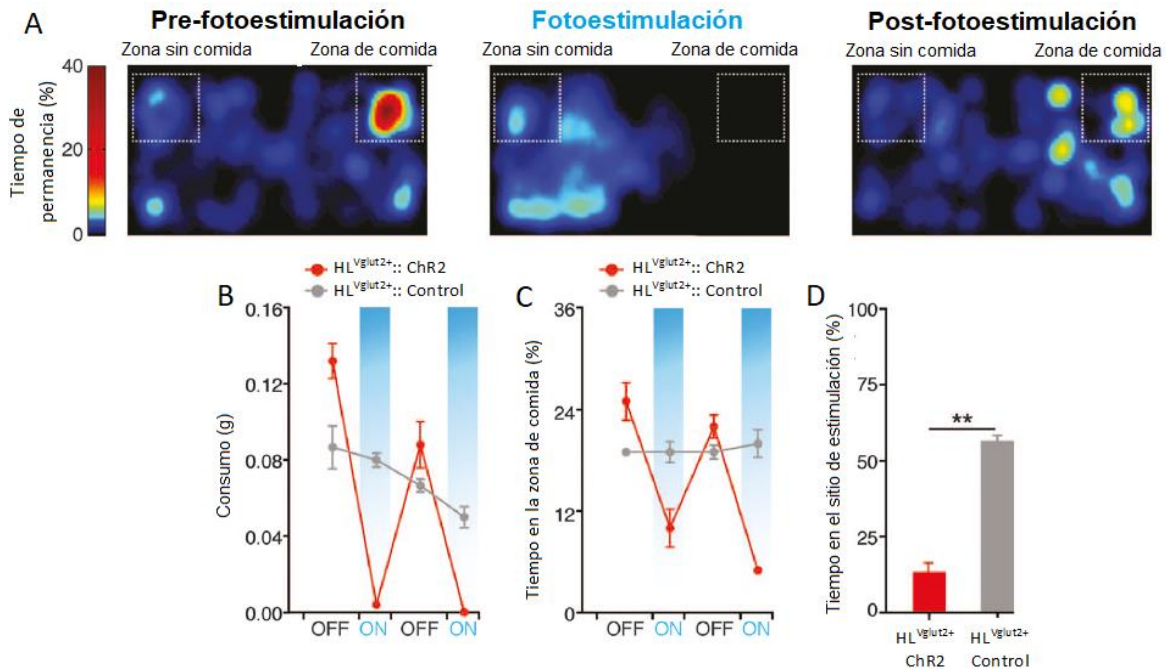


Figura 4. La fotoestimulación de las neuronas glutamatérgicas del HL en animales privados de alimento suprime la ingesta de alimento y es aversiva. **A.** A través del uso de la cepa transgénica *Vglut2-ires-cre* y adenovirus dependientes de la enzima cre recombinasa, se expresó el canal de rodopsina 2 (ChR2, por sus siglas en inglés) en las neuronas HL^{Vglut2+} y para el grupo control se infundió el facilitador de la proteína amarilla fluorescente (eYFP). Ratones privados de alimento fueron colocados en una arena que contenía dos platos de plástico en las esquinas superiores, uno de ellos con pellets de dieta chow (Zona de comida) y otro sin alimento (Zona sin comida). Los animales realizaron tres paradigmas conductuales consecutivamente (20 min cada uno): Pre-fotoestimulación, fotoestimulación, donde los ratones fueron estimulados con un láser de 473 nm a una frecuencia de 20 Hz constantemente, y post-fotoestimulación (el láser se mantuvo apagado). Los mapas de calor indican el tiempo de permanencia en la arena a lo largo de los tres paradigmas. **B-C.** La fotoestimulación de las neuronas HL^{Vglut2+} disminuye el consumo y el tiempo de permanencia en la zona de comida. **D.** Se realizó una prueba de preferencia de lugar en tiempo real para medir si la activación optogenética de las neuronas HL^{Vglut2+} es aversiva o recompensante. Se encontró que la fotoestimulación de las neuronas HL^{Vglut2+} disminuye el tiempo de permanencia en comparación con el grupo control. Modificado de Jennings et al. 2013.

Por otro lado, la activación optogenética y quimiogenética de las neuronas GABAérgicas del HL (HL^{Vgat+}) es recompensante y promueve la ingesta tanto de alimentos con valor nutritivo (Jennings et al., 2015; Navarro et al., 2016), como aquellos que no contienen

calorías (Navarro et al., 2016), asimismo inducen la conducta de roer hacia estímulos que carecen de relevancia biológica (p. ej., un corcho de madera) (Navarro et al., 2016). Mientras que su inhibición es aversiva y detiene el consumo (Figura 5) (Jennings et al., 2015; Navarro et al., 2016). Además, se ha identificado a través de imagenología de calcio *in vivo* la existencia de dos subgrupos de neuronas HL^{Vgat+} que se activan diferencialmente durante la conducta apetitiva y el consumo de alimento (Jennings et al., 2015).

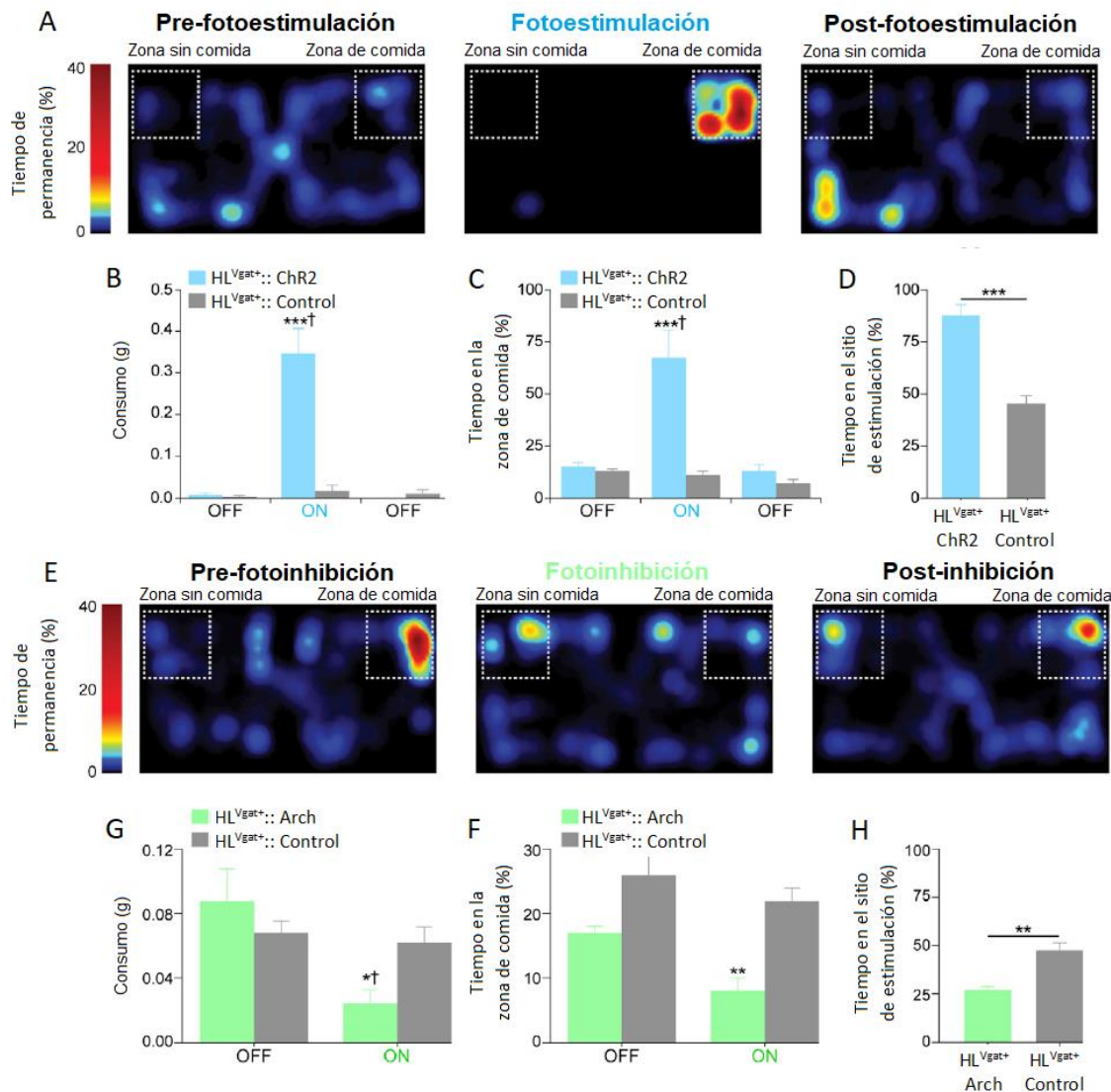


Figura 5. La modulación optogenética de las neuronas GABAérgicas del HL es bidireccional durante la conducta de ingesta y recompensa. **A.** Se utilizó la cepa de ratones *Vgat-ires-cre* y se inyectaron adenovirus dependientes de la enzima cre recombinasa para expresar el ChR2 en las neuronas HL^{Vgat+} , mientras que para el grupo control se infundió eYFP. Se realizó el mismo protocolo conductual descrito en la Figura 4A. Los mapas de calor indican el tiempo de permanencia en la arena antes, durante y después de la activación optogenética en las neuronas HL^{Vgat+} en ratones

saciados. **B-C.** La fotoestimulación de las neuronas HL^{Vgat} incrementa el consumo y el tiempo de permanencia en la zona de comida en comparación con el grupo control (*) y en los paradigmas conductuales donde no se encendió el láser (†). **D.** Prueba de preferencia de lugar en tiempo real. La fotoestimulación de las neuronas HL^{Vgat+} es recompensate. **E-H.** Fotoinhibición de las neuronas HL^{Vgat+} . A un grupo de ratones ingenuos de la cepa *Vgat-ires-cre* se le inyectó un adenovirus dependiente de la enzima cre recombinasa para expresar la proteína Arqueorodopsina (Arch) en las HL^{Vgat+} . Los mapas de calor indican el tiempo de permanencia durante los tres paradigmas conductuales, lo ratones fueron privados de alimento. Para el período de fotoinhibición se mantuvo constantemente encendido un láser verde de 532 nm. **F-G.** La fotoinhibición de los somas GABAérgicos disminuye el consumo en comparación con el grupo control (*), y el tiempo de permanencia en la zona de comida relativo a los periodos sin fotoinhibición (†). **H.** Este silenciamiento neuronal es aversivo. Modificado de Jennings et al. 2015

El HL recibe múltiples aferencias GABAérgicas provenientes de estructuras subcorticales, como son el Lateral Septum, la Habenula Lateral, el Núcleo Accumbens porción shell (NAc shell) y el Núcleo del Lecho de la Estría Terminal (NLET) (Stuber and Wise, 2016). Se ha reportado que la estimulación optogenética de las neuronas GABAérgicas del NLET inervan selectivamente a las neuronas $HL^{Vglut2+}$, promoviendo la conducta de ingesta (Jennings et al., 2013). Además, el HL recibe aferencias inhibitorias de las neuronas relacionadas a la proteína Agouti (AgRP, por sus siglas en inglés) del ARC, estas neuronas son esenciales en la regulación del circuito homeostático de la alimentación (Aponte et al., 2011). La estimulación optogenética de esta vía incrementa la conducta de ingesta (Betley et al., 2013). Recientemente se encontró que las neuronas $HL^{Vglut2+}$ modulan la preferencia del sabor inducido por el estado de hambre del animal, el cual es controlado por las neuronas AgRP (Fu et al., 2019).

Asimismo, el HL envía proyecciones axónicas a diversos núcleos, entre ellos se encuentra el ATV. Se ha reportado que la estimulación optogenética de las neuronas HL^{Vgat+} que inervan a las neuronas GABAérgicas del ATV, incrementan la saliencia del estímulo más cercano, motiva la interacción social y es recompensante (Figura 6) (Nieh et al., 2016). Estas proyecciones inhibitorias que recibe el ATV promueven la disinhibición de las

neuronas dopaminérgicas que contiene este núcleo (Nieh et al., 2016). A su vez, el NAc shell recibe aferencias dopaminérgicas proveniente del ATV (Nieh et al., 2016). El NAc shell contiene receptores a dopamina tipo D1 y D2 en sus neuronas espinosas medianas que proyectan al HL (Heimer et al., 1991; O'Connor et al., 2015). Estas señales inhibitorias dopaminérgicas, principalmente del tipo D1, inervan a las neuronas HL^{Vgat+} para silenciar su actividad y así, detener la conducta de ingesta (O'Connor et al., 2015). Esta conducta de ingesta, también es controlada por algunas aferencias GABAérgicas del HL que pasan a través del ATV e inervan hasta la periferia del Locus Cerúleo (Marino et al., 2020).

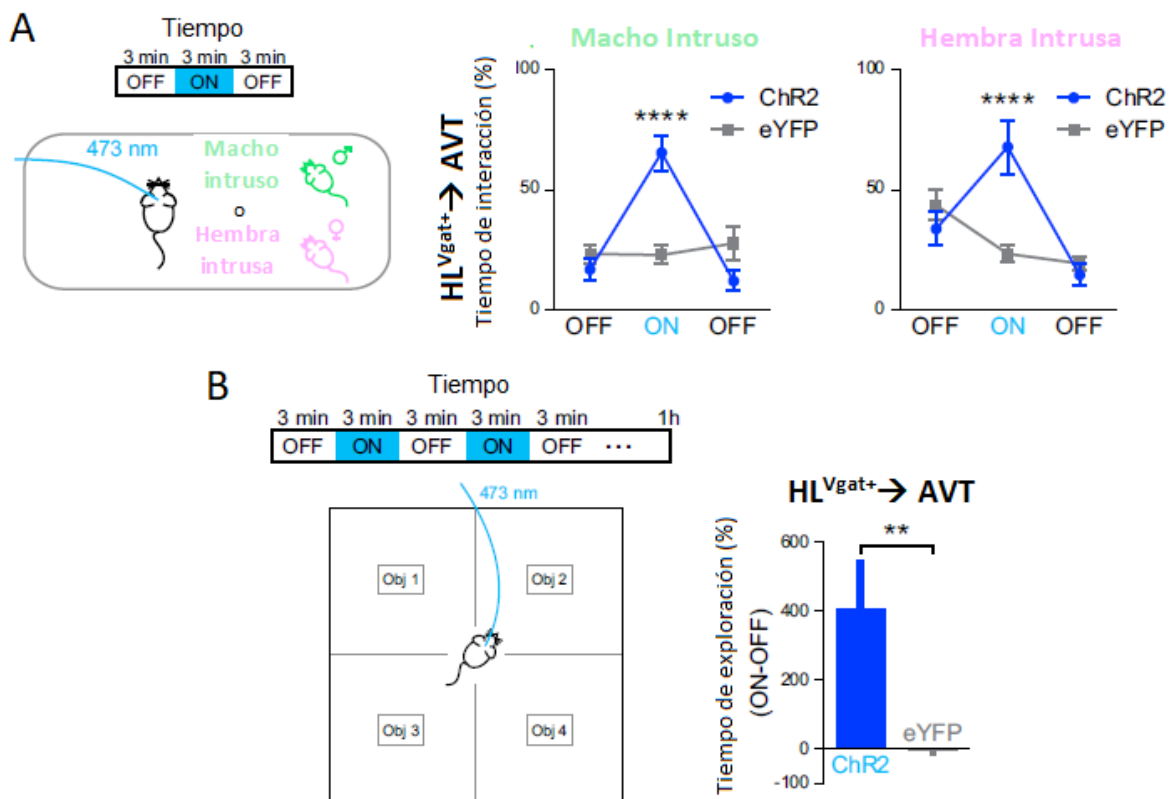


Figura 6. La fotoestimulación de la proyección GABAérgica HL→AVT promueve la interacción social y la exploración de objetos. **A.** Para evaluar la interacción social, los sujetos fueron colocados en una caja con un ratón macho-joven o con una hembra. El tiempo de interacción fue cuantificado en tres bloques consecutivos de 3 minutos cada uno. El láser se mantuvo encendido en el segundo bloque. Se observó un incremento de la interacción social durante el periodo de fotoestimulación. **B.** Se colocó a los ratones en un campo abierto con cuatro zonas, en cada una de ellas se colocó un objeto nuevo. Durante una hora se les permitió a los sujetos explorar la caja libremente mientras fueron fotoestimulados por intervalos de 3 minutos (*panel izquierdo*). Se observó un incremento en el tiempo de exploración en el grupo de ratones transgénicos (ChR2) en comparación con el grupo control (eYFP). Modificado de Nieh et al. 2016.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La palatabilidad al sabor es un atributo sensorial que indica el valor hedónico o atractivo de un alimento (Breslin, 2013), lo cual promueve su grado de consumo. Se sabe que uno de los principales factores que inducen la obesidad, es el sobreconsumo de alimentos altamente palatables y calóricos, especialmente aquellos que contienen azúcares. Estudios clásicos en el HL han demostrado su participación en los procesos de regulación de la ingesta de alimentos y recompensa (Delgado and Anand, 1953; Teitelbaum and Epstein, 1962). La EEIC constante de este núcleo motiva el consumo de alimentos palatables, y disminuye la tasa de estimulación ante estímulos gustativos amargos (Phillips and Mogenson, 1968; Poschel, 1968). Además, a través de registros electrofisiológicos, el HL se ha relacionado con el procesamiento de palatabilidad (Norgren, 1970; Schwartzbaum, 1988; Yamamoto et al., 1989). Se ha observado que contiene dos subpoblaciones neuronales, las cuales muestran una respuesta antagónica de acuerdo con el valor hedónico de los estímulos gustativos ingeridos (Li et al., 2013). No obstante, estos estudios no indican el grupo neuronal que participa en la codificación de la palatabilidad. Recientemente, se encontró que la activación de las neuronas HL^{Vgat+} promueve la conducta de ingesta tanto de estímulos calóricos (Jennings et al., 2015; Navarro et al., 2016), como aquellos que no poseen una relevancia biológica (Navarro et al., 2016). Sin embargo, en estos experimentos los sujetos sólo tienen una opción disponible, contrario a lo que ofrece el menú alimenticio en la vida diaria, donde se encuentran alimentos no calóricos (neutrales) y alimentos altamente palatables y atractivos. Además la activación de las proyecciones GABAérgicas de la vía HL→ATV también inducen la exploración por el objeto más saliente (Nieh et al., 2016). Este proyecto evaluó si las neuronas HL^{Vgat+} codifican la palatabilidad de la sacarosa y si la conducta de ingesta dirigida por la activación de este grupo de neuronas se debe a que incrementa el valor hedónico del estímulo gustativo más cercano de su entorno.

6. HIPOTÉISIS GENERAL

Dado que el HL participa en el procesamiento de palatabilidad de estímulos palatables y la activación de las neuronas GABAérgicas inducen la conducta de ingesta y la exploración por el estímulo más saliente (el más próximo), proponemos lo siguiente:

Las neuronas HL^{Vgat+} codifican la palatabilidad de la sacarosa y su activación potencia el valor hedónico del estímulo más cercano promoviendo su sobreconsumo.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Determinar la participación de las neuronas HL^{Vgat+} en el procesamiento de la palatabilidad de la sacarosa. Asimismo, estudiar si la activación de estas neuronas tiene preferencia por el consumo del estímulo gustativo más palatable o el más próximo disponible.

7.2 Objetivos particulares

- Registrar la actividad unitaria e identificar las neuronas HL^{Vgat+} que codifican la palatabilidad de la sacarosa en una prueba de acceso breve al sabor.
- Establecer los parámetros de fotoestimulación necesarios para inducir el consumo de sacarosa.
- Evaluar si la activación de las neuronas HL^{Vgat+} inducen la ingesta por el estímulo más palatable disponible, utilizando un protocolo de lazo abierto.
- Probar si la activación de las neuronas HL^{Vgat+} favorecen la ingesta por el estímulo (neutral, aversivo) más próximo en un protocolo de lazo cerrado.
- Determinar si la activación de las neuronas HL^{Vgat+} potencia la palatabilidad de los estímulos gustativos a través de una prueba de acceso breve al sabor.

8. METODO

8.1 Sujetos

Se utilizaron 42 ratones VGAT-ChR2-EYFP (Número de catálogo 014548; Jackson Laboratory, Sacramento, CA, USA), y 25 ratones wildtype (WT). Con una edad de 8 a 16 semanas y de ambos sexos. Los ratones fueron alojados en un bioterio con temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$), con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h (encendido de luces a las 7:00 h y apagado a las 19:00 h), e individualizados en cajas hogar. El acceso al alimento (dieta chow, PicoLab Rodent Diet, MO, USA) y agua (en la mayoría de los experimentos) fue *ad libitum*. Para los experimentos con restricción de agua, los animales fueron privados de agua durante 23 horas y se les dio acceso libre al término de la sesión experimental durante 1 hora. Las sesiones experimentales se realizaron en el período de luz, entre las 11:00 a 14:00 horas, y se realizó una sesión experimental por día. Todos los experimentos fueron aprobados por comité institucional del CINVESTAV para el cuidado y uso de animales (CICUAL 0080-14).

8.2 Procedimientos quirúrgicos

Previo a la cirugía, los animales fueron anestesiados con un cocktail de ketamina (100 mg/kg, i.p.) y xilacina (8 mg/kg, i.p.), y colocados en un aparato estereotáxico (Stoelting, IL, USA). Se les aplicó lidocaína (0.05 mL) subcutánea, como analgésico, y se mantuvieron los ojos hidratados con un ungüento oftalmológico (hidrocortisona, neomicina y polimixina B) que se administró periódicamente. Posterior a la cirugía, se administró como tratamiento enrofloxacina (0.4 mL/ Kg) durante 3 días.

En los experimentos donde se utilizó la técnica de optogenética, se implantó una fibra óptica multimodal con un diámetro de 200 μm y con una apertura numérica de 0.39 (FT200UMT; Thorlabs, NJ, USA) en el HL. Se utilizaron las siguientes coordenadas: AP: -1.25 mm, ML ± 1 mm, DV: -4.9 mm desde bregma. Para los registros electrofisiológicos, se implantó un optrodo realizado en nuestro laboratorio. Éste consiste en un arreglo de 16 electrodos de tungsteno (35 μm de diámetro), localizados alrededor de una fibra óptica multimodal, la cual sobresale 1 mm. Para implantarlo se emplearon las siguientes coordenadas: AP: -1.25 mm, ML ± 1 mm, DV: -5.2 mm ventral a duramadre. Tanto la fibra óptica como el optrodo fueron implantados unilateralmente y se contrabalancearon en ambos hemisferios. No se encontraron diferencias significativas entre hemisferios (datos no mostrados). Todos los sujetos descansaron una semana posterior a la cirugía.

8.3 Histología e Inmunofluorescencia

Para verificar el sitio de implantación del optrodo y la fibra óptica, los ratones fueron sacrificados al final de cada experimento con una sobredosis de pentobarbital (150 mg/ kg). Posteriormente, se realizó una perfusión transcardiaca con un buffer de fosfatos al 1X (PBS, por sus siglas en inglés), seguido de paraformaldehído al 4%. Los cerebros fueron removidos y fijados en paraformaldehído durante una noche, al siguiente día se colocaron en sacarosa al 30% por tres días. En un criostato se realizaron cortes coronales de 40 μm . Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Nikon eclipse e200, con un objetivo 10X.

Se realizó una inmunotinción por el método de flotación con rebanadas de 40 μm . Primero, se realizaron tres lavados de 10 min con una solución de PBS al 1x. Para permeabilizar el tejido, se realizó un lavado con PBS 1X con Tritón (PBS-T) al 0.2% durante 20 min.

Posteriormente, se incubaron con una solución de bloqueo de albumina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) al 1% disuelta en PBS-T al 0.2% durante 30 min. Al término, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS-T al 0.2%. Luego, se incubaron toda una noche a 4° C con los anticuerpos primarios contra GAD-67 hecho en ratón (Millipore, Mab5406) a una concentración 1:1000 y el anticuerpo contra GFP hecho en conejo (Invitrogen, A11122) a una concentración 1:1000, ambos anticuerpos se disolvieron en PBS-T al 0.2%. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS-T al 0.2%. Después, se incubaron (en total oscuridad y a temperatura ambiente) con un anticuerpo secundario hecho en cabra-contrá ratón acoplado a Alexa 647 (Invitrogen, A212235) a una concentración 1:500, y con un anticuerpo secundario hecho en burro- contra conejo acoplado a Alexa 488 (Invitrogen, A21206) a una concentración 1:500 durante 90 min, ambos diluidos en PBS-T al 0.2%. Al término de la incubación se tiñeron con el marcador fluorescente 4', 6 diamidino-2-fenidol (DAPI, por sus siglas en inglés) para marcar núcleos celulares y se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-T al 2%. Finalmente, las rebanadas se montaron sobre un portaobjetos y se les colocó Vectashield como medio de montaje fluorescente. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Leica utilizando un objetivo de 63X.

8.4 Estímulos gustativos

Como estímulos gustativos se utilizó sacarosa grado reactivo (Sigma-Aldrich, Ciudad de México, México) en las siguientes concentraciones: 3, 10 y 18%. Quinina clorhidrato dihidratado grado reactivo al 0.04% (Sigma-Aldrich, Ciudad de México, México). Saliva artificial que contiene (mM): 4 NaCl, 10 KCl, 6 NaHCO₃, 6 KHCO₃, 0.5 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 0.24 K₂HPO₄, 0.24 KH₂PO₄ (Zocchi et al., 2017). Se agregó 0.05 mM de HCl para ajustar el pH a 7. Todas las soluciones fueron disueltas en agua destilada, refrigeradas y utilizadas

a temperatura ambiente. Como estímulos sólidos se empleó 20 mg de pellets de chocolate (Bio-Serv, NJ, USA), dieta chow (PicoLab Rodent Diet, MO, USA), dieta alta en grasas con 45% kcal% de grasa (Research Diets, NJ, USA), cubos de sacarosa granulada y corchos.

8.5 Electrofisiología

La actividad neuronal fue registrada usando un sistema procesador de adquisición de multicanales (Plexo, Dallas, TX) en interfaz con una caja de condicionamiento operante que permitió el registro de eventos conductuales simultáneamente. Las señales de voltaje extracelular fueron amplificadas (x1) y estabilizadas por un headstage análogo (Plexon HST/16o25-GEN2-18P-2GP-G1), posteriormente amplificado (x1000) y muestreado a 40 kHz. Se aplicó un filtro pasa banda de 154 Hz a 8 kHz a las señales crudas y fueron digitalizadas con una resolución de 12 bits. Sólo las neuronas unitarias con potenciales de acción con una razón de señal-ruido $\geq 3:1$ fueron analizadas. Los potenciales de acción fueron detectados y separados en línea usando una ventana de umbral tiempo-voltaje y un algoritmo de plantillas de tres componentes principales. Para todos los registros, las espigas fueron agrupadas usando el software Offline Sorter (Plexon, Dallas, Tx), y sólo las neuronas unitarias que mostraron una forma de neurona estable a lo largo de la sesión fueron incluidas en el análisis. En las tareas donde registramos dos tareas conductuales continuas (prueba de acceso breve seguido de optotagging, ver su descripción más adelante), correlacionamos la forma del potencial de acción registradas a lo largo de ambas sesiones para verificar su estabilidad a lo largo del registro (Figura 7)

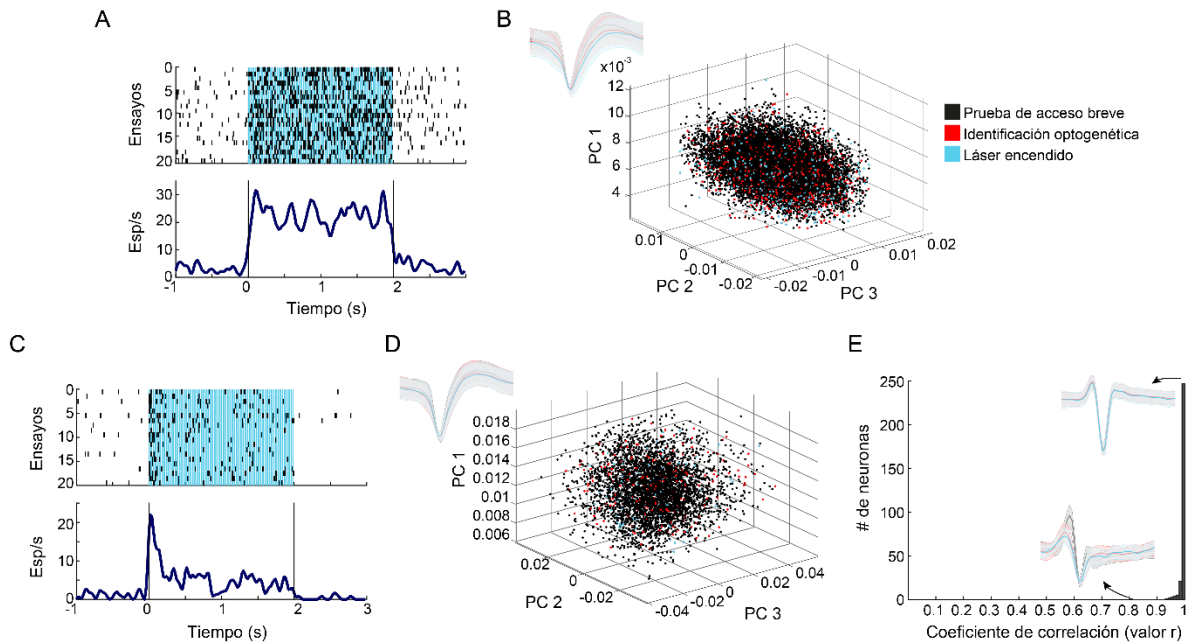


Figura 7. Estabilidad en la actividad unitaria registrada en el HL a lo largo de la prueba de acceso breve y optotagging. **A.** Gráfica tipo ráster que ilustra una neurona HL^{Vgat+} durante la sesión de optotagging. Cada marca negra representa un potencial de acción y las marcas azules los pulsos del láser. Debajo se muestra su PSTH de la tasa de disparo. Las líneas verticales negras indican el inicio del periodo de fotoestimulación (Tiempo = 0 s) y su término (Tiempo = 2 s), respectivamente. **B.** Promedio de los potenciales de acción de la neurona mostrada en A, a lo largo de la prueba de acceso breve (sombreado negro), durante el optotagging (sombreado rojo) y cuando se presentó el periodo de fotoestimulación en el optotagging (sombreado azul). *Panel derecho*, la nube de puntos forma un elipsoide compuesto de proyecciones 3-D de los tres componentes principales (PC1, PC2, PC3). Cada punto representa un potencial de acción durante toda la sesión de registro. **C-D.** Mismas convenciones que en las gráficas A-B. **E.** Histograma de los valores del coeficiente de correlación de Pearson. Se realizó una correlación Pearson entre la forma del potencial de acción durante la prueba de acceso breve y el periodo de optotagging en la misma sesión. Se muestran dos ejemplos de neuronas que ilustran el valor del coeficiente de correlación más alto y el más bajo.

8.6 Estimulación optogenética

Utilizamos un láser con una longitud onda de 473 nm, fue modulado mediante el sistema DPSS (OEM laser, UT, USA). Los pulsos del láser fueron sincronizados con los experimentos conductuales a través del software Med Associates Inc. y un generador de señal de salida TTL (Med Associates Inc., VT, USA). Se utilizó una potencia del láser de 15 mW, la cual fue medida en la terminal de la fibra óptica acoplada al láser con un medidor de potencia (PM20A, Thorlabs, NJ, USA) antes de cada sesión experimental. Previamente, durante la construcción de las fibras ópticas, se implantaron sólo aquellas que tuvieron una

eficiencia entre 10 a 12.6 mW. En la mayoría de los experimentos el láser fue encendido por 2 s (a 50 Hz) y posteriormente apagado por 4 s, con un ancho de pulso de 10 ms y un ciclo de trabajo al 50%.

8.7 Protocolos conductuales y análisis

A continuación, se describen los protocolos experimentales y sus análisis computados en orden de aparición. El análisis de datos se realizó utilizando los softwares MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA) y GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA). Utilizamos la media \pm eem con una α de 0.05.

8.7.1 Parámetros de estimulación optogenética

Para explorar los parámetros de fotoestimulación en las neuronas GABAérgicas del HL (Figura 8), ratones implantados con un optrodo fueron colocados en una caja conductual (de dimensiones 18 x 13 x 7.5 cm) sin alimento. El láser se encendió a diferentes frecuencias (2.5, 5, 10, 20 y 50 Hz) semi-aleatoriamente mientras se registró la actividad neuronal a lo largo de 20 min. Se utilizó una prueba Kruskal-Wallis para comparar la tasa de disparo entre el periodo basal (-1 a 0.04 s) y el periodo de fotoestimulación (0 a 2 s) para todas frecuencias presentadas. Las neuronas del HL que incrementaron significativamente su tasa de disparo durante la fotoestimulación se clasificaron como “Activadas”, mientras las neuronas que disminuyó su tasa de disparo significativamente se les etiquetó como “Inhibitorias”.

8.7.2 Actividad neuronal registrada durante la prueba de acceso breve y clasificación de las respuestas relacionadas a la palatabilidad.

Utilizamos una prueba de acceso breve con ratones privados de agua mientras registramos la actividad neuronal del HL durante 30 min (Figura 9). Estímulos gustativos fueron liberados a través de un haz de tres agujas de jeringas achatadas (calibre 20 G), las cuales se insertaron a lo largo de un sipper de acero inoxidable y se fijaron con acrílico dental. Cada aguja fue conectada a una válvula solenoide (Parker, Ohio, USA) a través de una manguera de silicón (Perez et al., 2013; Villavicencio et al., 2018). El volumen de la gota (~2 μ L) se calibró antes de iniciar la sesión y se mantuvo mediante el uso de un sistema de presión de aire constante que estaba conectado de manera individual. Se utilizó un sipper retráctil para anunciar el inicio y termino de cada ensayo. La secuencia de cada ensayo de la prueba de acceso breve fue el siguiente: Al inicio de la tarea el sipper está posicionado para recibir los lengüeteos. Para empezar un nuevo ensayo, cada sujeto debe insertar la cabeza en el puerto, y posteriormente debe dar un lengüeteo en seco para iniciar el periodo de recompensa (7 s). Durante este periodo, cada gota fue liberada en cada lengüeteo (lengüeteos recompensados). Una vez terminado el periodo de recompensa, el sipper se retrajo durante 3 s (intervalo entre ensayos; IEE), Al finalizar el IEE, el sipper vuelve a extenderse para iniciar un siguiente ensayo. Los estímulos gustativos (saliva artificial, agua, sacarosa al 3 y 18%) fueron liberados en orden semi-aleatorio.

Para identificar a las neuronas cuya frecuencia de disparo correlacionó con las respuestas oromotoras inducidas por cada estímulo gustativo, se empleó el análisis de “mejor ventana” (Villavicencio et al., 2018). Para ello, se calculó un Índice de Palatabilidad (IP) por cada sesión experimental, conformado por las medias de la tasa de lengüeteo durante todo el Periodo de Recompensa (esto es, el número de lengüeteos/ 7 s) y para cada estímulo

gustativo. Después, por neurona, calculamos la tasa de disparo neuronal en ventanas de diferentes tamaños (de 0.5 a 7 s en pasos de 0.5 s) centradas en diferentes tiempos (de 0.25 a 6.75 s en pasos de 0.5 s), lo que abarcó todo el periodo de recompensa; por lo tanto, cada ventana se estimaba como $\text{centro} \pm (\text{tamaño de la ventana}/2)$. Utilizando una prueba de Kruskal-Wallis (con un α de 0.05), identificamos las ventanas donde la media de la tasa de disparo neuronal fue estadísticamente significativa en al menos uno de los estímulos gustativos. Además, en cada ventana temporal, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r ; con un α de 0.05), entre el IP y la tasa de disparo (ensayo por ensayo), y se seleccionó la ventana con el coeficiente de correlación de Pearson más alto. Para todas las ventanas que tuvieron efectos significativos en las pruebas estadísticas (Kruskal-Wallis y correlación de Pearson), se les realizó una prueba de permutación para la corrección de pruebas múltiples. Este análisis se barajó 20,000 veces (utilizando la función “shuffle” en Matlab). Se obtuvo un valor p corregido utilizando la siguiente fórmula: $p = (k + 1) / (n + 1)$, donde k es el número de veces que el valor p -permutado fue menor al valor p -original, y n es el número de veces que se repitió el procedimiento. Sólo cuando las ventanas de tiempo mostraban un $p < 0.05$ en ambas pruebas (prueba de Kruskal-Wallis y el coeficiente de correlación de Pearson) fueron clasificadas como neuronas relacionadas a la palatabilidad. Por lo tanto, la “mejor ventana” es aquella en la que la tasa de disparo neuronal se correlaciona al máximo con el IP. Finalmente, las neuronas relacionadas a la palatabilidad se clasificaron como “Positiva” o “Negativa” de acuerdo con el valor de la correlación que mostraron. Los resultados fueron cualitativamente similares si se analiza la duración de la ráfaga de lengüeteos para computar el IP (Figura 9E-F). Definimos una ráfaga de lengüeteos, como el grupo de lengüeteos con al menos dos lengüeteos individuales separados por una pausa \geq a 500 ms durante el periodo de recompensa. La duración de cada ráfaga es la diferencia (en segundos) entre el último y el primer lengüeteo (Gutierrez et al., 2006).

Para evaluar si las neuronas relacionadas a la palatabilidad registran los cambios en la tasa de lengüeteo a lo largo de la sesión, computamos la tasa de lengüeteos o la tasa de disparo en el periodo de recompensa (número de lengüeteos/ 7 s; número de espigas/7 s) para cada estímulo gustativo. Dichas tasas se graficaron en bloques de percentil 10, y cada bloque tiene el mismo número de ensayo (Figura 10).

8.7.3 Tarea de fotoidentificación (Optotagging)

Al término de la prueba de acceso breve comenzó una sesión de optotagging (Figura 11, *panel de arriba*). Para esta tarea se removió el bebedero de la caja conductual, y durante una sesión de 15 min el láser se mantuvo encendido (a 50 Hz) durante 2 o 7 s, seguido de un periodo de fotoestimulación de 10 s. Las neuronas del HL activadas por el láser (pHL^{Vgat} , Figura 11A-D) fueron detectadas utilizando dos métodos: 1) una prueba Kruskal-Wallis para comparar la tasa de disparo entre el periodo basal (-1 a 0.04 s) y la actividad neuronal en el período de fotoestimulación (0 a 2 s, alineado al inicio del láser). 2) El estadístico de la suma acumulativa (CUMSUM, por sus siglas en inglés) para identificar las neuronas que incrementaron significativamente su tasa de disparo inmediatamente después del primer pulso del láser (0 a 15 ms) en comparación con el periodo basal (-20 a 0 ms) (Gutierrez et al., 2006). Para observar la respuesta neuronal evocada, se utilizó un bin con una resolución de 1 ms. Sólo las neuronas que mostraron un valor significativo en alguna de las dos pruebas fueron etiquetadas como pHL^{Vgat} . De este grupo de neuronas, se identificó a la subpoblación neuronal que expresó el ChR2 en su soma (HL^{Vgat+} , Figura 11E-I), utilizando el estadístico CUMSUM. Este grupo presentó un potencial de acción con una latencia menor a 15 ms posterior al primer pulso del láser (Buonomano, 2003). Además, clasificamos a las neuronas No-GABAérgicas (Figura 11J-M), utilizando una prueba Kruskal-Wallis, como aquellas que disminuyó su tasa de disparo significativamente ante la presentación

del láser (similar a las neuronas “Inhibitorias” de la Figura 8). Las neuronas que no se modularon con respecto al periodo basal fueron clasificadas como No moduladas.

8.7.4 Protocolo de lazo abierto con una opción

El panel frontal de una caja operante (Med Associates Inc. VT, USA), fue equipado con un bebedero que contenía sacarosa al 10%. Se registraron individualmente los lengüeteos a través de un medidor que indicaba cada que se emitía un lengüeteo en el sipper (Med Associates Inc. VT, USA). Para este este protocolo, se presentaron bloques alternados de 5 min con fotoestimulación y 5 min sin fotoestimulación (Nieh et al., 2016) a lo largo de una sesión de 40 min (Figura 12). Durante los bloques con fotoestimulación, el láser fue encendido sin importar la conducta y la posición espacial del sujeto. En cada sesión se presentó una frecuencia por día: 0, 2.5, 10, 20 y 50 Hz. Se calculó el índice de consumo ligado al láser, medido como el número de lengüeteos ocurridos durante los 2.5 s a partir del inicio de la fotoestimulación, dividido entre el número total de lengüeteos de la sesión.

8.7.5 Protocolo de lazo abierto con tres opciones

Para la Figura 13, un nuevo grupo de sujetos se colocaron en una caja operante equipada con tres puertos: agua (puerto central), sacarosa al 3% (puerto lateral izquierdo) y sacarosa al 18% (puerto lateral derecho). Las soluciones de los puertos laterales se contrabalancearon entre animales. Se utilizó un protocolo de estimulación de lazo abierto (bloques alternados de 5 min de fotoestimulación y 5 min sin fotoestimulación). La tarea constó de 4 días basales (donde no se presentó la fotoestimulación a lo largo de la sesión, datos no mostrados) y 11 días de prueba.

Durante esta tarea registramos en video dos parámetros (Figura 14): 1) La *distancia* entre la cabeza del ratón y cada uno de los sippers (medido en pixeles, 100 pixeles corresponden aproximadamente 6 cm). 2) El *ángulo* relativo entre la cabeza del ratón y cada uno de los sippers (medida en grados). Un ángulo de 0° significa que el ratón está mirando directamente hacia el sipper y uno de 180° se encuentra mirando al lado opuesto. Ambas mediciones se calcularon para cada fotograma del video. Para este análisis, se extrajeron la posición de los sippers y tres puntos anatómicos del animal (nariz, cuello y base de la cola) a través de la paquetería DeepLabCut para Python (Mathis et al., 2018; Nath et al., 2019). Definimos la posición del ratón como las coordenadas donde se localizaba su nariz a lo largo de todo el vídeo; mientras que la dirección de la cabeza, la definimos como un vector (2D) formado desde el cuello hasta la nariz del animal. La posición del ratón y la dirección de su cabeza se extrajeron del primer pulso del láser del tren de estimulación, y se analizó la siguiente ventana de 6 s para cuantificar si los ratones emitieron lengüeteos en cualquier de los tres puertos. Posteriormente construimos una matriz bidimensional que contiene la probabilidad de lengüeteo en cualquiera de los tres sippers dada la distancia y el ángulo del ratón durante 6 s a partir del primer pulso del láser.

8.7.6 Protocolo lazo abierto en un campo abierto

Los animales fueron colocados en el centro de una arena circular (50 cm de diámetro), Figuras 15 y 16. Tres o dos platos de comida se posicionaron de manera equidistante uno del otro. Cada uno contenía un pellet de dieta chow, o un pellet de dieta alta en grasas, o un cubo de sacarosa granulada. Los ratones fueron fotoestimulados utilizando el protocolo de lazo abierto, previamente descrito. Todas las sesiones fueron grabadas y analizadas con el software bonsai. Analizamos el centroide del ratón en cada fotograma de la grabación, esta información fue utilizada para crear un mapa de calor de su posición dentro de la arena.

Además, medimos la distancia relativa del centroide del sujeto a cada uno de los estímulos. Indicamos como interacción entre el sujeto y el estímulo, cuando la distancia entre ambos fue menor a 60 mm y permaneció al menos 1 s. Al termino e inicio de cada sesión se pesaron cada uno de los platos de comida.

8.7.7 Protocolo de lazo cerrado con tres opciones

En este protocolo, la fotoestimulación fue liberada cuando el sujeto introducía la cabeza al puerto central por 2 s, seguido de un tiempo fuera de 4 s post-fotoestimulación (Figura 17, se utilizó el mismo grupo de ratones de Figura 13). A lo largo de 11 sesiones (de 40 min cada una), los animales fueron probados en una caja operante con tres puertos (agua, puerto central; sacarosa al 3%, puerto lateral izquierdo; sacarosa al 18%, puerto lateral derecho). El índice de preferencia a sacarosa durante el periodo de estimulación fue medido como el número de lengüeteos al 18% entre la suma de lengüeteos a sacarosa al 18% y agua. Los valores mayores a 0.5 indican preferencia a sacarosa.

8.7.8 Protocolo de lazo cerrado con diferentes opciones en el puerto central

Se utilizó el mismo grupo de ratones de la tarea anterior, se remplazó el estímulo del puerto central a lo largo de las sesiones.

Tabla 1. Protocolos de la Figura 20

Estímulo en el puerto central	Sesiones
Agua	Últimas 5 sesiones de la Figura 17
Extinción (Sin fotoestimulación)	4
Agua	3
Bebedero vacío	3
Agua	3

Quinina al 0.004%	4
Soplo de aire	4
Soplo de aire inevitable	3
Sacarosa al 18% (el Agua fue colocada en el puerto de sacarosa al 18%)	4

8.7.9 Protocolo de lazo cerrado en un campo abierto

Utilizando el mismo grupo de ratones de la tarea anterior, en una arena circular se colocaron 4 estímulos en platos de comida en posición equidistante. Cada plato contenía dieta chow, o pellets de chocolate, o un corcho, o un bebedero con una solución de sacarosa al 10% (Figura 19). Durante la sesión, se utilizó un programa realizado en nuestro laboratorio para registrar la posición del sujeto en tiempo real. Para recibir la fotoestimulación (2 s el láser se mantuvo encendido y 4 s apagado), cada sujeto debía entrar en un área designada que rodeaba a cada plato de comida. Los ratones debían salir y volver a entrar al área designada para iniciar una nueva fotoestimulación (nuevo ensayo). Al término e inicio de cada sesión se pesaron cada uno de los platos de comida.

8.7.10 Protocolo lazo cerrado (una sola botella)

Un nuevo grupo de ratones fueron colocados en una caja conductual (18 x 13 x 7.5 cm), equipada con un puerto y un bebedero en la pared frontal (Figura 21). En este bebedero, se colocó quinina al 0.004 % o sacarosa al 18% en ratones saciados y privados de agua durante 3 y 2 sesiones, respectivamente. Los animales fueron fotoestimulados utilizando un protocolo de lazo cerrado (la fotoestimulación fue liberada cuando el sujeto introducía la cabeza al puerto central por 2 s, seguido de un tiempo fuera de 4 s post-fotoestimulación). Los animales privados de agua tuvieron acceso *ad libitum* por una 1 hora al término de la sesión.

8.7.11 Fotoestimulación durante una prueba de acceso breve

Para evaluar si la activación de las neuronas GABAérgicas mejoran las respuestas oromotoras relacionadas a la palatabilidad, utilizamos una prueba de acceso breve con un nuevo grupo de ratones ingenuos durante 31 sesiones (Figure 22). Las condiciones experimentales fueron las mismas descritas anteriormente (Figura 9), y como estímulos gustativos entregamos agua, sacarosa al 3 y 18% (en orden semi-aleatorio). La secuencia de cada ensayo fue el siguiente: El sujeto debe insertar la cabeza en el puerto para encender el láser, posteriormente, debe dar un lengüeteo en seco para iniciar el periodo de recompensa (7 s). Durante este periodo, cada gota fue liberada en cada lengüeteo (lengüeteos recompensados). Una vez terminado el periodo de recompensa, el sipper se retrajo durante 3 s (intervalo entre ensayos; IEE). Al finalizar el IEE, el sipper vuelve a extenderse para iniciar un siguiente ensayo. La duración del láser se modificó entre sesiones por 2 s o 7 s (abarcando casi todo el periodo de recompensa). Esta última modificación se realizó con la finalidad de probar si el lengüeteo evocado por la activación del láser puede mantenerse durante todo el periodo de recompensa. La fotoestimulación se liberó durante todos los ensayos de la prueba o asociada a sólo un tipo de ensayo. Al final de la sesión, los animales tuvieron acceso libre a agua durante 1 hora. Los protocolos utilizados se describen en la siguiente tabla:

Tabla 2. Protocolos de la prueba de acceso breve con fotoestimulación

Láser encendido	Tiempo encendido	# Sesiones
Todos los ensayos	2 s	6
Ensayos de agua	2 s	3
Ensayos de sacarosa al 3%	2 s	3
Ensayos de sacarosa al 18%	2 s	3
Todos los ensayos	7 s	4
Ensayos de agua	7 s	3

Ensayos de sacarosa al 3%	7 s	3
Ensayos de sacarosa al 18%	7 s	3
Láser falso (ensayos de sacarosa al 3%) *	7 s	3

*Para el láser falso, los ratones fueron conectados a una fibra falsa (no estaba conectada al láser), y se pegó a la fibra óptica real. La fibra óptica real se colocó por encima de la cabeza del ratón para emitir una luz azul.

9. RESULTADOS

9.1 Parámetros de fotoestimulación

Primero determinamos los parámetros ideales de estimulación optogenética para activar a las neuronas GABAérgicas del HL. Para ello, implantamos un optrodo en ratones ingenuos que expresan constitutivamente el ChR2 (fusionado con gen reportero EYFP) en las neuronas GABAérgicas que expresan el gen del VGAT (Zhao et al., 2011) (Figura 8A-B). Encontramos que el láser a una frecuencia a 50 Hz induce la respuesta neuronal más fuerte (Figura 8D-F). Al menos que se mencione, utilizamos esta frecuencia para los siguientes experimentos.

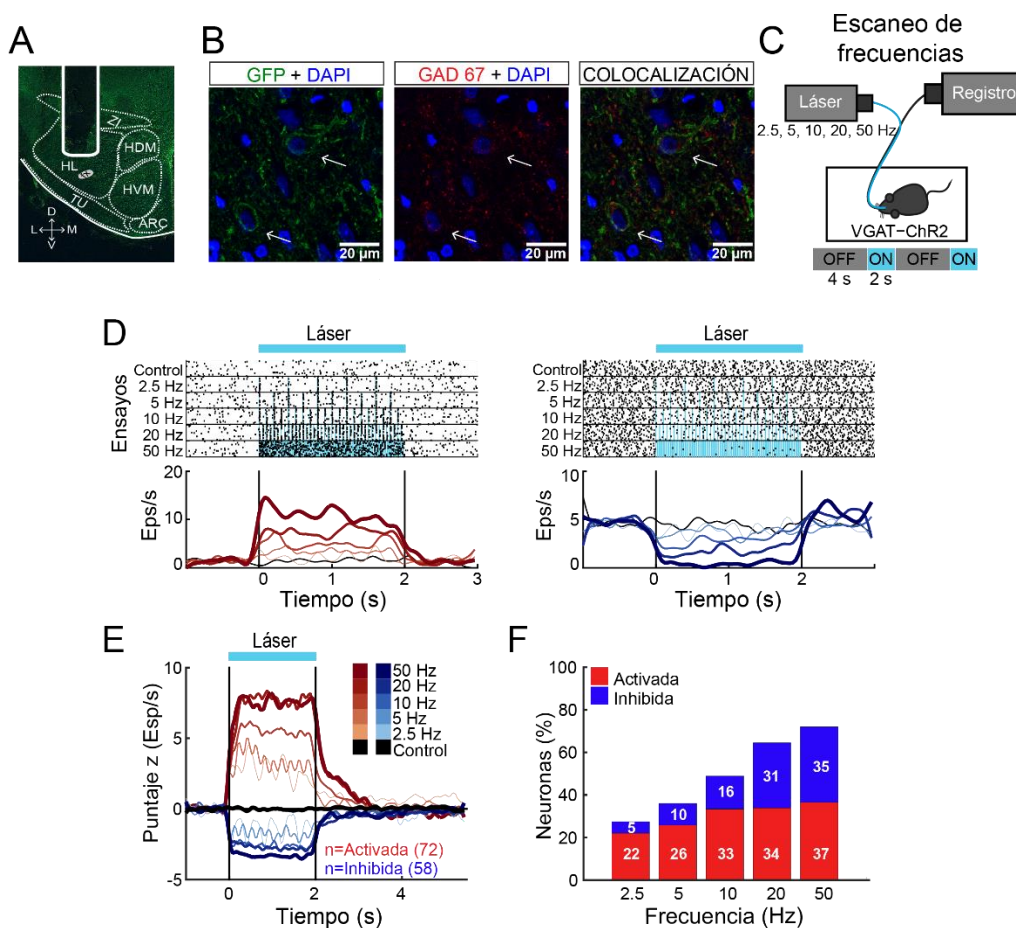


Figura 8. La fotoestimulación a 50 Hz promueve la respuesta neuronal más robusta. A. Imagen representativa de la ubicación del optrodo en el HL de un ratón VGAT-ChR2. **B.** Imágenes representativa de una inmunotinción contra GFP (verde), GADG67 (rojo) y DAPI (azul) en el HL. Las flechas indica el empalme entre el ChR2-EYFP y la GAD67. **C.** Esquema del registro

electrofisiológico y la activación optogenética. Los ensayos control (sin láser) y con fotoestimulación a 2.5, 5, 10, 20 y 50 Hz se liberaron semi-aleatoriamente. **D.** Gráficas tipo ráster de dos neuronas registradas en el HL durante la presentación del láser. La primera neurona presenta una respuesta de activación (*panel izquierdo*), y la segunda inhibitoria. Cada marca negra representa un potencial de acción y las marcas azules son los pulsos del láser. Debajo de cada gráfica tipo ráster se muestra su PSTH de la tasa de disparo (Espigas/s; Esp/s). Los gradientes en color rojo y azul indican la frecuencia de estimulación (ver en E la barra de color). El trazo negro representa la actividad durante los ensayos control. Las líneas verticales negras indican el inicio del periodo de fotoestimulación (Tiempo = 0 s) y su término (Tiempo = 2 s). **E.** Respuesta poblacional del HL en ratones VGAT-ChR2 (n=5). Actividad neuronal normalizada, el gradiente de colores rojo y azul ilustran las neuronas activadas e inhibidas que se activaron significativamente en comparación con el periodo basal (-1 a 0 s). La línea negra ilustra los ensayos control de todas las neuronas registradas (n=186). **F.** El porcentaje de neuronas es reclutado en función de la frecuencia presentada.

9.2 Las neuronas del Hipotálamo Lateral codifican las respuestas oromotoras de palatabilidad a sacarosa.

Experimentos con registros electrofisiológicos en ratas sugieren que las neuronas del HL procesan la información relacionada a la palatabilidad (Norgren, 1970; Schwartzbaum, 1988; Yamamoto et al., 1989; Li et al., 2013). Basado en estos resultados, nos preguntamos si las neuronas del HL podrían proveer información sobre la palatabilidad de la sacarosa. Para ello, registramos la actividad neuronal en ratones VGAT-ChR2 privados de agua mientras ejecutaban una prueba de acceso breve, donde se entregaron como estímulos gustativos: saliva artificial, agua, sacarosa al 3 y 18 % (Figura 9A). De un total de 284 neuronas identificamos aquellas que codificaron la palatabilidad de la sacarosa mediante un análisis llamado “mejor ventana” (Villavicencio et al., 2018). Este análisis nos permitió detectar el intervalo óptimo (sombra café, Figura 9B), donde la tasa de disparo neuronal mostró la mayor correlación con el índice de palatabilidad (IP). El IP indica el promedio de la tasa de lengüeteos (o el tamaño de la ráfaga de lengüeteos) durante el periodo de recompensa de cada uno de los estímulos gustativos entregados en cada sesión (Figura 9C, ANOVA de 1 vía, $F_{(3, 108)} = 10.35$, $p < 0.0001$). La Figura 9B ilustra dos ejemplos de neuronas representativas con información relacionada a la palatabilidad: La primera incrementa su actividad en función del aumento de la concentración de sacarosa y muestra

una correlación positiva entre el IP y tasa de disparo ($r = 0.87$, sombra café; Figura 9B, *panel izquierdo*), este tipo de neuronas se clasificó como positiva a la palatabilidad. Y la segunda neurona, disminuye negativamente su actividad asociada a la respuesta oromotora evocada por la sacarosa y muestra una correlación negativa entre el IP y su actividad neuronal ($r = -0.64$, sombra café; Figura 9B, *panel derecho*), a este grupo se le llamó neuronas con palatabilidad negativa a la sacarosa. La Figura 9D muestra el promedio de la actividad normalizada tanto de las neuronas que mostraron una correlación positiva (59/284 neuronas, 21%) como de las negativas (76/284, 27%) con el IP. Además, encontramos resultados cuantitativamente similares al utilizar el tamaño de la ráfaga de lengüeteos para calcular el IP (Figura 9E-F; ANOVA de 1 vía $F_{(3, 108)} = 2.926$, $p < 0.05$). Estos datos confirman que las neuronas del HL exhiben respuestas relacionadas a la palatabilidad, y su actividad se correlaciona positiva o negativamente con el IP de las soluciones de sacarosa.

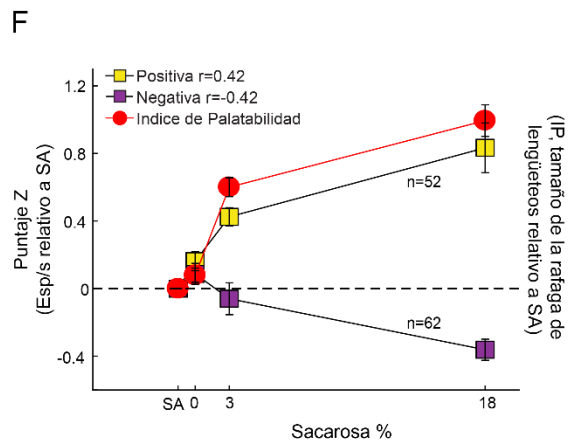
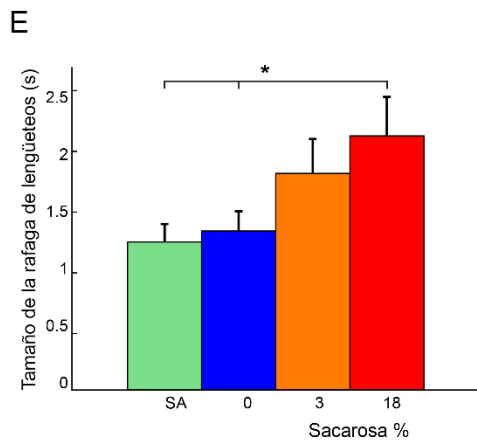
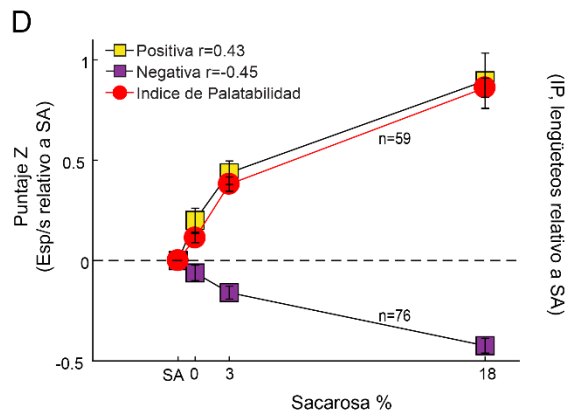
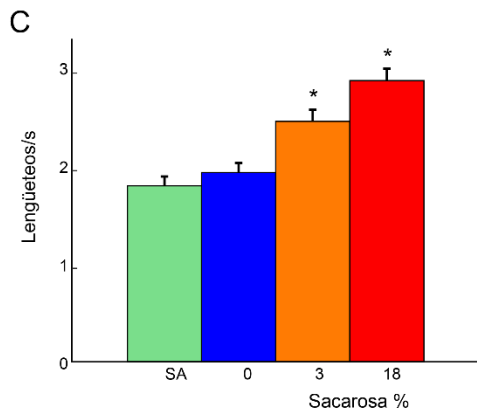
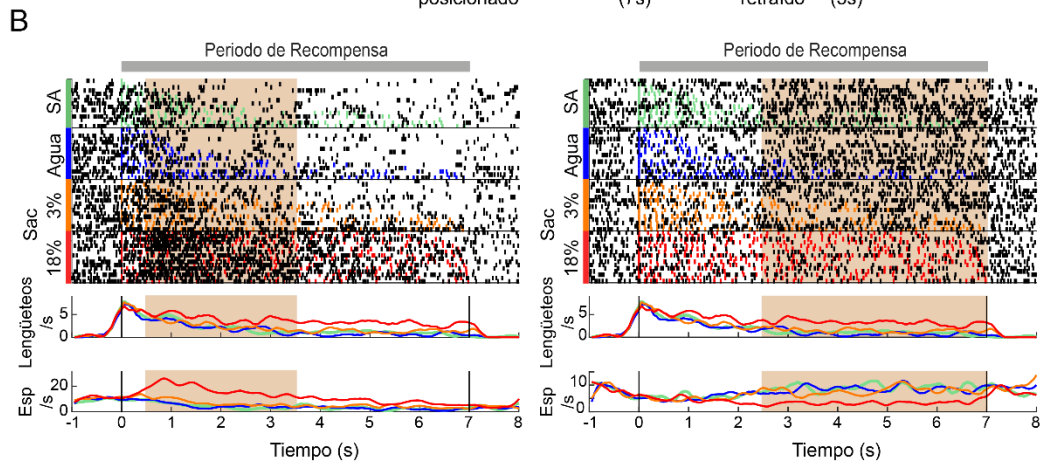
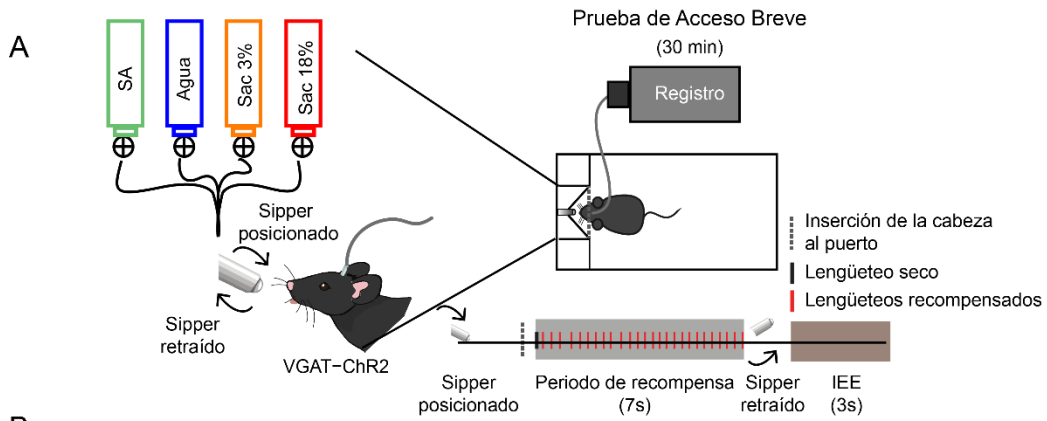


Figura 9. Las neuronas del HL procesan la información relacionada a la palatabilidad de la sacarosa **A.** Esquema de la prueba de acceso breve. La tarea se realizó en una caja conductual equipada con un sipper retráctil controlada por una interfaz. Cada lengüeteo liberó una gota de saliva artificial (AS), agua, sacarosa al 3 o 18%. El inicio del ensayo comienza con la inserción de la cabeza del ratón en el puerto (línea gris punteada). Posteriormente, el ratón debe emitir un lengüeteo en seco (línea negra) para iniciar el periodo de recompensa. Durante este periodo, cada lengüeteo (líneas rojas) libera una gota de uno de los cuatro estímulos gustativos en orden semi-aleatorio. Al término del periodo de recompensa, el sipper se retrae por un IEE de 3 s. Al finalizar este tiempo, el sipper vuelve posicionarse para iniciar un nuevo ensayo. **B.** Gráficas tipo ráster de dos neuronas del HL registradas durante la prueba de acceso breve. Cada marca negra representa una espiga, y los lengüeteos están marcados de acuerdo con el código de color de cada estímulo gustativo (verde, SA; azul, agua; anaranjado, sacarosa al 3%; rojo, sacarosa al 18%). El rectángulo gris indica el Periodo de Recompensa (0 a 7 s). Debajo de cada gráfica tipo ráster, se muestra los PSTH para la tasa de lengüeteo (lengüeteos/s) y la tasa de disparo (Esp/s) de cada tipo de ensayo. Cada gráfica está alineada al primer lengüeteo recompensado (Tiempo = 0 s). La sombra café ilustra la “mejor ventana” encontrada, es decir, el periodo de máxima correlación entre la tasa de disparo y el índice de palatabilidad (IP). **C.** Promedio de la tasa de lengüeteo durante el periodo de recompensa. Se observa una mayor palatabilidad de acuerdo con el incremento de la concentración de sacarosa. **D.** Actividad neuronal normalizada (relativo a los ensayos de SA) de las neuronas del HL que mostraron una correlación positiva o negativa ante el IP (círculos rojos). **E.** Promedio del tamaño de la ráfaga de lengüeteos durante el periodo de recompensa. **F.** Actividad neuronal normalizada (relativo a los ensayos de SA), utilizando como IP al tamaño de la ráfaga de lengüeteos.

9.3 Rastreo dinámico de las neuronas del HL relacionadas a palatabilidad, a lo largo de la sesión de la prueba de acceso breve

Exploramos si las neuronas relacionadas a la palatabilidad (Figura 9D) pueden ajustar dinámicamente su respuesta a lo largo de la sesión cuando el animal comienza a acercarse al estado de saciedad. Para ello, calculamos la tasa de lengüeteo y la tasa de disparo durante el periodo de recompensa, y graficamos ambas tasas a lo largo de la sesión en bloques de percentil 10 de los ensayos (de esta forma garantizamos que cada bloque tenga el mismo número de ensayos). Encontramos, que la tasa de lengüeteos disminuyó a lo largo de la sesión dependiendo de la palatabilidad (Figura 10A; ANOVA MR, efecto de estímulos $F_{(3, 402)} = 163.7$, $p < 0.0001$, efecto de tiempo $F_{(9, 1206)} = 100.4$, $p < 0.0001$, y la interacción entre el efecto de estímulos y tiempo $F_{(27, 3618)} = 16.54$, $p < 0.0001$). Al inicio de la sesión, los sujetos muestran una mayor tasa de lengüeteos por los cuatro estímulos presentados, pero a medida que la sesión avanza, la tasa de lengüeteo decrece para los estímulos de SA y agua, pero no para la concentración más alta de sacarosa (18%). Asimismo, las neuronas relacionadas a la palatabilidad (tanto las que incrementan o disminuyen su tasa

de disparo) ajustan su actividad a lo largo de la sesión, reflejando el proceso de palatabilidad (Figura 10B). Estos datos sugieren, que a medida que los animales se acercan al estado de saciedad, estas neuronas rápidamente rastrean la disminución de la tasa de lengüeteo de los estímulos de SA y agua, sin embargo; esto no sucede de la misma manera para las concentraciones de sacarosa. Resultados similares se han encontrado en las neuronas que codifican palatabilidad del NAc shell (Villavicencio et al., 2018), y se ha sugerido que este tipo de neuronas está codificando la palatabilidad y no un estado interno del animal.

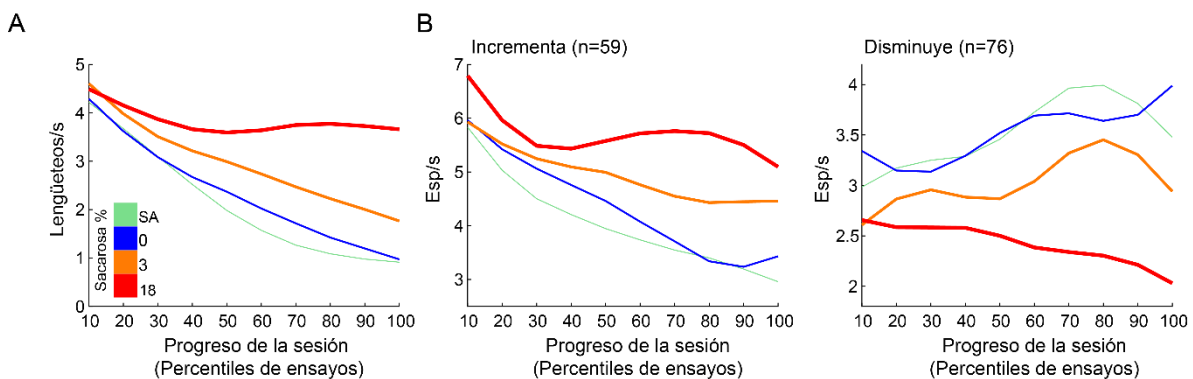


Figura 10. Las neuronas relacionadas a palatabilidad del HL rastrean los cambios en la tasa de lengüeteo promovidos por la palatabilidad de la sacarosa a lo largo de la sesión. A. PSTH poblacional de la tasa de lengüeteo durante el periodo de recompensa. El código de color indica los estímulos gustativos liberados en los ensayos (tipo de ensayo). La gráfica está dividida en percentiles 10 de cada tipo de ensayo. B. PSTH poblacional de la tasa de disparo durante el periodo de recompensa de las neuronas relacionadas a la palatabilidad a lo largo de la sesión, por tipo de ensayo. *Panel izquierdo*, muestra las neuronas que respondieron más sacarosa (neuronas con correlación positiva a la palatabilidad; Figura 9D-cuadrados amarillos), mientras que el *panel derecho*, ilustra las neuronas que disminuyó su tasa de disparo en función de la concentración de la sacarosa (neuronas con correlación negativa a la palatabilidad; Figura 9D-cuadrados morados).

9.4 Una subpoblación de neuronas HL^{Vgat+} identificadas optogenéticamente codifican la palatabilidad de la sacarosa

Para identificar las neuronas GABAérgicas del HL que contienen el ChR2 (HL^{Vgat+}), fotoestimulamos a los ratones VGAT-ChR2 al término de la prueba de acceso breve. La Figura 11A muestra la actividad neuronal normalizada de las neuronas activadas por el láser (48%; 137/284), a las cuales llamamos neuronas putativas GABAérgicas del HL (pHL^{Vgat+}). Este grupo incluye a las neuronas que contienen el ChR2 en los somas (monosinápticas),

y neuronas polisinápticas, que posiblemente se modularon por la activación de fibras aferentes provenientes de otras regiones cerebrales (Nieh et al., 2015). Posteriormente, evaluamos si las neuronas pHL^{Vgat} correlacionaban con la palatabilidad de la sacarosa. Encontramos que el 50% (69/137) de las neuronas pHL^{Vgat} exhiben respuestas significativas relacionadas a la palatabilidad. Específicamente, el 34% correlaciona positivamente (46 de 137), mientras que el 17% (23 de 137) tiene una correlación negativa con la palatabilidad (Figura 11B, Neuronas Positivas vs. Negativas, prueba chi-cuadrada $(1, 274) = 10.25, p < 0.01$). La Figura 11C muestra la actividad poblacional de las neuronas pHL^{Vgat} que mostraron una correlación positiva o negativa con el IP. Además, encontramos que el 78% (46/59) de las pHL^{Vgat} pertenece al grupo de neuronas relacionadas positivamente con la palatabilidad (Figura 11D) previamente descritas (ver Figura 9D). Por el contrario, sólo el 30% (23/76) de las neuronas pHL^{Vgat} pertenece al grupo que se correlacionó negativamente con la palatabilidad (Figura 11D, Neuronas Positivas vs. Negativas, prueba chi-cuadrada $(1, 135) = 30.25, p < 0.0001$). Por lo tanto, las pHL^{Vgat} codifican positivamente la sacarosa. Para diferenciar a las neuronas que expresan el ChR2 en los somas (HL^{Vgat+}) del resto de la población de las neuronas pHL^{Vgat} , identificamos aquellas neuronas que evocaron un potencial de acción con una latencia temprana (< 15 ms) ante la presentación de un breve pulso del láser. Este análisis refleja que nuestro modelo contiene neuronas que expresan el ChR2 en los somas y no en las proyecciones (Buonomano, 2003). De la población pHL^{Vgat} , un total de 52% (71 de 137) muestran una respuesta temprana a la estimulación del láser (Figura 11E-F); estas neuronas conformaron el grupo de las neuronas HL^{Vgat+} . Encontramos que el 31% de las neuronas HL^{Vgat+} correlaciona positivamente con la palatabilidad de la sacarosa (22 de 71), y un 24% correlacionaron negativamente (17 de 71) (Figura 11G, Neuronas Positivas vs. Negativas, prueba chi-cuadrada $(1, 142) = 0.88, p = 0.34$). La Figura 11H muestra la actividad de este grupo, neuronas que correlacionaron positiva o negativamente con el IP. Una vez más, comparamos la proporción de las HL^{Vgat+}

que pertenece al grupo de las neuronas relacionadas a la palatabilidad. El 37% (22 de 59) pertenece al subgrupo que correlacionó positivamente con IP, mientras sólo el 22% (17 de 76) correlacionó negativamente (Figura 11I, Neuronas Positivas vs. Negativas, prueba chi-cuadrada $(1, 135) = 3.59, p = 0.057$). En conjunto, estos datos sugieren que las neuronas HL^{Vgat+} tienden a codificar la palatabilidad de la sacarosa de manera positiva. Estos datos coinciden con la idea de que las neuronas HL^{Vgat+} contienen subpoblaciones con diferentes respuestas funcionales, al menos un conjunto responde a conductas apetitivas y otro a conductas consumatorias (Jennings et al., 2015).

9.5 Las neuronas no-GABAérgicas del HL codifican negativamente la palatabilidad de la sacarosa.

Por otro lado, encontramos un 25% de neuronas del HL que mostraron una inhibición durante el periodo de fotoestimulación (70 de 284; Figura 11J), a este grupo lo llamamos neuronas no-GABAérgicas. Distinto a las neuronas HL^{Vgat+} , sólo un 7% (5 de 70) de estas neuronas mostraron una correlación positiva al IP, mientras la mayor parte de ellas (36%, 25 de 70) exhibieron una correlación negativa a la palatabilidad de la sacarosa (Figura 11K, Neuronas Positivas vs. Negativas, prueba chi-cuadrada $(1, 140) = 16.97, p < 0.0001$). Estos resultados indican que las neuronas no-GABAérgicas (posiblemente neuronas glutamatérgicas que expresan el receptor $Vglut2$) codifican negativamente la palatabilidad de la sacarosa (Figura 11M, Neuronas Positivas vs. Negativas, prueba chi-cuadrada $(1, 135) = 11.46, p < 0.001$).

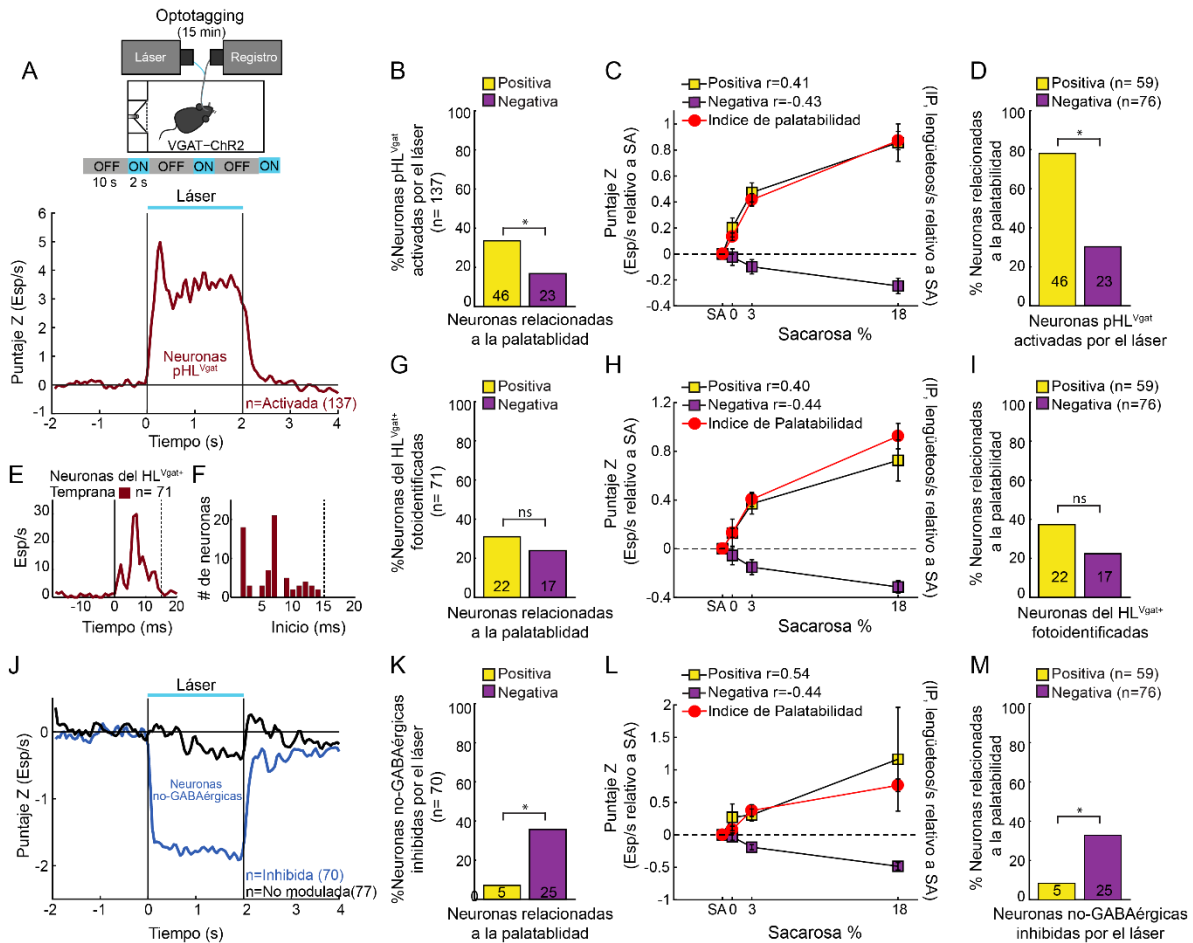


Figura 11. Una subpoblación de las neuronas HL^{Vgat+} codifican la palatabilidad de la sacarosa. **A.** Para confirmar la identificación de las HL^{Vgat+}, después de la prueba de acceso breve y en la misma caja conductual (sin el sipper), fotoestimulamos el mismo grupo de ratones transgénicos VGAT-ChR2. El láser se mantuvo encendido durante 2 s (a 50 Hz) y apagado por 10 s a lo largo de la sesión (15 min), *panel superior*. Debajo, se muestra la actividad poblacional normalizada de las neuronas pHL^{Vgat} que se activaron durante la presentación del láser, relativo al periodo basal (-1 a 0 s). Las respuestas están alineadas al inicio del láser (Tiempo = 0 s). **B.** Porcentaje de neuronas cuya actividad (en la prueba de acceso breve) se correlacionó positiva o negativamente con el IP, y que fueron activadas por el láser (neuronas pHL^{Vgat}, n = 137; 10A). Prueba chi-cuadrada, * p < 0.01. **C.** Actividad poblacional normalizada (relativo a la SA) de las neuronas mostradas en B. **D.** Porcentaje de neuronas activadas por el láser (pHL^{Vgat}) que muestran correlación positiva o negativa al IP. Prueba chi-cuadrada, * p < 0.0001. **E.** PSTH de las neuronas identificadas optogenéticamente. Estas neuronas (HL^{Vgat+}) evocan potenciales de acción tempranos (< 15 ms) ante el primer pulso del láser. **F.** Histograma de las neuronas HL^{Vgat+}, se observan latencias menores a los 15 ms (línea punteada). **G-I.** Neuronas HL^{Vgat+} que codifican la palatabilidad de la sacarosa. Las gráficas muestran las mismas convenciones que las figuras B-D. **J-N.** Las neuronas no-GABAérgicas codifican negativamente la palatabilidad de la sacarosa. **J.** Los trazos azul y negro ilustran las neuronas que se inhibieron (neuronas no-GABAérgicas) y las que no fueron moduladas con el láser, respectivamente. Mismas convenciones que en A. **K-M.** Las gráficas muestran las mismas convenciones que las figuras B-D. Prueba chi-cuadrada, * p < 0.001.

9.6 La activación de las neuronas HL^{Vgat+} promueven el consumo de la sacarosa

Para establecer los parámetros necesarios de fotoestimulación que inducen el consumo de sacarosa utilizamos un protocolo de lazo abierto. Encendimos y apagamos el láser en bloques de 5 minutos a lo largo de la sesión, mientras los ratones saciados tuvieron acceso *ad libitum* a un bebedero con sacarosa al 10% (Figura 12A), y presentamos una frecuencia diferente por sesión (0, 2.5, 5, 10, 20 y 50 Hz). Encontramos un incremento en el consumo en función de la frecuencia del láser (Figura 12B, ANOVA de 2 vías, interacción entre el efecto frecuencia y bloques de estimulación $F_{(35, 96)} = 2.268$, $p < 0.01$), y la prueba de post-hoc mostró que en los primeros tres bloques de estimulación a 50 Hz (Figura 12B, Bloques 2, 4 y 6), los ratones VGAT-ChR2 incrementan su consumo significativamente en comparación con los bloques sin estimulación optogenética. (Figura 12B, Bloques 1, 3 y 5). La Figura 12C muestra una gráfica tipo ráster donde se ilustra la conducta alimenticia de un ratón transgénico que fue fotoestimulado a 50 Hz. El inicio de la ingesta durante los bloques de estimulación tuvo una latencia de $0.72 \text{ s} \pm 0.03 \text{ s}$ y se detuvo segundos después del término de la estimulación ($0.27 \text{ s} \pm 0.01 \text{ s}$; Figura 12C, rectángulos azules). Además, observamos un incremento en el índice del consumo ligado al laser (esto es, número de lengüeteos en una ventana de tiempo de 2.5 s, desde el inicio del láser, dividido por el número total de lengüeteos en la sesión), en el grupo de ratones VGAT-ChR2 en comparación con el grupo WT, que es directamente proporcional al aumento de la frecuencia del láser (Figura 12D, ANOVA de 2 vías, interacción del grupo y la frecuencia de estimulación; $F_{(5, 36)} = 12.86$, $p < 0.0001$). Nuestros datos indican que 50 Hz es la mejor frecuencia de fotoestimulación para evocar respuestas neuronales y la ingesta de sacarosa.

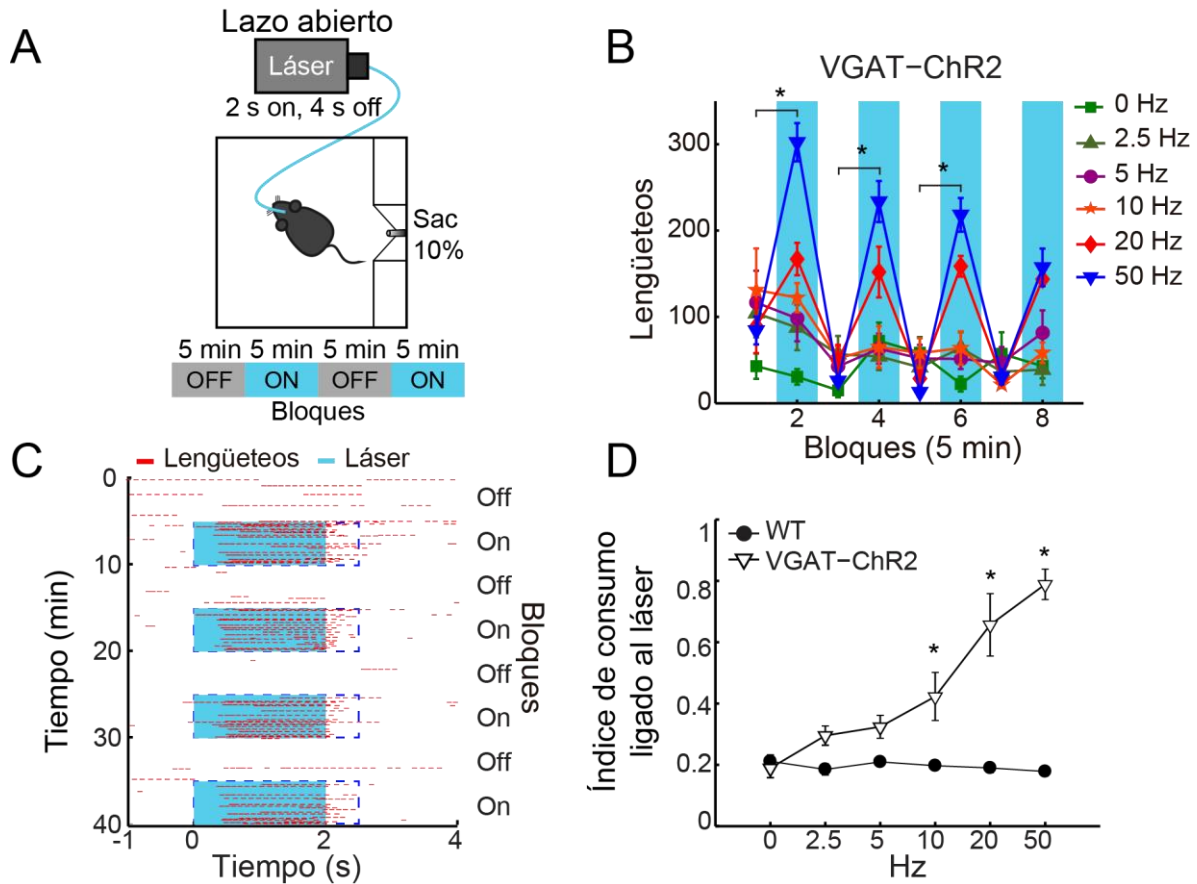


Figura 12. La fotoestimulación a 50 Hz induce el mayor consumo en ratones saciados VGAT-ChR2. **A.** Esquema conductual del protocolo de lazo abierto. La caja conductual fue equipada con un bebedero en el puerto central que contenía una solución de sacarosa al 10%. Los sujetos tuvieron acceso libre durante toda la sesión. El protocolo de fotoestimulación de lazo abierto comprende bloques alternados de 5 min (apagado/encendido) a lo largo de la sesión (40 min). Se presentó una frecuencia de fotoestimulación por día, en orden ascendente (0, 2.5, 5, 10, 20 y 50 Hz). **B.** La activación de las neuronas HL^{Vglut+} induce el consumo de sacarosa (10%) de manera frecuencia-dependiente. * Muestra la diferencia significativa ($p < 0.001$) entre los bloques con fotoestimulación y los bloques donde el láser se mantuvo apagado en la sesión de 50 Hz. **C.** Gráfica tipo ráster durante el protocolo de lazo abierto de un ratón VGAT-ChR2, utilizando 50 Hz. Cada marca roja indica un lengüeteo ocurrido de -1 hasta 4 s a partir del encendido del láser. Bloques de fotoestimulación marcados por rectángulos azules. El índice de consumo ligado al láser (rectángulos punteados azules), se refiere a los lengüeteos ocurridos durante los 2.5 s a partir del inicio de la fotoestimulación, dividido entre el número total de lengüeteos. **D.** El índice de consumo ligado al láser del grupo VGAT-ChR2 incrementa en función de la frecuencia del láser. * $p < 0.01$, los asteriscos muestran la diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control (WT), se utilizó una ANOVA de 2 vías, seguida de una prueba *post hoc* Holm Sidak.

9.7 La activación de las neuronas HL^{Vgat+} en el protocolo de lazo abierto induce la ingesta por la concentración más alta de sacarosa disponible

Para probar si la activación de las neuronas HL^{Vgat+} promueve el consumo por el estímulo más palatable disponible, utilizamos ratones ingenuos y saciados que fueron fotoestimulados durante un protocolo de lazo abierto. Los sujetos fueron colocados en una caja conductual que contenía tres puertos en la pared frontal, a cada puerto se le colocó un bebedero. En el puerto central se colocó agua, y en los puertos laterales sacarosa al 3 o 18% (Figura 13A). Esta tarea tuvo una duración de 4 días basales, donde no se fotoestimuló (datos no mostrados) y 11 días con fotoestimulación (Figura 13A). Observamos que ambos grupos de ratones prefieren consumir sacarosa al 18% en comparación con agua y sacarosa al 3% (Figura, 13B; ANOVA de 2 vías, grupo WT: efecto de estímulos gustativos, $F_{(2, 1560)} = 543.3$, $p < 0.0001$; VGAT-ChR2: efecto de estímulos gustativos, $F_{(2, 3144)} = 983$, $p < 0.0001$). Sin embargo, los ratones VGAT-ChR2 incrementaron su consumo de sacarosa al 18% durante los bloques con fotoestimulación comparado con los bloques donde el láser permaneció apagado (Figura 13B, *panel derecho*; ANOVA de 2 vías, interacción del grupo y los bloques, $F_{(14, 3144)} = 61.32$, $p < 0.0001$), y rara vez lengüetearon en ausencia de la estimulación optogenética (Figura 13C). Al comparar el consumo total de sacarosa al 18% en ambos grupos no observamos diferencias significativas (Figura 13C, cuadrados negros, Prueba t-Student no pareada, $t_{(196)} = 1.512$, $p = 0.1320$), esto indica que los ratones transgénicos VGAT-ChR2 distribuyen su consumo durante los bloques de estimulación. Además, al analizar el consumo de sacarosa al 18% de ratones VGAT-ChR2 a lo largo de los días, encontramos que desde el primer día de la tarea un incremento el consumo en comparación a los bloques sin estimulación, y este aumento creció a lo largo de los días (Figura 13D, ANOVA MR, efecto de bloques $F_{(1, 22)} = 64.64$, $p < 0.0001$, efecto de los días $F_{(10, 220)} = 2.169$, $p < 0.05$). Estos resultados indican que la activación de estas neuronas no induce un estado de hambre per se, sino un proceso de aprendizaje que potencia el

consumo del estímulo más palatable disponible, y que se limita al periodo de fotoestimulación.

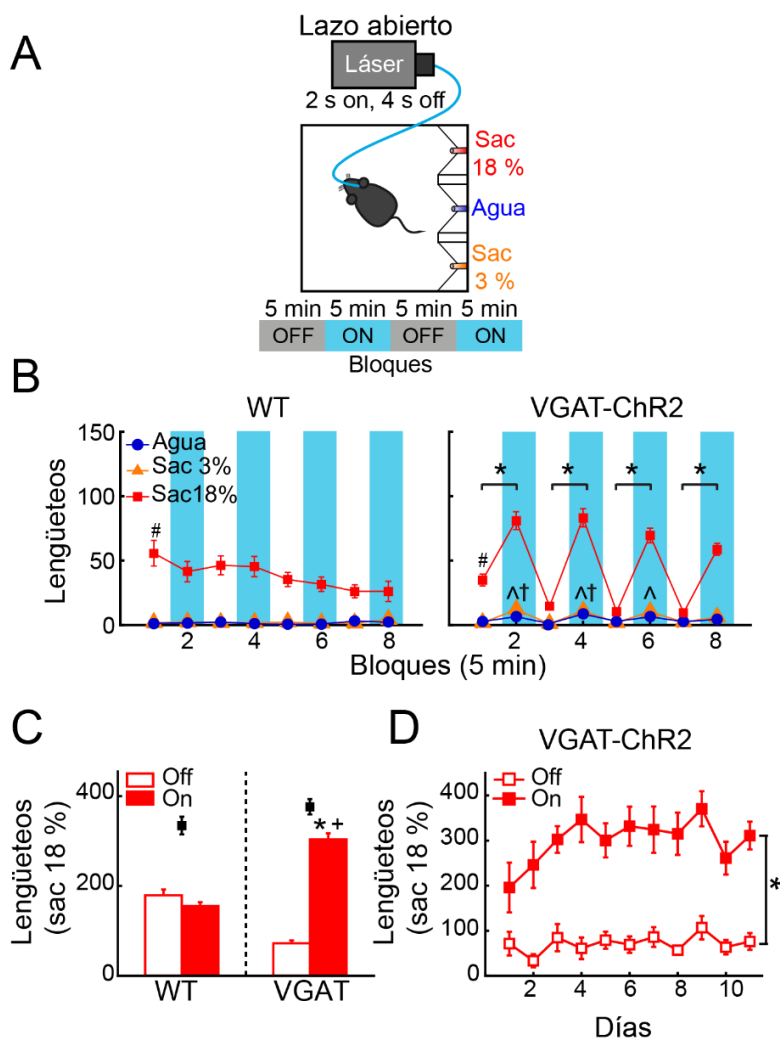


Figura 13. La activación de las neuronas HL^{Vgat+} en el protocolo de lazo abierto genera un sesgo hacia el estímulo gustativo más palatable disponible sin promover sobreconsumo. A. Protocolo conductual. Ratones saciados, WT y VGAT-ChR2, fueron colocados en una caja conductual equipada con tres puertos. El puerto izquierdo contenía el bebedero con sacarosa al 18%, el puerto central con agua, y el puerto derecho con sacarosa al 3%. A lo largo de la sesión se presentaron bloques alternados de 5 min donde el láser permaneció encendido o apagado. En los bloques de fotoestimulación, el láser tuvo un ciclo de 2 s encendido y 4 s apagado. **B.** Número de lengüeteos de cada estímulo para el grupo de ratones WT (*panel izquierdo*) y VGAT-ChR2 (*panel derecho*). **C.** Número total de lengüeteos para sacarosa al 18%. **D.** Número de lengüeteos por el grupo VGAT-ChR2 para sacarosa al 18% durante los bloques con fotoestimulación y sin ella, a lo largo de los 11 días que duró la tarea. * $p < 0.0001$, los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre los bloques con o sin fotoestimulación. # $p < 0.0001$, diferencias estadísticamente significativas entre sacarosa al 18% y los otros estímulos presentados. ^ $p < 0.01$ indica los bloques donde el grupo VGAT-ChR2 consumió más sacarosa al 3% en comparación con el grupo WT. † $p < 0.01$ mayor consumo de agua por grupo VGAT-ChR2 en comparación con el grupo WT. Se utilizaron las pruebas ANOVA de 2 vías y ANOVA MD seguida de la prueba *post hoc*

Holm Sidak.

También encontramos que durante los bloques de fotoestimulación (2, 4 y 6) incrementó significativamente el consumo de agua y sacarosa al 3% en el grupo de VGAT-ChR2 en comparación con el grupo WT (Figura 13B, ^ $p < 0.05$ para sacarosa al 3%; † $p < 0.05$ para agua). Hipotetizamos que este consumo observado durante la activación de las neuronas HL^{Vgat+} podría ser explicado porque la fotoestimulación se liberó cerca de estos estímulos. Para estudiar este fenómeno, realizamos un análisis videográfico de todas las sesiones. Evaluamos la influencia de la distancia y el ángulo relativo entre la cabeza del ratón a cada uno de los sippers (ver la sección de Métodos), Figura 14A. Encontramos que cuando la fotoestimulación ocurrió en una distancia relativa menor a 50 píxeles (aproximadamente 3 cm) de los puertos de agua o sacarosa al 3%, la probabilidad de lengüeteo incrementó (Figura 14B; Sacarosa al 3%: ANOVA de 1 vía $F_{(9,155)} = 29.33$, $p < 0.0001$; Agua: ANOVA de 1 vía $F_{(9,153)} = 12.74$, $p < 0.0001$). Sin embargo, la medición del ángulo no aportó información (Figura 14C-D; Sacarosa al 3%: ANOVA de 1 vía $F_{(17,147)} = 0.71$, $p = 0.78$; Agua: ANOVA de 1 vía $F_{(17,145)} = 0.96$, $p = 0.49$; Sacarosa al 18%: ANOVA de 1 vía $F_{(17,153)} = 0.49$, $p = 0.95$). Al analizar la sacarosa al 18%, observamos que cuando los sujetos se encuentran a una distancia mayor (6 cm) en comparación con los otros estímulos, la activación de estas neuronas incrementa significativamente la probabilidad de lengüeteo (Figura 14B *panel derecho*; ANOVA de 1 vía $F_{(9,161)} = 82.87$, $p < 0.0001$). Estos datos son consistentes con estudios previos que demostraron que la activación de las neuronas HL^{Vgat+} promueve la exploración del estímulo más cercano (Nieh et al., 2016), y aporta que la atracción por la ingesta del estímulo más palatable puede tener una mayor distancia que los otros estímulos menos apetecibles.

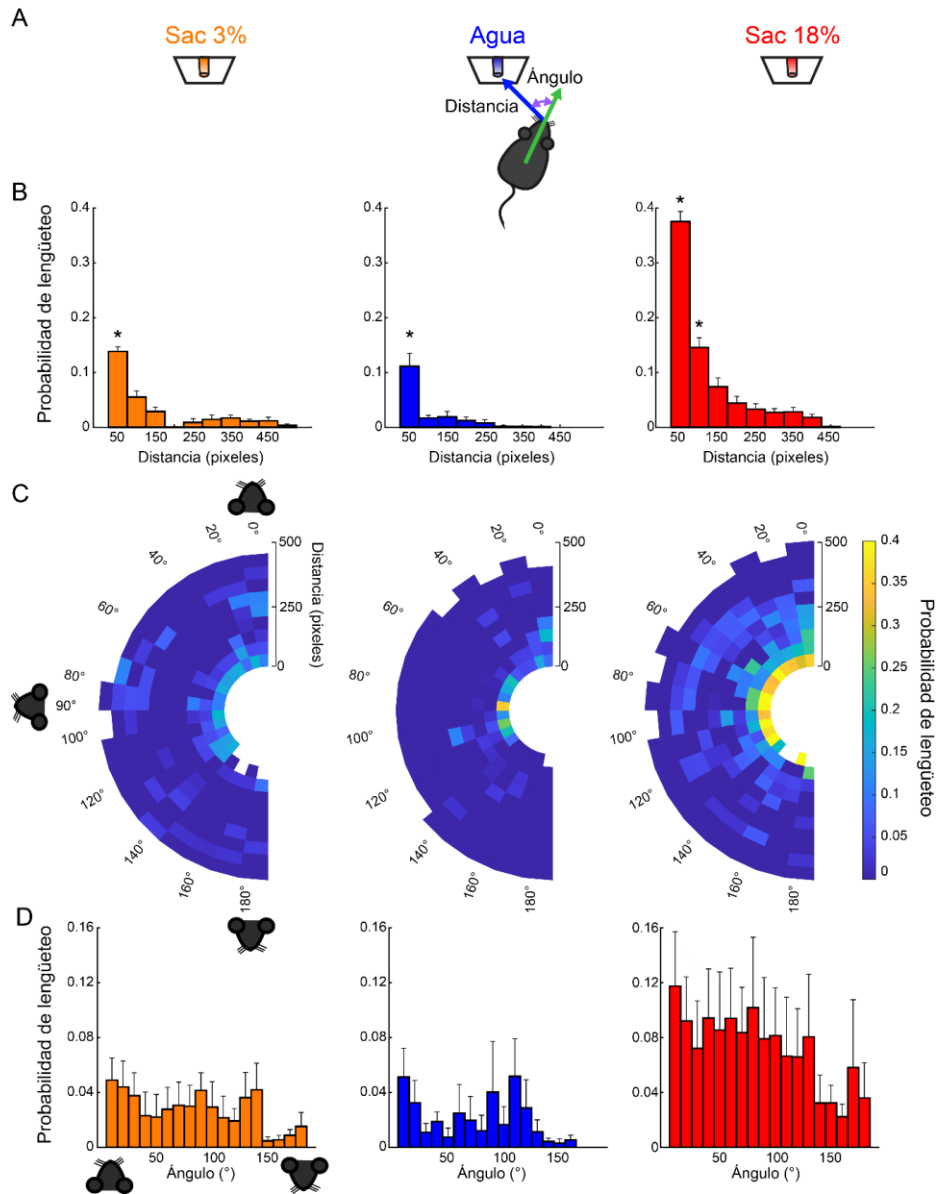


Figura 14. La probabilidad de lengüeteo incrementa en función de la distancia. **A.** Esquema conductual del análisis videográfico (ver sección de Métodos). Registramos como coordenadas la posición de la nariz del ratón en el primer pulso de láser de cada tren de estimulación, y medimos la distancia y el ángulo formado entre la cabeza del ratón y cada uno de los sippers. Calculamos la probabilidad de lengüeteo durante la fotoestimulación (desde el inicio del láser y 6 segundos después) dado estas coordenadas. Normalizamos dividiendo el número de veces que se evocó un lengüeteo entre el número de veces que el sujeto fue fotoestimulado en esas coordenadas. **B.** Probabilidad de lengüeteo evocada cada que se encendió el láser, en función de la distancia relativa entre el ratón y cada uno de los sipper. **C.** Gráficas polares, indican la probabilidad de lengüeteo durante la fotoestimulación dada la distancia relativa y el ángulo formado entre la cabeza del ratón y cada uno de los sippers. Los dibujos de las cabezas de ratón ilustran la posición del sujeto para la obtención del ángulo. Si su cabeza está dirigida hacia el sipper, el ángulo es de 0°, si se encuentra en posición perpendicular al puerto (90°), o si su cabeza está dirigida en dirección opuesta al puerto (180°). **D.** Probabilidad de lengüeteo evocada cada que se encendió el láser dado el ángulo formado entre la dirección de la cabeza del ratón y el sipper. * indican las distancias relativas que alcanzaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en comparación al resto de distancias observadas. Se utilizó una ANOVA de 1 vía seguida de la prueba *post hoc* Holm Sidak.

9.8 La activación de las neuronas HL^{Vgat+} en el protocolo de lazo abierto incrementa el tiempo de permanencia y promueve el consumo del estímulo sólido más palatable

También exploramos si la activación de las neuronas GABAérgicas del HL inducen el consumo por el estímulo sólido más palatable y disponible. Para ello, colocamos a los sujetos en una arena circular, que contenía tres estímulos sólidos en posición equidistante. Como estímulos gustativos, presentamos un pellet de dieta chow, un cubo de sacarosa granulada y un pellet de dieta alta grasas (DAG), y fotoestimulamos utilizando el protocolo de lazo abierto (Figura 15A). Encontramos que la activación optogenética de las neuronas HL^{Vgat+} incrementa el tiempo de permanencia alrededor del estímulo más palatable en comparación con el grupo WT, e incrementa el consumo por la DAG en comparación con la sacarosa granulada y la dieta chow (Figura 15B-C; Tiempo de permanencia: ANOVA de 1 vía, $F_{(5, 306)} = 38.52$, $p < 0.0001$; Consumo: ANOVA de 1 vía, $F_{(5, 282)} = 68.76$, $p < 0.0001$). Posteriormente, decidimos comparar entre la sacarosa granulada y la dieta chow (Figura 16A). Observamos que la activación de estas neuronas incrementa el consumo de la sacarosa granulada y el tiempo de permanencia en comparación con la dieta chow (Figura 16B-C; Tiempo de permanencia: ANOVA de 1 vía, $F_{(3, 96)} = 16.13$, $p < 0.0001$; Consumo: ANOVA de 1 vía, $F_{(3, 92)} = 13.65$, $p < 0.0001$). Estos experimentos sugieren que la activación de las neuronas GABAérgicas utilizando el protocolo de lazo abierto promueve el consumo y la exploración por el estímulo sólido más palatable disponible.

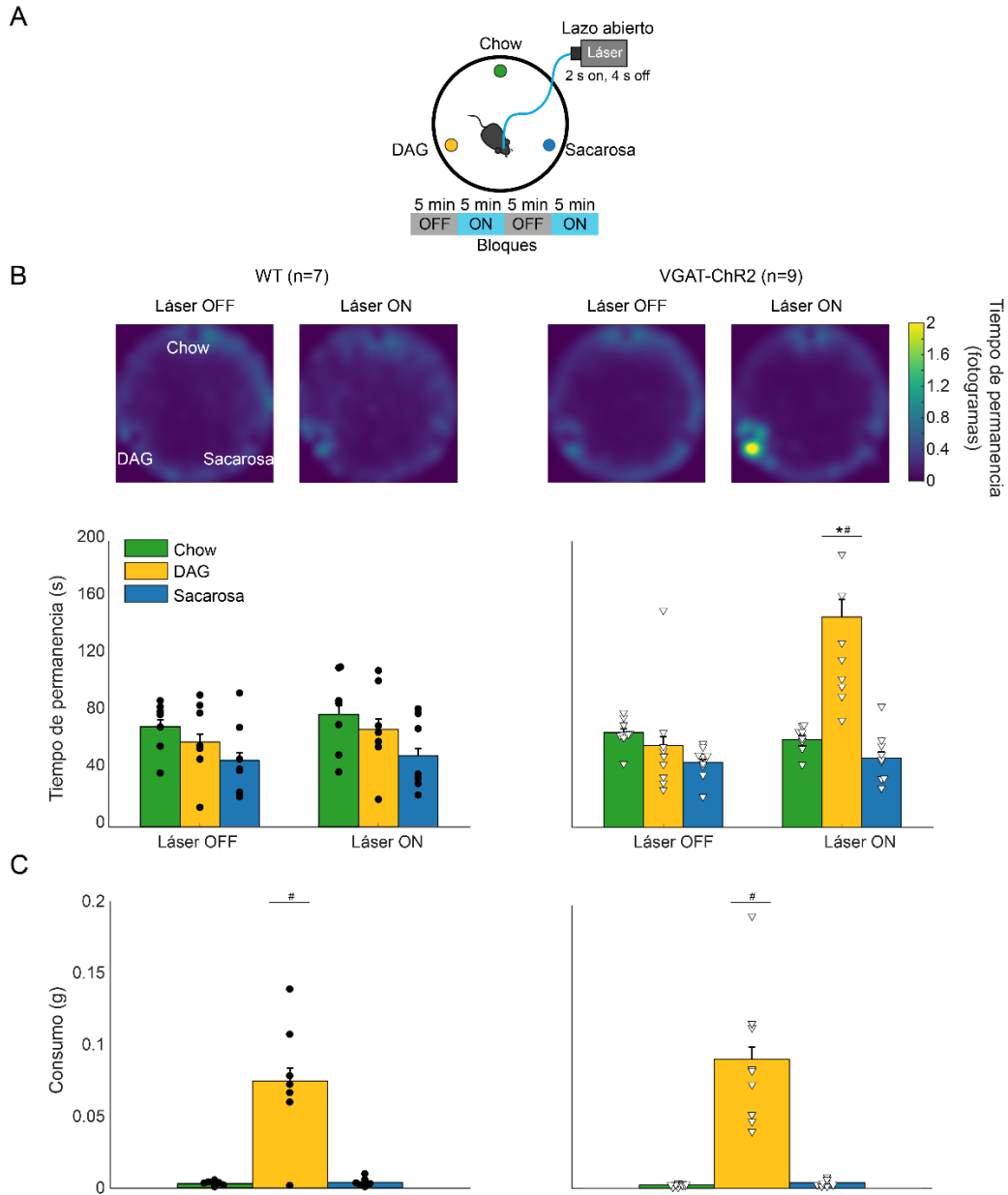


Figura 15. La activación de las neuronas HL^{Vgat+} incrementa el tiempo de permanencia y el consumo de una dieta alta en grasas. **A.** Esquema conductual. En una arena circular, que contenía tres platos en posición equidistante se colocó en cada uno de ellos un pellet de dieta chow (verde), un pellet de DAG (amarillo), y un cubo de sacarosa granulada (azul). Similar a los experimentos anteriores, se siguió un protocolo de fotoestimulación de lazo abierto, alternando el encendido y apagado del láser en bloques de 5 min, a lo largo de una sesión de 20 min. **B.** Mapas de calor, ilustran el promedio del tiempo de permanencia en la arena conductual para ambos grupos de ratones. Para crear cada mapa de calor, identificamos el centroide del ratón en cada fotograma del vídeo. La barra de color indica el número de fotogramas en el que sujeto fue detectado dado un píxel; valores mayores refieren que el ratón permaneció más tiempo en esa ubicación de la arena. Debajo, se muestra gráficas de barras del tiempo de permanencia (s). Calculamos la distancia relativa entre el centroide del ratón y el centro de cada uno de los platos comida. Se consideraron los valores sólo cuando que el sujeto se encontraba en una distancia menor a 60 mm al plato de comida y permanecía al menos 1 s. **C.** Consumo de pellet de dieta chow, DAG, sacarosa granulada. Los puntos y los círculos representan los valores de cada individuo. * denota las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) relativas al grupo WT. # $p < 0.0001$.

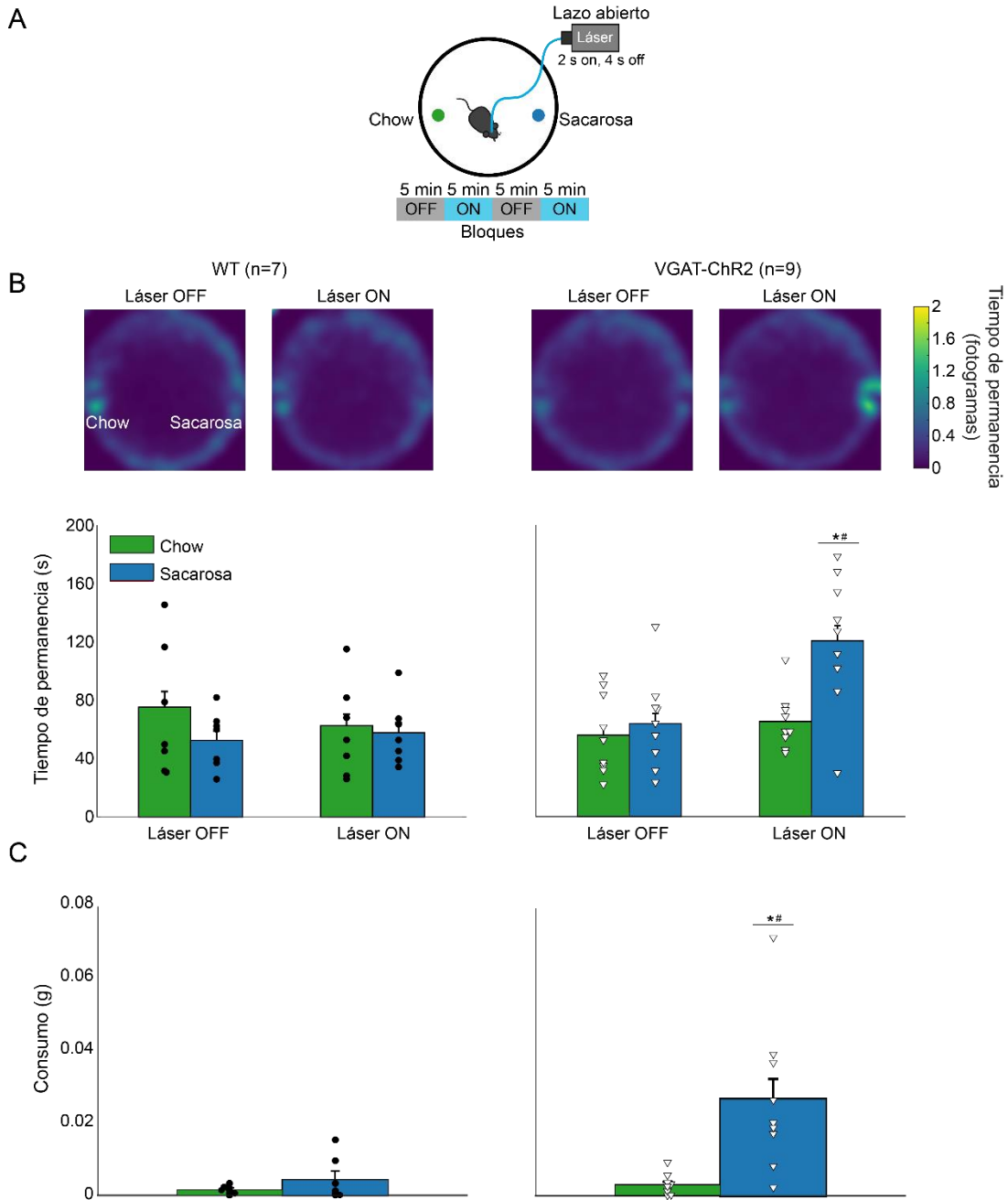


Figura 16. La activación de las neuronas HL^{Vgat+} incrementa el tiempo de permanencia al estímulo sólido más palatable. **A.** Esquema conductual. En una arena circular, se colocaron dos platos de comida que contenían un pellet de dieta chow (verde) y un cubo de sacarosa granulada (azul). Se realizó el mismo protocolo de estimulación que en la Figura 15A. **B.** Mapas de calor y gráficas de barras del tiempo de permanencia. Mismas convenciones que en la Figura 15B. **C.** Consumo del pellet de dieta chow y la sacarosa granulada. Los puntos y los círculos representan los valores de cada individuo. * denota las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) relativas al grupo WT. # $p < 0.0001$ diferencias significativas entre la DAG y los otros estímulos presentados. Se utilizó una ANOVA de 1 vía seguida de la prueba *post hoc* Holm Sidak.

9.9 El protocolo de fotoestimulación de lazo cerrado en las neuronas HL^{Vgat+} promueve el consumo por el estímulo más cercano

Nos preguntamos si la activación de las neuronas HL^{Vgat+} inducen la preferencia por el estímulo más próximo (pero el menos palatable) sobre el estímulo más lejano con mayor valor hedónico. Para ello, empleamos los ratones de la Figura 13 y los colocamos en la misma caja conductual, con la misma configuración experimental. Activamos a las neuronas HL^{Vgat+} mediante un protocolo de lazo cerrado, el láser se encendió cada que el sujeto introducía su cabeza en el puerto central (agua), durante 2 s y con un tiempo fuera de 4 s. Este protocolo garantiza, que la fotoestimulación sólo ocurriera cercana del estímulo menos palatable (agua) (Figura 17A, *panel derecho*). Encontramos que la activación de las neuronas HL^{Vgat+} es recompensante, el grupo de ratones transgénicos VGAT-ChR2 visita más veces el puerto central en comparación con el grupo control (Figura 17B, Prueba t-Student no pareada, $t_{(196)} = 12$, $p < 0.0001$). Sorpresivamente, el número total de lengüeteos muestra que el grupo de ratones VGAT-ChR2 consume más agua en comparación con el grupo control (Figura 17C, ANOVA de 2 vías interacción del grupo y estímulos gustativos, $F_{(2, 585)} = 13.09$, $p < 0.0001$, *post hoc test* en agua, $p < 0.0001$). Mientras, el consumo por sacarosa al 18% no muestra diferencias significativas entre grupos y para ambos protocolos de estimulación (Figura 17C, ANOVA de 2 vías, interacción del grupo y el protocolo de estimulación, $F_{(1, 391)} = 2.172$, $p = 0.1414$). Sin embargo, al medir el número de lengüeteos evocados durante el periodo de fotoestimulación (2.5 s a partir del encendido del láser, Figura 17D), encontramos que el grupo de ratones VGAT-ChR2 prefiere tanto el estímulo más cercano y menos palatable (agua) como el más palatable y lejano (sacarosa 18%) ($p = 0.8731$, Figura 17D). No obstante, consumo de agua se limitó al periodo de fotoestimulación, cuando el láser estuvo apagado, los ratones transgénicos VGAT-ChR2 bebieron sólo sacarosa al 18% (Figura 17E, ver flecha; ANOVA de 2 vías, interacción entre grupo y los estímulos gustativos, $F_{(2, 585)} = 64.16$, $p < 0.0001$, *post hoc test* en agua vs.

sacarosa al 18%, $p < 0.0001$). Por lo tanto, la activación de estas neuronas induce el consumo de agua sólo cuando es el estímulo más cercano. Posteriormente, medimos el índice de preferencia (durante el periodo de fotoestimulación) para cada sujeto del grupo transgénico, detectamos que durante el protocolo de lazo abierto, todos los ratones VGAT-ChR2 prefieren la sacarosa al 18% por encima del agua (Figura 17E; valores > 0.5 y cercanos a 1), mientras que en el protocolo de lazo cerrado, la mayor parte de los sujetos (9 de 12), significativamente disminuyen su preferencia de sacarosa (Figura 17E, observar el descenso del índice de preferencia, Prueba t-Student pareada, $t_{(58)} = 7.98$, $p < 0.0001$). De estos 9 animales, 6 de ellos exhibieron una alta preferencia por agua sobre la sacarosa (índice de preferencia con valores < 0.05). La Figura 17F muestra la ubicación de la punta de la fibra óptica, la variación anatómica del sitio donde se encontraron las fibras ópticas no explica las preferencias encontradas en este experimento. Suponemos que estos resultados se deben a las estrategias conductuales que utiliza cada sujeto al realizar la tarea. La variación encontrada en la preferencia de la sacarosa es similar a los datos reportados en experimentos de estimulación eléctrica del HL que inducen preferencia por el consumo de sacarosa en diferentes grados (Poschel, 1968). En conclusión, la suma de los datos observados sugiere que la activación de las neuronas GABAérgicas del HL promueve el consumo mediante la integración de dos variables: la proximidad del estímulo y el valor hedónico del estímulo.

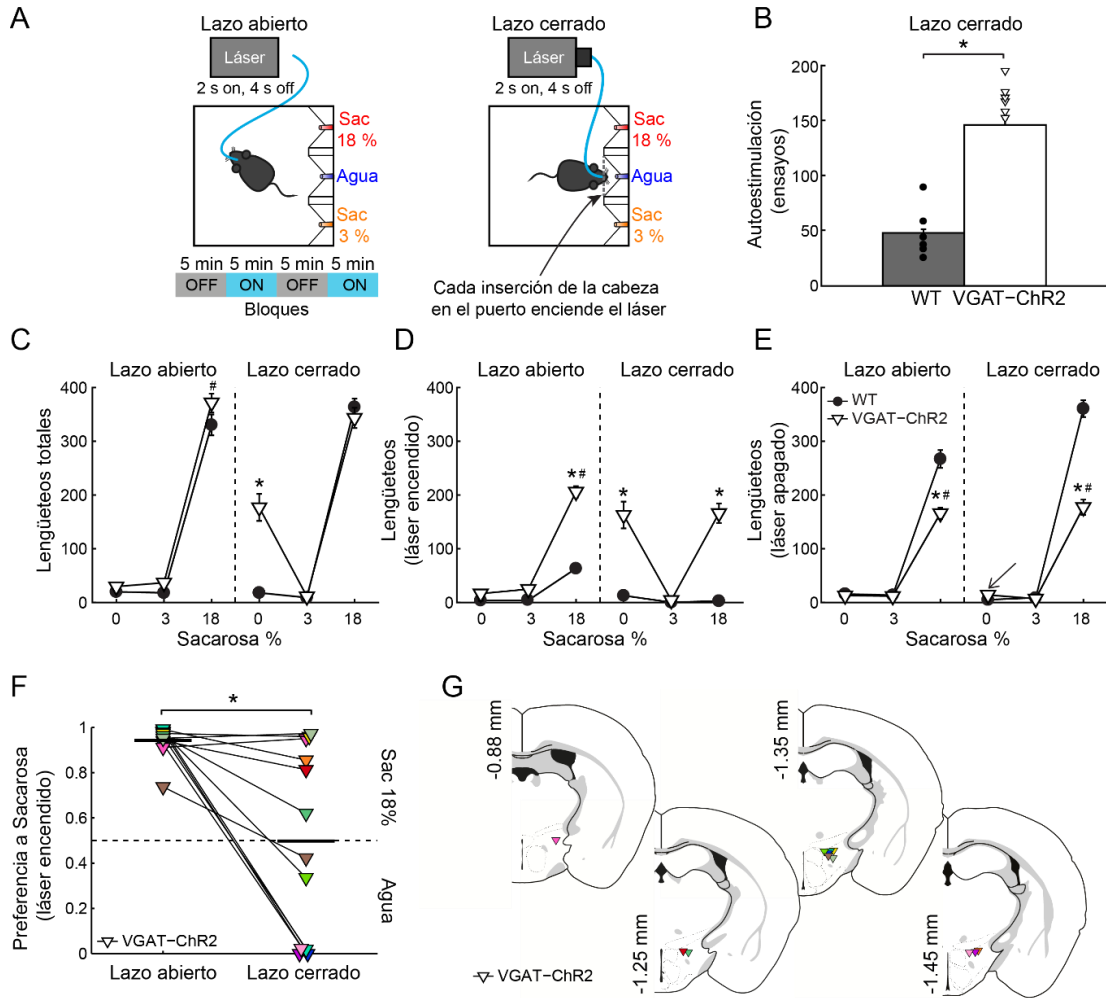


Figura 17. Si la fotoestimulación ocurre cerca del estímulo gustativo menos palatable, activación de las neuronas HL^{Vgat+} inducen su consumo a pesar de la disponibilidad de sacarosa. **A.** Esquema conductual. *Panel izquierdo*, ilustra el mismo protocolo de la Figura 13A. Para el protocolo de lazo cerrado, el láser se activó cada que el ratón inserto la cabeza en el puerto central, durante 2 s y con un tiempo fuera de 4 s. **B.** Número de veces que el láser se encendió. El grupo de ratones VGAT-ChR2 se autoestimuló más veces que el grupo WT. Cada círculo y triángulo representan los valores individuales de cada sujeto. **C.** Número total de lengüeteos para cada estímulo presentado a lo largo de la sesión. Durante el protocolo de lazo abierto, el grupo de ratones VGAT-ChR2 consume más sacarosa al 18%. Sin embargo, el mismo grupo de sujetos desarrolla preferencia por agua en comparación con el grupo WT durante el protocolo de lazo cerrado. **D.** Número de lengüeteos el periodo de fotoestimulación. **E.** Número de lengüeteos cuando el láser se mantuvo apagado. **F.** Índice de preferencia del grupo de ratones VGAT-ChR2 durante el periodo de fotoestimulación. Este índice fue definido como el número lengüeteos a sacarosa al 18%, dividido entre la suma del número de los lengüeteos de sacarosa y agua. Valores mayores a 0.5 indican preferencia por sacarosa, y los valores por debajo de 0.5 preferencia por agua. Las líneas horizontales negras denotan la media de preferencia para ambos protocolos. **G.** Posición anatómica de las fibras ópticas implantadas en el grupo de ratones VGAT-ChR2. * $p < 0.0001$, indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo WT y protocolos de estimulación (17E). # $p < 0.0001$ muestra diferencias estadísticamente significativas entre la sacarosa al 18% y los otros estímulos gustativos presentados. Se utilizaron las siguientes pruebas: Prueba de t-Student no pareada (17B), Prueba t-Student pareada (17F) y una ANOVA de 2 vías seguida de la prueba *post hoc* Holm Sidak.

9.10 Después de repetidas estimulaciones sobre las neuronas HL^{Vgat+} , la correlación entre el consumo ligado al láser y las autoestimulaciones incrementa

Estudios previos han demostrado que la repetición continua de la estimulación (eléctrica u optogenética no específica a un grupo neuronal) en el HL provoca que los roedores cambien la conducta de consumo ligada a la estimulación a sólo autoestimularse (Gigante et al., 2016), sugiriendo que las conductas de ingesta y recompensa mediadas por este núcleo no tienen una correlación directa y son flexibles (Gigante et al., 2016; Urstadt and Berridge, 2020). Tomando en cuenta estos descubrimientos, decidimos explorar si la activación optogenética repetida de las neuronas HL^{Vgat+} que promueve consumo ligado al láser y es recompensante cambia a lo largo de los días. Contrario a esto artículos, nosotros encontramos que la activación de estas neuronas fortalece el consumo ligado al láser a lo largo de los días en ambos protocolos (Figura 18A, primeros 3 días: $r = 0.12$, $p = 0.69$; últimos 5 días: $r = 0.64$, $p < 0.05$). Y también incrementa la correlación entre el número de autoestimulaciones y el consumo ligado al láser (Figura 18B, primeros 3 días: $r = 0.42$, $p = 0.16$; últimos 5 días: $r = 0.61$, $p < 0.05$). Este análisis sugiere que la activación de estas neuronas compromete procesos de aprendizaje (Sharpe et al., 2017), y son el sustrato común para las conductas de recompensa y aprendizaje.

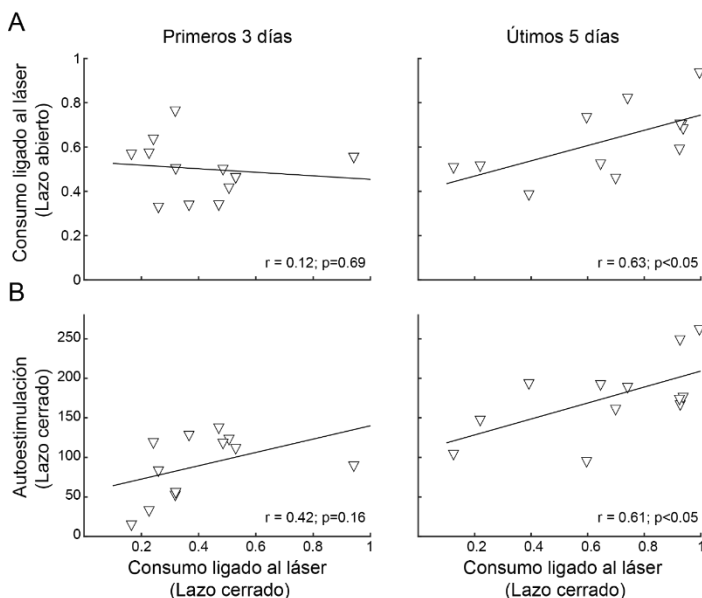


Figura 18. La repetición continua de la activación de las neuronas HL^{Vgat+} a lo largo de los días incrementa el consumo ligado a la fotoestimulación. **A.** Gráficas de dispersión, muestran la correlación entre el consumo ligado al láser (lengüeteos evocados durante 2.5 s a partir del encendido del láser), en los protocolos de lazo abierto y cerrado, durante las primeras 3 sesiones (*panel izquierdo*) y las últimas 5 sesiones (*panel derecho*) en el grupo de ratones VGAT-ChR2. **B.** Correlación entre el promedio de autoestimulaciones durante el protocolo del lazo cerrado y el consumo ligado al láser.

9.11 El efecto de aproximación evocado por la fotoestimulación del lazo cerrado también ocurre ante estímulos sólidos

Nos interesó investigar si el efecto de aproximación ligado a la activación de las neuronas HL^{Vgat+} se restringía sólo a estímulos gustativos líquidos. Para contestar esta pregunta implementamos una tarea de preferencia de lugar en tiempo real. Utilizamos una arena circular donde colocamos cuatro estímulos (pellets de chocolate, un corcho, un pellet de dieta chow y sacarosa al 10%) en posición equidistante uno respecto a los otros (Figura 19A). Cuando la activación de las neuronas HL^{Vgat+} se presentó cerca del área donde se encontraban los pellets de chocolate o la dieta chow, incrementó el tiempo de exploración (Figura 19B; Pellet: ANOVA de 1 vía, $F_{(4, 145)} = 99.05$, $p < 0.0001$; Chow: ANOVA de 1 vía, $F_{(4, 145)} = 182$, $p < 0.0001$) y su consumo (Figura 19C; Pellet: Prueba t-Student no pareada, $t_{(68)} = 3.234$, $p < 0.05$; Chow: Prueba t-Student no pareada, $t_{(68)} = 3.651$, $p < 0.05$). Además, para medir conducta de ansiedad, fotoestimulamos estas neuronas cuando los ratones pasaban por el centro de la arena (que es un sitio que produce aversión natural), encontramos un incremento en el tiempo de permanencia en comparación con el grupo WT (Figura 19B, $p < 0.05$). Estos datos concluyen, que la activación recompensante de estas neuronas refuerza la aproximación y exploración de cualquier estímulo cercano al sitio de estimulación.

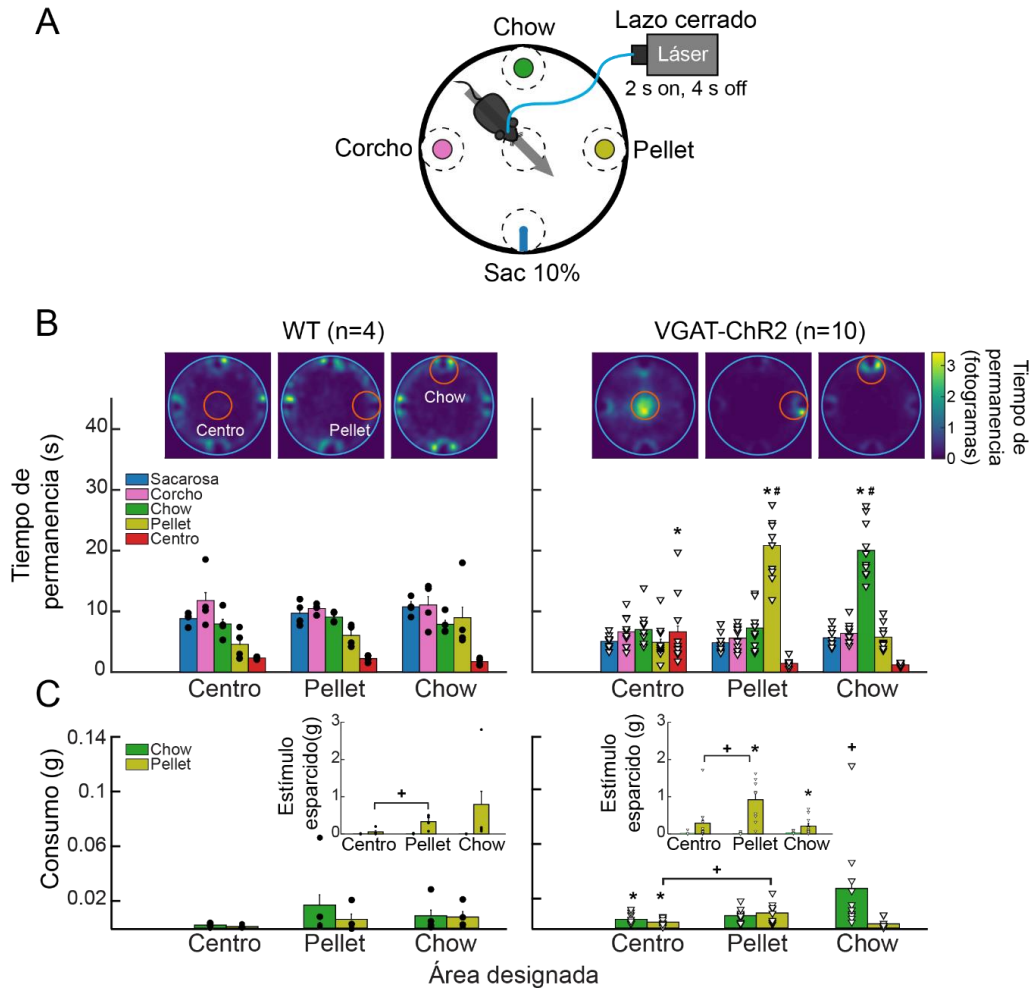


Figura 19. La fotoestimulación de las neuronas HL^{Vgat+} es recompensante y promueve la exploración del estímulo más cercano. **A.** Esquema conductual, en una arena circular se colaron cuatro platos simultáneamente, cada uno de ellos contenía un estímulo gustativo: un pellet de dieta chow (verde), un pellet de chocolate (amarillo), sacarosa al 10% (azul) y un corcho (rosa). En esta tarea, cuando el sujeto cruza el área designada (círculos punteados), el láser es encendido (2 s encendido, 4 s apagado) a lo largo de una sesión de 40 min. El sujeto tiene que reingresar al área designada para recibir una nueva fotoestimulación. Sólo un área designada fue fotoestimulada por sesión, durante 3 o 4 días consecutivos. **B.** Los mapas de calor y las gráficas de barras representan el tiempo de permanencia de cada estímulo para el grupo WT (*panel izquierdo*), y el grupo VGAT-ChR2 (*panel derecho*). Los círculos rojos indican el área designada fotoestimulada. La barra de color refiere el número de fotogramas en el que el sujeto fue detectado en ese sitio; los valores altos indican que el sujeto permaneció en ese sitio por mucho tiempo. Debajo, las gráficas de barras muestran el tiempo de permanencia en segundos para cada estímulo (dentro de un radio de 5 cm). Cada círculo y triángulo representan los valores individuales de cada sujeto. Los ratones VGAT-ChR2 permanecen más tiempo explorando la dieta de chow en las sesiones donde fue fotoestimulada esa área, en comparación con el grupo WT y al resto de los estímulos presentados. **C.** Consumo de pellet y chocolate. Las gráficas insertadas muestran el gramaje de los estímulos esparcidos. * denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en comparación con el grupo WT. + $p < 0.05$ muestra incrementos significativos en el consumo y el esparcimiento del estímulo durante las sesiones éste fue fotoestimulado (área designada) en comparación con las sesiones donde el área designada fue el centro de la arena. # $p < 0.01$ indican las diferencias estadísticamente significativas entre el área designada y resto de las áreas no fotoestimuladas. Se

utilizaron las siguientes pruebas: Prueba t-Student no pareada, y una ANOVA de 1 vía seguida de la prueba *post hoc* Holm Sidak.

9.12 La activación de las neuronas HL^{Vgat+} es recompensante y promueve el lengüeteo en un bebedero vacío

Posteriormente, exploramos la conducta evocada por la activación de las neuronas HL^{Vgat+} cercana a estímulos no comestibles (como un bebedero vacío), aversivos (quinina al 0.004% o un soplo de aire) o altamente palatables (sacarosa al 18%). Para este experimento, utilizamos los mismos ratones que probamos en el protocolo de lazo cerrado de la Figura 17, fotoestimulamos con un protocolo de lazo cerrado y colocamos distintos estímulos gustativos en el puerto central a lo largo de las sesiones (Figura 20A). Para verificar que la activación de estas neuronas es recompensante, después de que observamos que la fotoestimulación cercana al agua incrementa el número de autoestimulaciones (Figura 20B; fase de agua, sombra azul), realizamos 4 sesiones de extinción, donde el láser permaneció todo el tiempo apagado. Encontramos una disminución en el número de autoestimulaciones en el grupo de ratones VGAT-ChR2 (Figura 20B; fase de extinción, sombra gris). Como esperábamos, los ratones rápidamente recuperaron la conducta de autoestimulación cuando volvimos a encender el láser (Figura 20B; fase agua posterior a la extinción, sombra azul). Esto confirma que las neuronas HL^{Vgat+} contienen una señal de recompensa hedónicamente positiva (Jennings et al., 2015).

Un estudio previo demostró que la activación quimiogénica de las neuronas HL^{Vgat+} incrementa la conducta de roer estímulos no comestibles, como un corcho de madera (Navarro et al., 2016). Para probarlo en nuestro modelo, reemplazamos el agua del puerto central por un bebedero vacío (Figura 20A, bebedero vacío). La activación de las neuronas HL^{Vgat+} provocó que el grupo de ratones transgénicos VGAT-ChR2 continuara autoestimulándose en el puerto central y evocó un incremento significativo de lengüeteos

en el bebedero vacío en comparación con el grupo WT (Figura 20C, Prueba t-Student no pareada, $t_{(40)} = 2.532$, $p < 0.05$). Por lo tanto, las neuronas HL^{Vgat+} promueven la necesidad por expresar la conducta de ingesta, incluso evocando lengüeteos secos sobre estímulos que carecen de relevancia biológica. Sugerimos que este efecto está mediado por una sensación recompensante que promueve las respuestas oromotoras durante la conducta apetitiva.

9.13 Cuando la sacarosa está disponible la activación de las neuronas HL^{Vgat+} no promueve la ingesta de estímulos gustativos aversivos ni tolera estímulos nocivos

Para observar el efecto de consumo y aproximación a estímulos aversivos, reemplazamos el bebedero de agua (puerto central) por quinina o un soplo de aire (Figura 20A). En las sesiones que presentamos quinina, observamos que durante el periodo de fotoestimulación disminuyó el número de lengüeteos en ambos grupos (Figura 20C; quinina, sombra verde). Sin embargo, el grupo de ratones VGAT-ChR2 continuó autoestimulándose (Figura 20B; quinina, sombra verde) y consumiendo sacarosa al 18% en el puerto lateral (Figura 20D; quinina, sombra verde). Durante las sesiones donde liberamos un soplo de aire cuando el sujeto insertaba su cabeza en el puerto central (Figura 20A; soplo de aire, sombra gris oscuro), obtuvimos resultados similares a los observados en las sesiones de quinina (Figura 20B-D; soplo de aire, sombreado gris oscuro). Posteriormente, probamos tres sesiones en donde el soplo de aire no podía evitarse. Para esta configuración, el roedor debe lengüetear al menos una vez en puerto central para ser fotoestimulado (Figura 20A; soplo de aire inevitable, sombreado cian). Observamos, que el grupo de ratones transgénicos VGAT-ChR2 dejó de autoestimularse completamente (Figura 20B; soplo de aire inevitable, sombreado cian), y detuvo su consumo por sacarosa al 18% (Figura 20D; soplo de aire inevitable, sombreado cian). Estos resultados indican que en ratones saciados, la activación

de las neuronas HL^{Vgat+} no induce el consumo por estímulos aversivos, como quinina, ni incrementa la tolerancia de estímulos punitivos.

Finalmente, exploramos la activación de estas neuronas próxima al estímulo más palatable. Para ello, intercambiamos de posición el bebedor de agua y el bebedor de sacarosa al 18% (Figura 20A; sacarosa al 18%, sombreado rosa). Durante el periodo de fotoestimulación, el grupo de ratones VGAT-ChR2 incrementó drásticamente su consumo (Figura 20C, sacarosa, sombreado rosa). La ingesta por sacarosa al 18% fue mayor al resto de los estímulos probados ($p < 0.001$). En conjunto, estos resultados sugieren que la activación de las neuronas HL^{Vgat+} es recompensante y promueve el consumo del estímulo más cercano aun si no es el más palatable (por ejemplo, agua o un bebedero vacío). Pero, si la activación es próxima a un estímulo altamente palatable (como sacarosa al 18%), induce sobreconsumo.

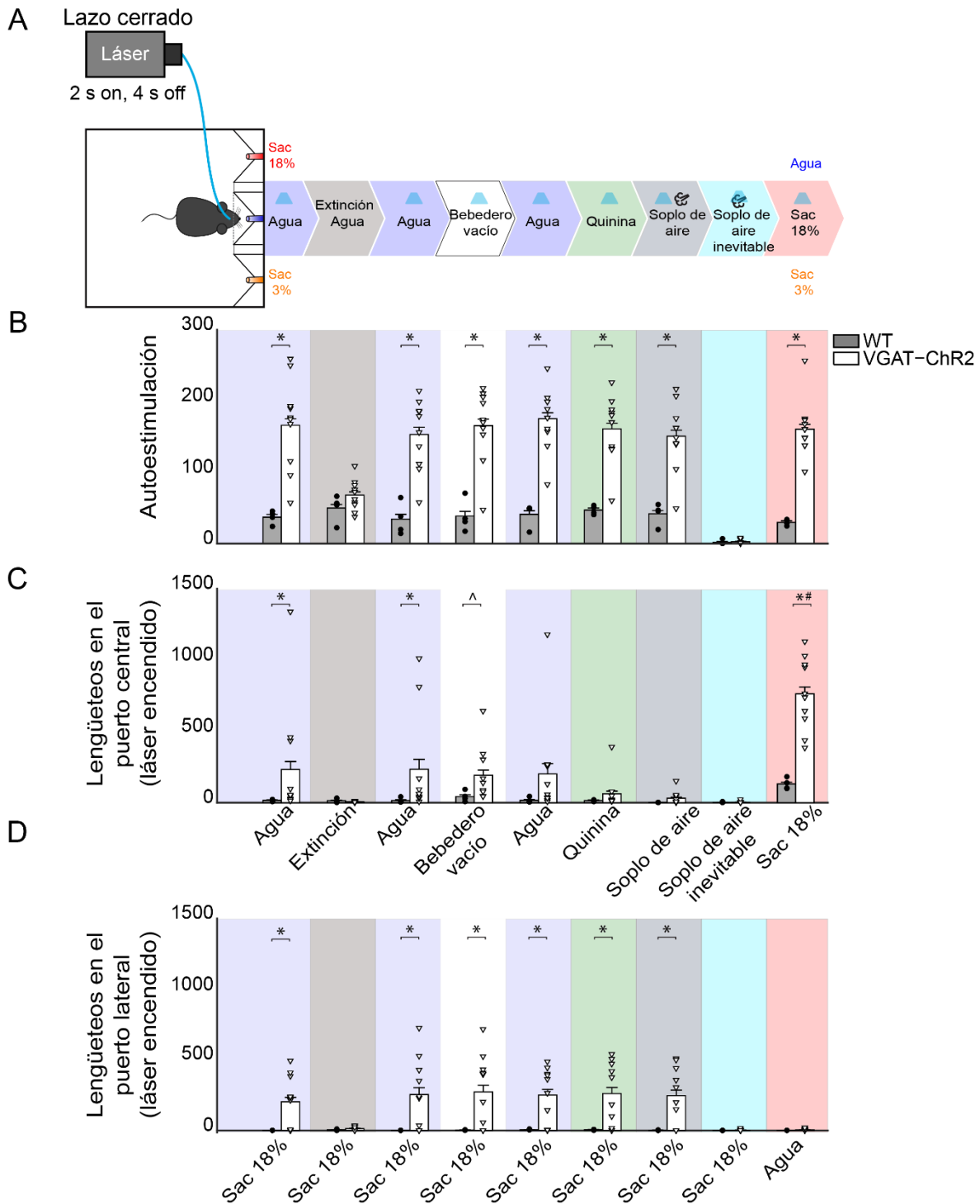


Figura 20. La activación de las neuronas HL^{Vgat+} no inducen el consumo de sabores amargos ni de estímulos aversivos, pero promueve el sobreconsumo de sacarosa. **A.** Esquema conductual, indica los diferentes estímulos gustativos presentados en el puerto central. El estímulo de agua fue remplazado por un bebedero vacío, quinina, un soplo de aire o sacarosa al 18%. En todas las fases, el láser fue encendido cada que el animal introducía su cabeza al puerto central, excepto en la fase de “soplo de aire inevitable”, donde el primer lengüeteo en el sipper del puerto central liberada la fotoestimulación y el soplo de aire al mismo tiempo, y las sesiones de extinción

(permaneció apagado). **B.** Número de autoestimulaciones para cada estímulo presentado en el puerto central. El grupo de ratones VGAT-ChR2 visitó más veces el puerto central en comparación con el grupo WT, excepto durante las fases de “extinción” y “soplo de aire inevitable”. **C.** Número de lengüeteos en el puerto central para cada estímulo durante el periodo de fotoestimulación (2.5 s a partir del encendido del láser). Los lengüeteos en el puerto central disminuyeron ante la entrega de estímulos aversivos como quinina o soplos de aire. Mientras, la presentación de estímulos no comestibles como un bebedero vacío, incrementa el número de lengüeteos en el grupo VGAT-ChR2 en comparación con el grupo WT. Además, la liberación de sacarosa al 18% en el puerto central aumentó sustancialmente la ingesta del grupo VGAT-ChR2 en comparación con el grupo WT. **D.** Número de lengüeteos en el puerto lateral que contenía sacarosa al 18% durante el periodo de fotoestimulación. Cada círculo y triángulo representan los valores individuales de cada sujeto. [^] denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre relativa al grupo WT, se utilizó una Prueba t-Student no pareada. * $p < 0.05$ diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo WT. # $p < 0.05$, sacarosa al 18% alcanzó diferencias estadísticamente significativas en comparación con el resto de los estímulos liberados en el puerto central. Se analizó con una prueba ANOVA de 2 vías, seguida de una prueba *post hoc* Holm Sidak.

9.14 La activación de las neuronas GABAérgicas incrementa el consumo de quinina, pero sólo cuando los animales están privados de agua

Una vez demostrado que, ante la presencia de sacarosa, la activación de las neuronas HL^{Vgat+} no inducen el consumo de quinina (Figura 20C; quinina, sombreado verde). Probamos con un nuevo grupo de ratones ingenuos, si la activación de estas neuronas podría inducir el consumo de quinina cuando era la única opción disponible. Como ya habíamos observado, la activación de las neuronas HL^{Vgat+} en ratones saciados no promueve el consumo de quinina (Figura 21A, Prueba t-Student no pareada, $t_{(46)} = 0.9925$, $p = 0.3262$). Sorprendentemente, bajo el estado de privación de agua, el grupo de ratones transgénicos VGAT-ChR2 incrementó significativamente el consumo de quinina en comparación con el grupo WT (Figura 21B-*panel izquierdo*, Prueba t-Student no pareada, $t_{(46)} = 2.958$, $p < 0.01$), específicamente durante el periodo de fotoestimulación (Figura 21B-*panel central*; Prueba t-Student no pareada, $t_{(46)} = 4.473$, $p < 0.0001$) sugiriendo que la activación de las neuronas GABAérgicas durante un estado de necesidad homeostática es suficiente para incrementar la tolerancia ante estímulos amargos y aversivos. En cambio, el sobreconsumo que promueve la activación de estas neuronas ante estímulos altamente palatables (sacarosa al 18%) no depende del estado interno del sujeto (Figura 21C-D;

Saciado: Prueba t-Student no pareada, $t_{(30)} = 6.933$, $p < 0.0001$; Privación de agua: Prueba t-Student no pareada, $t_{(30)} = 3.183$, $p < 0.01$).

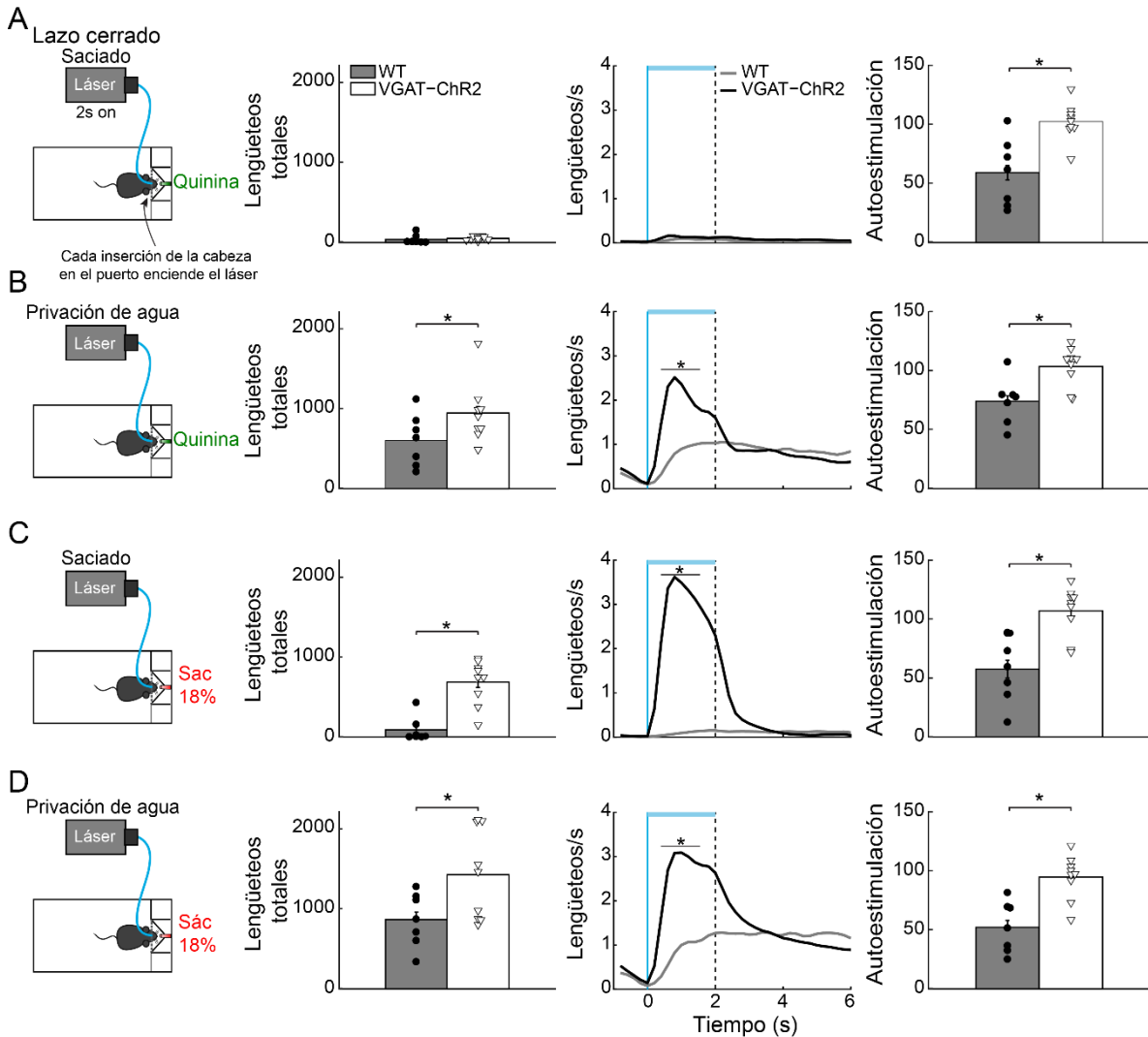


Figura 21. Bajo el estado de privación de agua, la activación de las neuronas GABAérgicas del HL fomentan el consumo de estímulos aversivos. A. Ratones saciados fueron colocados en una caja conductual, donde tuvieron acceso libre a un bebedero con quinina. El láser se encendió bajo un protocolo de lazo cerrado (*panel izquierdo*). En ratones saciados, la activación de estas neuronas no induce el consumo de quinina (*panel central*, muestra un PSTH de la tasa de lengüeteos alineada al inicio del láser). Sin embargo, continúan autoestimulándose (*panel derecho*). **B.** Ratones privados de agua consumen más quinina que el grupo WT (*panel izquierdo*), específicamente durante el periodo de fotoestimulación (*panel central*). **C-D.** Número total de lengüeteos (*panel izquierdo*), PSTH de la tasa de lengüeteos en el periodo de fotoestimulación (*panel central*), y el número de autoestimulaciones (*panel derecho*) durante el estado de saciedad y privación de agua. La línea azul horizontal indica el periodo de fotoestimulación. Las líneas verticales azul y negro indican el inicio y apagado del láser, respectivamente. * $p < 0.01$ indica diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo WT. Se utilizó una prueba t-Student no pareada.

9.15 La activación de las neuronas GABAérgicas mejora la palatabilidad de los estímulos gustativos

Por último, exploramos si la activación de las neuronas HL^{Vgat+} podrían mejorar la palatabilidad de los estímulos gustativos. Para ello, empleamos nuevamente la prueba de acceso breve y utilizamos un nuevo grupo de ratones ingenuos que fueron privados de agua. Como estímulos gustativos liberamos agua, sacarosa al 3 y 18%, cada estímulo se entregó en orden semi-aleatorio a lo largo de la sesión. La Figura 22A, muestra la estructura de la tarea. Encontramos que el grupo de ratones WT y VGAT-ChR2 incrementó su tasa de lengüeteo en función de la concentración de la sacarosa (Figura 22B; ANOVA de 2 vías, efecto de estímulos gustativos $F_{(2, 174)} = 9.101$, $p < 0.001$). Sin embargo, durante el periodo de fotoestimulación (2 s), el grupo de ratones transgénicos VGAT-ChR2 mostró un incremento en el consumo de los tres estímulos gustativos, pero al término de ésta disminuyó su tasa de lengüeteo para agua y sacarosa al 3% en comparación con el grupo WT (Figura 22B, *panel derecho*; ANOVA de 2 vías, interacción entre el grupo y los estímulos gustativos $F_{(2, 174)} = 5.293$, $p < 0.01$). Además, encontramos que cuando la fotoestimulación fue pareada sólo a los ensayos de agua, el grupo de ratones transgénicos VGAT-ChR2 incrementó selectivamente su tasa de lengüeteo por agua (Figura 22C, *panel derecho*; ANOVA de 2 vías, interacción entre el grupo y los estímulos gustativos $F_{(2, 84)} = 6.009$, $p < 0.01$), sobrepasando la respuesta evocada por el estímulo más palatable (sacarosa al 18%), y sólo durante el periodo de fotoestimulación. Este mismo resultado lo observamos cuando asociamos la fotoestimulación con los ensayos de sacarosa al 3% (Figura 22D, *panel derecho*; ANOVA de 2 vías, interacción entre el grupo y los estímulos gustativos $F_{(2, 84)} = 16.72$, $p < 0.0001$) y 18% (Figura 22E; *panel derecho*, ANOVA de 2 vías, interacción entre el grupo y los estímulos gustativos $F_{(2, 84)} = 16.49$, $p < 0.0001$). En este último resultado, observamos que una vez terminado de periodo de fotoestimulación, la tasa de lengüeteo se mantuvo a lo largo del periodo de recompensa.

También probamos si la activación artificial de estas neuronas podría ser prolongada a lo largo de todo el periodo de recompensa. Encontramos el mismo patrón de facilitación y mejoramiento de palatabilidad durante el tiempo que permaneció encendido el láser (Figura 22F-I, ver flechas; Todos los ensayos: ANOVA de 2 vías, efecto de estímulos gustativos $F_{(2, 114)} = 12.53$, $p < 0.001$; Ensayos de agua: ANOVA de 2 vías, interacción entre el grupo y los estímulos gustativos $F_{(2, 84)} = 9.85$, $p < 0.001$; Ensayos de sacarosa al 3%: ANOVA de 2 vías, interacción entre el grupo y los estímulos gustativos $F_{(2, 84)} = 33.47$, $p < 0.0001$; Ensayos de sacarosa al 18%: ANOVA de 2 vías, interacción entre el grupo y los estímulos gustativos $F_{(2, 84)} = 8.36$, $p < 0.001$). Estos resultados sugieren, que la activación corta o sostenida de las neuronas GABAérgicas del HL mejora la palatabilidad de los estímulos gustativos, reflejado en el incremento de sus respuestas oromotoras. Además, verificamos que la activación artificial de estas neuronas se sostiene a lo largo de todo el periodo de recompensa a través registros electrofisiológicos en el HL (Figura 22J). Y nos aseguramos que los roedores no utilizaron la luz que emite el láser como pista para guiar su conducta, a través de una fibra falsa conectada a la cabeza del ratón (Figura 22K; ANOVA de 2 vías, interacción entre el grupo y los estímulos gustativos $F_{(2, 54)} = 1.619$, $p = 0.207$). En resumen, nuestros datos demuestran que la activación de las neuronas GABAérgicas desencadenan una señal de recompensa que amplifica el valor hedónico positivo de los estímulos gustativos próximos, promoviendo su sobreconsumo.

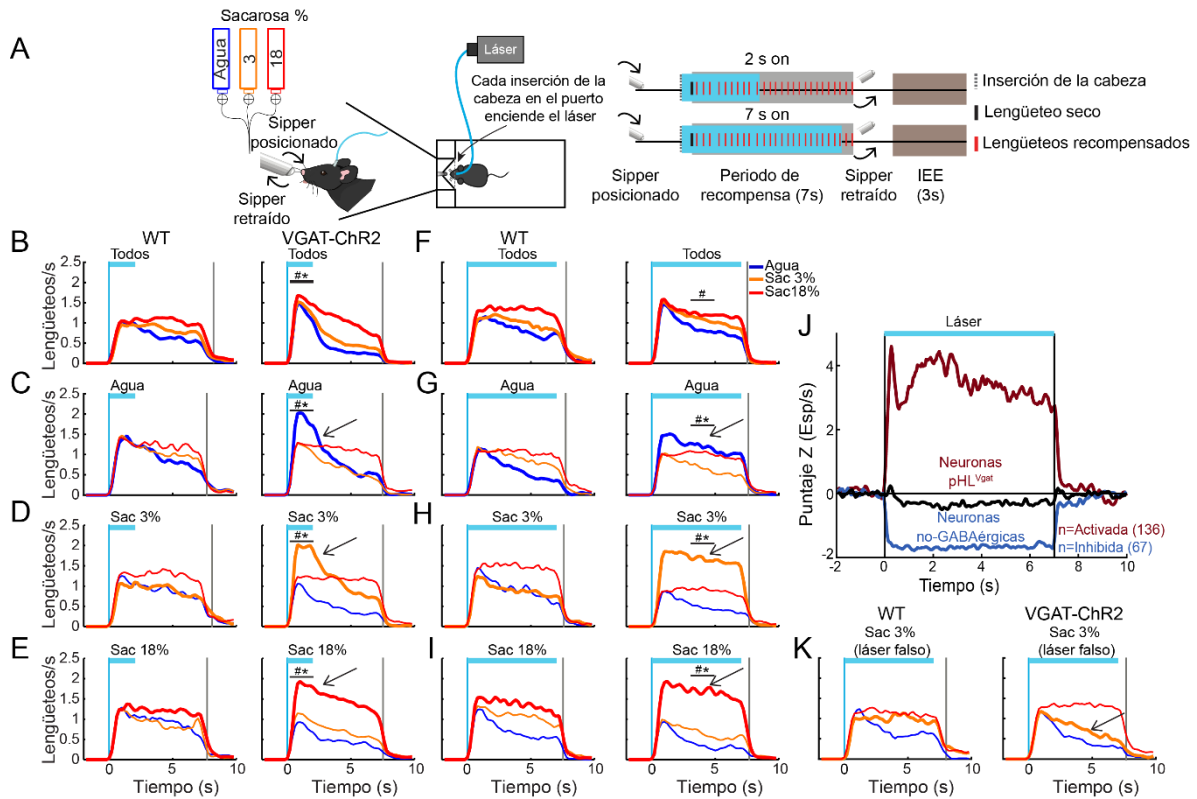


Figura 22. La activación de las neuronas GABAérgicas del HL mejora la palatabilidad a agua y sacarosa. **A.** Esquema conductual. *Panel izquierdo*, se utilizó el protocolo de lazo cerrado durante la prueba de acceso breve. La caja contuvo un bebedero acoplado a un sipper donde se liberó agua, sacarosa al 3 o 18%. *Panel derecho*, estructura del ensayo. El ensayo inicia cuando el sujeto inserta su cabeza en el puerto (línea punteada gris), esto provoca el encendido del láser (rectángulo azul). El periodo de recompensa comienza con el primer lengüeteo en seco sobre el sipper (marca negra), con una duración de 7 s (rectángulo gris). A lo largo de este periodo, cada lengüeteo libera una gota (~ 2 μ L) del estímulo gustativo (lengüeteos recompensados, marcas rojas). Al final del periodo de recompensa, el sipper se retrae, y al término del IEE (3 s), el sipper vuelve a posicionarse para iniciar un nuevo ensayo. Según la sesión, el periodo de fotoestimulación se mantuvo por 2 s (B-E) o 7 s (F-I). **B-E.** Conjunto de datos donde el periodo fotoestimulación tuvo una duración de 2 s. Se muestran los PSTH de la tasa de lengüeteo para el grupo de ratones WT (*panel izquierdo*) y VGAT-ChR2 (*panel derecho*) alineados (Tiempo = 0 s) al inicio del láser. El periodo de fotoestimulación se liberó para todos los ensayos (B), o sólo durante los ensayos de agua (C, flecha), durante los ensayos de sacarosa al 3% (D) o 18% (E). **F-I.** PSTH de la tasa de lengüeteos durante los 7 s de fotoestimulación. Mismas convenciones que en B-E. * denota las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) relativo al grupo WT. # diferencias estadísticamente significativas entre estímulos ($p < 0.05$). Se utilizó una ANOVA de 2 vías, seguida de una prueba *post hoc* Holm Sidak. **J.** Actividad neuronal normalizada ($n = 284$), registrada en el HL de 3 ratones VGAT-ChR2. La fotoestimulación duró 7s con una frecuencia de 50 Hz. Las respuestas neuronales están alineadas al encendido del láser. Los colores rojo y azul indican las respuestas de las neuronas que se activaron o inhibieron ante la presentación del láser en comparación con el periodo basal (- 1 a 0 s). El trazo negro ilustra las neuronas que no se modularon por el láser. **K.** La fotoestimulación falsa no afecta la palatabilidad. La fotoestimulación fue liberada sólo en los ensayos de sacarosa al 3% durante 7 s (flecha). Los ratones fueron conectados a una fibra falsa (que no estaba conectada al láser), y la fibra real se pegó a ella para emitir luz azul por encima de la cabeza del ratón. Se observa que en ambos grupos incrementa la tasa de lengüeteo en función de la palatabilidad del estímulo gustativo. La línea azul vertical indica el inicio del periodo de fotoestimulación (Tiempo = 0 s), las líneas grises denotan el final del periodo de la recompensa. La línea azul horizontal muestra el periodo de fotoestimulación.

10. DISCUSIÓN

Históricamente, el HL ha sido entendido como el centro de alimentación (Anand and Brobeck, 1951; Delgado and Anand, 1953; Teitelbaum and Epstein, 1962), pero también participa en el procesamiento de la palatabilidad de la sacarosa (Norgren, 1970; Ono et al., 1986; Li et al., 2013). La sacarosa además de otorgar un valor calórico, su cualidad gustativa dulce la hace un atributo sensorial palatable o hedónico que determina el atractivo de un alimento. A pesar de que se ha relacionado el sobreconsumo de alimentos con alto contenido en azúcares, no existe en la literatura información sobre tipo celular específico que participa en el procesamiento de la palatabilidad de la sacarosa en el HL. Nuestros resultados demuestran que una subpoblación de neuronas HL^{Vgat+} codifican la palatabilidad de la sacarosa. Estas neuronas muestra dos patrones con modulación opuesta: correlacionan positiva o negativamente con las respuestas oromotoras, pero con un sesgo hacia el lado positivo. También encontramos, que la activación de las neuronas HL^{Vgat+} en un protocolo de lazo abierto promueven la conducta de aproximación y el consumo del estímulo gustativo más saliente y palatable. Por el contrario, en un protocolo de lazo cerrado, las neuronas HL^{Vgat+} inducen el consumo del estímulo líquido más cercano; aun con la disponibilidad de estímulos gustativos con mayor valor hedónico, pero distales. Además, su activación también promueve el consumo y la exploración por el estímulo sólido disponible más palatable. La suma de estos datos muestra que las neuronas HL^{Vgat+} procesan y/o combinan al menos dos tipos de información: 1) Relacionada a la proximidad del estímulo, y 2) relacionada a la palatabilidad o valor hedónico del estímulo, que potencia su saliencia. Nuestros resultados revelan una nueva función de las neuronas HL^{Vgat+} como potenciadores fisiológicos en la palatabilidad de la sacarosa.

Estudios previos han encontrado que la activación de las neuronas HL^{Vgat+} es recompensante, induce un consumo voraz (Jennings et al., 2015; Navarro et al., 2016) y

promueve la interacción con el estímulo más cercano (tanto de objetos como de sus congéneres) (Nieh et al., 2016), sugiriendo que estas neuronas tienen un rol en múltiples conductas relacionadas con la motivación. También se sabe que el HL envía eferencias y recibe aferencias de múltiples regiones corticales y subcorticales gustativas (Berk and Finkelstein, 1982; Ter Horst and Luiten, 1987; Simerly, 2004; Berthoud and Münzberg, 2011; Rolls, 2015), y estudios electrofisiológicos han reportado que las neuronas del HL responden ante estímulos gustativos, en particular aquellos que son palatables (Norgren, 1970; Ono et al., 1986; Schwartzbaum, 1988; Yamamoto et al., 1989; Karádi et al., 1992). Como se describió anteriormente, definimos operacionalmente a la palatabilidad como la facilitación hedónica positiva que es reflejada en el incremento de las respuestas oromotoras (tasa de lengüeteos o el tamaño de la ráfaga de lengüeteos) ante el aumento de la concentración de sacarosa (Berridge and Grill, 1983; Spector et al., 1998; Villavicencio et al., 2018). De acuerdo con esta definición, encontramos que las neuronas relacionadas a la palatabilidad rastrean la conducta de lengüeteo, incrementando o disminuyendo su tasa de disparo de manera dependiente a la concentración de la sacarosa. Además, a lo largo de la sesión de la prueba de acceso breve, encontramos estas neuronas muestran predilección por rastrear la palatabilidad de la sacarosa en comparación a las señales de hambre y saciedad.

También encontramos, que la activación de las neuronas HL^{Vgat+} pueden funcionar como facilitadores/potenciadores de la palatabilidad de diferentes estímulos gustativos. La activación optogenética de estas neuronas puede potenciar la palatabilidad del agua si es el estímulo más cercano. Encontramos un incremento en la tasa de lengüeteo durante la fotoestimulación asociada con el agua, este incremento en el consumo indica que la activación de estas neuronas aumenta el valor hedónico del agua, dado que la tasa de lengüeteo es similar a cuando el animal está probando una concentración alta de sacarosa.

Además, la activación de las neuronas HL^{Vgat+} promueve el consumo de sacarosa líquida o sólida (cubo de sacarosa granulado). También, estas neuronas inducen el consumo de alimentos más palatables que la sacarosa, como los pellets de una dieta alta en grasas. Este resultado es similar a la activación de las neuronas GABAérgicas de la ZI (Zhang and van den Pol, 2017).

Es importante enfatizar que la fotoestimulación de las neuronas HL^{Vgat+} se asemeja a los comportamientos evocados por la estimulación eléctrica de este núcleo. Nuestros datos pueden responder las similitudes y diferencias de algunos de los resultados inducidos por la estimulación eléctrica: 1) Algunos estudios reportan que el incremento en la EEIC en el HL asociada al palanqueo sólo ocurre en presencia de alimento (o sacarosa), y cuando éste es próximo (Mendelson, 1967; Coons and Cruce, 1968; Valenstein and Cox, 1970). También se ha observado un incremento en la tasa EEIC ante la presentación de sabores dulces (Phillips and Mogenson, 1968; Poschel, 1968). Estos resultados pueden ser explicados por el papel que juega las neuronas HL^{Vgat+} como potenciadores de la palatabilidad de la sacarosa encontrado en este trabajo. 2) Los trabajos de estimulación eléctrica han mostrado una alta variabilidad en el fenómeno de alimentación ligada a la estimulación, por ejemplo, uno de estos estudios reporta esta conducta sólo en 12 de 34 ratas (Valenstein and Cox, 1970). Contrario a nuestros datos, la alimentación inducida por el láser se observa en todos los animales probados ($n = 31$; de la Figura 12 a la 22). 3) De forma similar, esta variabilidad fue observada cuando se realiza estimulación optogenética inespecífica, activando todo los tipos celulares del HL simultáneamente (Urstadt and Berridge, 2020). Dichos estudios reportan que la repetición continua de la estimulación (tanto eléctrica u optogenética) a lo largo de los días, interrumpe la alimentación ligada a la estimulación, hasta sólo mostrar la conducta de autoestimulación. Sugiriendo que estos dos procesos no tienen una correlación directa y son flexibles (Gigante et al., 2016; Urstadt and

Berridge, 2020). Estos resultados son opuestos a nuestros datos, nosotros encontramos que la repetición de la fotoestimulación en las neuronas HL^{Vgat+} incrementa la alimentación ligada al láser. Asimismo, observamos una correlación directa entre la autoestimulación optogenética y la alimentación ligada al láser a lo largo de los días (Figura 18). Aseveramos que entre más se autoestimulen los animales, se evoca con mayor fuerza la conducta de alimentación ligada al láser. Por tanto, las neuronas HL^{Vgat+} son el sustrato neural común en las conductas de ingesta y de recompensa. Hoy también se sabe, que la información relacionada a la ingesta está ligada a las aferencias GABAérgica del HL que recibe la periferia del Locus Cerúleo (Marino et al., 2020), mientras que la vía de la recompensa, involucra a las proyecciones GABAérgicas del HL que inervan el ATV (Nieh et al., 2016).

Dado que las neuronas del HL están involucradas en los procesos de recompensa y aversión (Ono et al., 1986), probamos si las neuronas HL^{Vgat+} promueven el consumo de sabores amargos. Encontramos que la fotoestimulación de estas neuronas no induce el consumo de quinina ni de estímulos nocivos como un soplo aire cuando la sacarosa está disponible. Por lo tanto, las neuronas HL^{Vgat+} no incrementan la preferencia por estímulos aversivos y próximos cuando se encuentra disponible otro estímulo gustativo más palatable. Este rechazo por la quinina también sucede cuando se presenta como la única opción disponible en animales saciados. Sin embargo, cuando los animales están privados de agua, la activación de las neuronas HL^{Vgat+} promueve un consumo copioso. Nuestros datos demuestran que la conducta inducida por la activación de estas neuronas depende de la palatabilidad del estímulo y del estado interno del animal. Estos resultados concuerdan con un estudio reciente, en el cual la inhibición quimiogénica de las neuronas HL^{Vgat+} no tuvo efecto sobre la tolerancia por estímulos aversivos. De modo que, en ratones saciados, estas neuronas no son necesarias para expresar respuestas hedónicamente negativas provocadas por el consumo de sabores amargos (Fu et al., 2019). Sin embargo, en este

trabajo, no exploraron la suficiencia de las neuronas GABAérgicas del HL. Nuestros resultados muestran que la privación de agua acompañada de la activación de las neuronas HL^{Vgat+} induce el consumo de quinina, y además demuestra que esta activación es suficiente para incrementar la aceptación o tolerancia por sabores aversivos bajo un estado de necesidad homeostática (sed).

El HL está compuesto por múltiples poblaciones neuronales que se sobreponen, las cuales están definidas por sus marcadores genéticos que expresan, como neuropéptidos, receptores y proteínas relacionadas a la síntesis y empaquetamiento vesicular de neurotransmisores (Bonnavion et al., 2016; Mickelsen et al., 2019). Por lo tanto, las poblaciones de las neuronas HL^{Vgat+} puede ser subdividida en neuronas GABA que también expresan el receptor a leptina (Leininger et al., 2011), el neuropéptido galanina (Qualls-Creekmore et al., 2017) o de Nts (Kurt et al., 2019). Se sabe que la activación de las neuronas que expresan GABA y el receptor a leptina del HL son recompensantes (Giardino et al., 2018), similar a las neuronas HL^{Vgat+}. Asimismo, la activación de las neuronas GABA que expresan galanina, promueven conductas apetitivas, pero diferente a las neuronas HL^{Vgat+} no induce la conducta de ingesta (Qualls-Creekmore et al., 2017). De estas subpoblaciones, solo las neuronas del HL que expresan GABA y Nts (HL^{Vgat+/Nts}) presentan algunos de los efectos conductuales reportados aquí. Contrario a nuestros datos, la activación quimiogénica de las neuronas HL^{Vgat+/Nts} no incrementa el consumo de dieta chow, pero si promueve el consumo de estímulos palatables líquidos (NaCl y sacarosa). Además, en animales saciados, la activación estas neuronas incrementa el consumo de quinina, pero en menor magnitud y sólo si está acompañado de la ingesta de dieta chow (resultados que contrastan con nuestros hallazgos). En este artículo no exploran la ingesta de quinina en ausencia de dieta chow o con ratones privados de agua. Sin embargo, realizan una prueba de preferencia con dos botellas. Ellos encuentran que las neuronas

HL^{Vgat+/Nts} incrementan el consumo de agua sobre quinina, sugiriendo que estas neuronas no desarrollan preferencia por sabores amargos, similar a las neuronas HL^{Vgat+}. Análogo a nuestros datos, la activación de las neuronas HL^{Vgat+/Nts} facilitan el consumo por sacarosa (Kurt et al., 2019). Es de interés determinar el rol de las neuronas HL^{Vgat+/Nts} en la codificación y la potenciación de la palatabilidad a sacarosa. Estos resultados sugieren que el HL contiene funciones anidadas en cada subpoblación neuronal, y que son reclutadas selectivamente para ejercer un control más refinado sobre las conductas de ingesta y recompensa.

Una limitación en este estudio es que empleamos la cepa transgénica de ratones VGAT-ChR2, la cual está diseñada con la técnica de cromosomas artificiales bacterianos (BAC, por sus siglas en inglés). Esta cepa expresa constitutivamente el ChR2 en las neuronas GABAérgicas que contienen al gen que codifica al VGAT (Zhao et al., 2011). En este modelo, no podemos descartar la activación involuntaria de terminales GABAérgicas de regiones distales (Thoeni et al., 2020), una condición que también ocurre con la estimulación eléctrica. Sin embargo, este modelo transgénico también tiene sus ventajas, como una expresión más consistente de la ChR2 (Zeng and Madisen, 2012) y patrones de expresión del transgén heredables a lo largo de cohortes experimentales (Ting and Feng, 2013), lo cual incrementa la reproducibilidad del efecto en muestras grandes de animales probados. También es un modelo más selectivo para caracterizar a las neuronas GABAérgicas (excluyendo el componente glutamatérgico) y sus efectos relacionados a los hallazgos clásicos observados con la estimulación eléctrica del HL (Delgado and Anand, 1953; Phillips and Mogenson, 1968).

11. CONCLUSION

Las neuronas GABAérgicas del HL se encargan de codificar la palatabilidad de la sacarosa. Son una red neuronal que vincula dos aspectos: 1) la información relacionada a la palatabilidad y, 2) la proximidad de estímulos gustativos. Su activación potencia el valor hedónico de estímulos cercanos y fomenta el sobreconsumo de aquellos que ya son altamente palatables, como los alimentos que contienen azúcares (sacarosa). Este nuevo papel, las coloca como un posible objetivo farmacológico para modular la palatabilidad de alimentos calóricos que inducen obesidad.

12. REFERENCIAS

- Anand BK, Brobeck JR (1951) Localization of a “feeding center” in the hypothalamus of the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 77:323–324.
- Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM (2011) AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci* 14:351–355.
- Berk ML, Finkelstein JA (1982) Efferent connections of the lateral hypothalamic area of the rat: an autoradiographic investigation. *Brain Res Bull* 8:511–526.
- Berridge KC, Grill HJ (1983) Alternating ingestive and aversive consummatory responses suggest a two-dimensional analysis of palatability in rats. *Behavioral neuroscience* 97:563–573.
- Berthoud H-R, Münzberg H (2011) The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics. *Physiol Behav* 104:29–39.
- Betley JN, Cao ZFH, Ritola KD, Sternson SM (2013) Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell* 155:1337–1350.
- Bonnavion P, Mickelsen LE, Fujita A, de Lecea L, Jackson AC (2016) Hubs and spokes of the lateral hypothalamus: cell types, circuits and behaviour. *J Physiol (Lond)* 594:6443–6462.
- Breslin PAS (2013) An Evolutionary Perspective on Food and Human Taste. *Current Biology* 23:R409–R418.
- Brown JA, Bugescu R, Mayer TA, Gata-Garcia A, Kurt G, Woodworth HL, Leininger GM (2017) Loss of Action via Neurotensin-Leptin Receptor Neurons Disrupts Leptin and Ghrelin-Mediated Control of Energy Balance. *Endocrinology* 158:1271–1288.
- Buonomano DV (2003) Timing of neural responses in cortical organotypic slices. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4897–4902.
- Butler MJ, Eckel LA (2018) Eating as a motivated behavior: modulatory effect of high fat diets on energy homeostasis, reward processing and neuroinflammation. *Integr Zool* 13:673–686.
- Coons EE, Cruce JA (1968) Lateral hypothalamus: food current intensity in maintaining self-stimulation of hunger. *Science* 159:1117–1119.
- Davis JD, Perez MC (1993) Food deprivation- and palatability-induced microstructural changes in ingestive behavior. *The American journal of physiology* 264:R97-103.
- de Lecea L (2015) Optogenetic control of hypocretin (orexin) neurons and arousal circuits. *Curr Top Behav Neurosci* 25:367–378.
- Delgado JM, Anand BK (1953) Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *The American journal of physiology* 172:162–168.
- DiFeliceantonio AG, Coppin G, Rigoux L, Edwin Thanarajah S, Dagher A, Tittgemeyer M, Small DM (2018) Supra-Additive Effects of Combining Fat and Carbohydrate on Food Reward. *Cell Metab* 28:33-44.e3.

- Ferssiwi A, Cardo B, Velley L (1987) Gustatory preference-aversion thresholds are increased by ibotenic acid lesion of the lateral hypothalamus in the rat. *Brain Res* 437:142–150.
- Formolo DA, Gaspar JM, Melo HM, Eichwald T, Zepeda RJ, Latini A, Okun MS, Walz R (2019) Deep Brain Stimulation for Obesity: A Review and Future Directions. *Front Neurosci* 13:323.
- Fu O, Iwai Y, Narukawa M, Ishikawa AW, Ishii KK, Murata K, Yoshimura Y, Touhara K, Misaka T, Minokoshi Y, Nakajima K (2019) Hypothalamic neuronal circuits regulating hunger-induced taste modification. *Nat Commun* 10:1–14.
- Giardino WJ, Eban-Rothschild A, Christoffel DJ, Li S-B, Malenka RC, de Lecea L (2018) Parallel circuits from the bed nuclei of stria terminalis to the lateral hypothalamus drive opposing emotional states. *Nat Neurosci* 21:1084–1095.
- Gigante ED, Benaliouad F, Zamora-Olivencia V, Wise RA (2016) Optogenetic Activation of a Lateral Hypothalamic-Ventral Tegmental Drive-Reward Pathway. *PLoS ONE* 11:e0158885.
- Grill, Berridge KC (1985) Taste reactivity as a measure of the neural control of palatability. In: *Progress in Psychobiology and Physiological Psychology.*, pp 1–54. Orlando, FL.: Academic Press.
- Grossman SP, Grossman L (1982) Iontophoretic injections of kainic acid into the rat lateral hypothalamus: effects on ingestive behavior. *Physiol Behav* 29:553–559.
- Gutierrez R, Carmena JM, Nicolelis MAL, Simon SA (2006) Orbitofrontal ensemble activity monitors licking and distinguishes among natural rewards. *J Neurophysiol* 95:119–133.
- Gutierrez R, Fonseca E, Simon SA (2020) The neuroscience of sugars in taste, gut-reward, feeding circuits, and obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences* Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03458-2>.
- Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C (1991) Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41:89–125.
- Hetherington AW, Ranson SW (1940) Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record* 78:149–172.
- Hoebel BG, Teitelbaum P (1962) Hypothalamic control of feeding and self-stimulation. *Science* 135:375–377.
- Hsiao S, Fan RJ (1993) Additivity of taste-specific effects of sucrose and quinine: microstructural analysis of ingestive behavior in rats. *Behav Neurosci* 107:317–326.
- Inutsuka A, Inui A, Tabuchi S, Tsunematsu T, Lazarus M, Yamanaka A (2014) Concurrent and robust regulation of feeding behaviors and metabolism by orexin neurons. *Neuropharmacology* 85:451–460.
- Jennings JH, Rizzi G, Stamatakis AM, Ung RL, Stuber GD (2013) The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science* 341:1517–1521.
- Jennings JH, Ung RL, Resendez SL, Stamatakis AM, Taylor JG, Huang J, Veleta K, Katak PA, Aita M, Shilling-Scriver K, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Otte S, Stuber GD (2015) Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell* 160:516–527.

- Kahn D, Abrams GM, Zimmerman EA, Carraway R, Leeman SE (1980) Neurotensin neurons in the rat hypothalamus: an immunocytochemical study. *Endocrinology* 107:47–54.
- Karádi Z, Oomura Y, Nishino H, Scott TR, Lénárd L, Aou S (1992) Responses of lateral hypothalamic glucose-sensitive and glucose-insensitive neurons to chemical stimuli in behaving rhesus monkeys. *J Neurophysiol* 67:389–400.
- Kurt G, Woodworth HL, Fowler S, Bugescu R, Leininger GM (2019) Activation of lateral hypothalamic area neurotensin-expressing neurons promotes drinking. *Neuropharmacology* 154:13–21.
- Kurt G, Woodworth HL, Leininger GM (2017) Lateral Hypothalamic Control of Energy Balance. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function* 9:i–106.
- Leininger GM, Opland DM, Jo Y-H, Faouzi M, Christensen L, Cappellucci LA, Rhodes CJ, Gnegy ME, Becker JB, Pothos EN, Seasholtz AF, Thompson RC, Myers MG (2011) Leptin Action via Neurotensin Neurons Controls Orexin, the Mesolimbic Dopamine System and Energy Balance. *Cell Metabolism* 14:313–323.
- Li JX, Yoshida T, Monk KJ, Katz DB (2013) Lateral hypothalamus contains two types of palatability-related taste responses with distinct dynamics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:9462–9473.
- Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS, Maratos-Flier E (2001) Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 107:379–386.
- Marino RAM, McDevitt RA, Gantz SC, Shen H, Pignatelli M, Xin W, Wise RA, Bonci A (2020) Control of food approach and eating by a GABAergic projection from lateral hypothalamus to dorsal pons. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Mathis A, Mamidanna P, Cury KM, Abe T, Murthy VN, Mathis MW, Bethge M (2018) DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat Neurosci* 21:1281–1289.
- Mendelson J (1967) Lateral hypothalamic stimulation in satiated rats: the rewarding effects of self-induced drinking. *Science* 157:1077–1079.
- Mickelsen LE, Bolisetty M, Chimileski BR, Fujita A, Beltrami EJ, Costanzo JT, Naparstek JR, Robson P, Jackson AC (2019) Single-cell transcriptomic analysis of the lateral hypothalamic area reveals molecularly distinct populations of inhibitory and excitatory neurons. *Nat Neurosci* 22:642–656.
- Mogenson GJ, Stevenson JA (1967) Drinking induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Experimental neurology* 17:119–127.
- Nath T, Mathis A, Chen AC, Patel A, Bethge M, Mathis MW (2019) Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nat Protoc* 14:2152–2176.
- Navarro M, Olney JJ, Burnham NW, Mazzone CM, Lowery-Gionta EG, Pleil KE, Kash TL, Thiele TE (2016) Lateral Hypothalamus GABAergic Neurons Modulate Consummatory Behaviors Regardless of the Caloric Content or Biological Relevance of the Consumed Stimuli. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 41:1505–1512.

- Nieh EH, Matthews GA, Allsop SA, Presbrey KN, Leppla CA, Wichmann R, Neve R, Wildes CP, Tye KM (2015) Decoding neural circuits that control compulsive sucrose seeking. *Cell* 160:528–541.
- Norgren R (1970) Gustatory responses in the hypothalamus. *Brain Res* 21:63–77.
- O'Connor EC, Kremer Y, Lefort S, Harada M, Pascoli V, Rohner C, Lüscher C (2015) Accumbal D1R Neurons Projecting to Lateral Hypothalamus Authorize Feeding. *Neuron* 88:553–564.
- OECD (2019) Health at a Glance 2019. Available at: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/4dd50c09-en>.
- Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419–427.
- Ono T, Nakamura K, Nishijo H, Fukuda M (1986) Hypothalamic neuron involvement in integration of reward, aversion, and cue signals. *J Neurophysiol* 56:63–79.
- Perez IO, Villavicencio M, Simon SA, Gutierrez R (2013) Speed and accuracy of taste identification and palatability: impact of learning, reward expectancy, and consummatory licking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305:R252-270.
- Phillips AG, Mogenson GJ (1968) Effects of taste on self-stimulation and induced drinking. *J Comp Physiol Psychol* 66:654–660.
- Poschel BPH (1968) Do biological reinforcers act via the self-stimulation areas of the brain? *Physiology & Behavior* 3:53–60.
- Qualls-Creekmore E, Yu S, Francois M, Hoang J, Huesing C, Bruce-Keller A, Burk D, Berthoud H-R, Morrison CD, Münzberg H (2017) Galanin-Expressing GABA Neurons in the Lateral Hypothalamus Modulate Food Reward and Noncompulsive Locomotion. *J Neurosci* 37:6053–6065.
- Rolls ET (2015) Taste, olfactory, and food reward value processing in the brain. *Prog Neurobiol* 127–128:64–90.
- Rossi MA, Basiri ML, McHenry JA, Kosyk O, Otis JM, van den Munkhof HE, Bryois J, Hübel C, Breen G, Guo W, Bulik CM, Sullivan PF, Stuber GD (2019) Obesity remodels activity and transcriptional state of a lateral hypothalamic brake on feeding. *Science* 364:1271–1274.
- Rossi MA, Stuber GD (2018) Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. *Cell Metab* 27:42–56.
- Schwartzbaum JS (1988) Electrophysiology of taste, feeding and reward in lateral hypothalamus of rabbit. *Physiol Behav* 44:507–526.
- Sclafani A (1991) The Hedonics of Sugar and Starch. In: *The hedonics of taste.*, pp 59–87. New York, NY.: Lawrence Erlbaum Associates, Inc.
- Sharpe MJ, Marchant NJ, Whitaker LR, Richie CT, Zhang YJ, Campbell EJ, Koivula PP, Necarsulmer JC, Mejias-Aponte C, Morales M, Pickel J, Smith JC, Niv Y, Shaham Y, Harvey BK, Schoenbaum G (2017) Lateral Hypothalamic GABAergic Neurons Encode Reward Predictions that Are Relayed to the Ventral Tegmental Area to Regulate Learning. *Current Biology* 27:2089-2100.e5.

- Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E (1998) Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396:670–674.
- Simerly RB (2004) Anatomical Substrates of Hypothalamic Integration. In: *The Rat Nervous System*. Academic Press.
- Spector AC, Klumpp PA, Kaplan JM (1998) Analytical issues in the evaluation of food deprivation and sucrose concentration effects on the microstructure of licking behavior in the rat. *Behavioral neuroscience* 112:678–694.
- Spector AC, Smith JC (1984) A detailed analysis of sucrose drinking in the rat. *Physiol Behav* 33:127–136.
- Stamatakis AM, Swieten MV, Basiri ML, Blair GA, Katak P, Stuber GD (2016) Lateral Hypothalamic Area Glutamatergic Neurons and Their Projections to the Lateral Habenula Regulate Feeding and Reward. *J Neurosci* 36:302–311.
- Stricker EM, Swerdloff AF, Zigmond MJ (1978) Intrahypothalamic injections of kainic acid produce feeding and drinking deficits in rats. *Brain Research* 158:470–473.
- Stuber GD, Wise RA (2016) Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nature neuroscience* 19:198–205.
- Teitelbaum P, Epstein AN (1962) The lateral hypothalamic syndrome: recovery of feeding and drinking after lateral hypothalamic lesions. *Psychological review* 69:74–90.
- Ter Horst GJ, Luiten PG (1987) Phaseolus vulgaris leuco-agglutinin tracing of intrahypothalamic connections of the lateral, ventromedial, dorsomedial and paraventricular hypothalamic nuclei in the rat. *Brain Res Bull* 18:191–203.
- Thoeni S, Loureiro M, O'Connor EC, Lüscher C (2020) Depression of Accumbal to Lateral Hypothalamic Synapses Gates Overeating. *Neuron*.
- Ting JT, Feng G (2013) Development of transgenic animals for optogenetic manipulation of mammalian nervous system function: progress and prospects for behavioral neuroscience. *Behav Brain Res* 255:3–18.
- Touzani K, Sclafani A (2002) Lateral hypothalamic lesions impair flavour-nutrient and flavour-toxin trace learning in rats. *Eur J Neurosci* 16:2425–2433.
- Urstadt KR, Berridge KC (2020) Optogenetic mapping of feeding and self-stimulation within the lateral hypothalamus of the rat. *PLoS ONE* 15:e0224301.
- Valenstein ES, Cox VC (1970) Influence of hunger, thirst, and previous experience in the test chamber on stimulus-bound eating and drinking. *J Comp Physiol Psychol* 70:189–199.
- Villavicencio M, Moreno MG, Simon SA, Gutierrez R (2018) Encoding of Sucrose's Palatability in the Nucleus Accumbens Shell and Its Modulation by Exteroceptive Auditory Cues. *Front Neurosci* 12:265.
- Yamamoto T, Matsuo R, Kiyomitsu Y, Kitamura R (1989) Response properties of lateral hypothalamic neurons during ingestive behavior with special reference to licking of various taste solutions. *Brain Res* 481:286–297.

- Young PT, Burrig RG, Tromater LJ (1963) Preferences of the white rat for solutions of sucrose and quinine hydrochloride. *Am J Psychol* 76:205–217.
- Zeng H, Madisen L (2012) Mouse transgenic approaches in optogenetics. *Prog Brain Res* 196:193–213.
- Zhang X, van den Pol AN (2017) Rapid binge-like eating and body weight gain driven by zona incerta GABA neuron activation. *Science* 356:853–859.
- Zhao S, Ting JT, Atallah HE, Qiu L, Tan J, Gloss B, Augustine GJ, Deisseroth K, Luo M, Graybiel AM, Feng G (2011) Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nature methods* 8:745–752.
- Zocchi D, Wennemuth G, Oka Y (2017) The cellular mechanism for water detection in the mammalian taste system. *Nat Neurosci* 20:927–933.



Lateral Hypothalamic GABAergic Neurons Encode and Potentiate Sucrose's Palatability

Aketzali Garcia, Alam Coss, Jorge Luis-Islas, Liliana Puron-Sierra, Monica Luna, Miguel Villavicencio and Ranier Gutierrez*

Laboratory of Neurobiology of Appetite, Department of Pharmacology, CINVESTAV, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Lionel Carneiro,
The Ohio State University,
United States

Reviewed by:

Chad L. Samuelsen,
University of Louisville, United States
Patricia M. Di Lorenzo,
Binghamton University, United States

*Correspondence:

Ranier Gutierrez
ranier@cinvestav.mx
orcid.org/0000-0002-9688-0289

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroenergetics, Nutrition and Brain
Health,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 18 September 2020

Accepted: 02 December 2020

Published: 21 January 2021

Citation:

Garcia A, Coss A, Luis-Islas J,
Puron-Sierra L, Luna M,
Villavicencio M and Gutierrez R (2021)
Lateral Hypothalamic GABAergic
Neurons Encode and Potentiate
Sucrose's Palatability.
Front. Neurosci. 14:608047.
doi: 10.3389/fnins.2020.608047

Sucrose is attractive to most species in the animal kingdom, not only because it induces a sweet taste sensation but also for its positive palatability (i.e., oromotor responses elicited by increasing sucrose concentrations). Although palatability is such an important sensory attribute, it is currently unknown which cell types encode and modulate sucrose's palatability. Studies in mice have shown that activation of GABAergic LHA^{Vgat+} neurons evokes voracious eating; however, it is not known whether these neurons would be driving consumption by increasing palatability. Using optrode recordings, we measured sucrose's palatability while VGAT-ChR2 transgenic mice performed a brief access sucrose test. We found that a subpopulation of LHA^{Vgat+} neurons encodes palatability by increasing (or decreasing) their activity as a function of the increment in licking responses evoked by sucrose concentrations. Optogenetic gain of function experiments, where mice were able to choose among available water, 3% and 18% sucrose solutions, uncovered that opto-stimulation of LHA^{Vgat+} neurons consistently promoted higher intake of the most palatable stimulus (18% sucrose). In contrast, if they self-stimulated near the less palatable stimulus, some VGAT-ChR2 mice preferred water over 18% sucrose. Unexpectedly, activation of LHA^{Vgat+} neurons increased quinine intake but only during water deprivation, since in sated animals, they failed to promote quinine intake or tolerate an aversive stimulus. Conversely, these neurons promoted overconsumption of sucrose when it was the nearest stimulus. Also, experiments with solid foods further confirmed that these neurons increased food interaction time with the most palatable food available. We conclude that LHA^{Vgat+} neurons increase the drive to consume, but it is potentiated by the palatability and proximity of the tastant.

Keywords: LHA GABA neurons, feeding circuit, palatability, sucrose, taste

INTRODUCTION

The lateral hypothalamic area (LHA) has been regarded as the “feeding center” since its lesion results in hypophagia and subsequent death (Anand and Brobeck, 1951; Teitelbaum and Epstein, 1962). It is part of a neural circuit related to feeding and reward (Delgado and Anand, 1953; Olds and Milner, 1954) as rats are willing to press a lever to deliver electrical intracranial self-stimulation (ICSSs), and if food is available, it also promotes feeding (Delgado and Anand, 1953; Mendelson, 1967; Mogenson and Stevenson, 1967; Coons and Cruce, 1968). Moreover, if a sweet tastant is

available, the rate of electrical ICSs is further increased, whereas bitter compounds decreased them (Phillips and Mogenson, 1968; Poschel, 1968), suggesting an interaction between ICSs and taste palatability. In this regard, and because of its connections with different cortical and subcortical gustatory regions (Simerly, 2004; Berthoud and Münzberg, 2011), the LHA is anatomically located to receive, process, and broadcast taste palatability information (Ferssiwi et al., 1987; Berridge and Valenstein, 1991). Pioneering electrophysiological studies have recorded gustatory-evoked responses in the LHA (Schwartzbaum, 1988; Yamamoto et al., 1989). One recent and elegant study uncovered two functional populations of LHA neurons: one activated by palatable tastants, e.g., sucrose, and another by aversive tastants, like quinine (Li et al., 2013). However, the genetic identity of the LHA cell type(s) involved in processing palatability-related information remains elusive, and to unveil their identity is the goal of this study.

The LHA is currently viewed as a hub of various cell types (Stuber and Wise, 2016), grossly divided into two larger populations related to feeding: the glutamatergic (LHA^{Vglut2+}) and GABAergic (LHA^{Vgat+}) neurons (Gutierrez et al., 2020). Activation of LHA^{Vglut2+} neurons leads to reduced food intake and is aversive (Jennings et al., 2013). In contrast, stimulation of LHA^{Vgat+} neurons is rewarding and produces voracious eating of both foods with nutritional value (Jennings et al., 2015; Navarro et al., 2016) and those without calories, even gnawing behavior toward the cork, an irrelevant biological stimulus (Navarro et al., 2016). Moreover, LHA^{Vgat+} neurons enhance the salience of the nearest stimulus and induce reward via stimulation of their projections to the ventral tegmental area (VTA) (Nieh et al., 2016). In addition, the evoked feeding is mediated by modulation of terminals reaching a region adjacent to the locus coeruleus (Marino et al., 2020). On the contrary, inhibition of GABAergic LHA^{Vgat+} cell somas is aversive and stops feeding (Jennings et al., 2015; Navarro et al., 2016). However, the role of LHA^{Vgat+} neurons in processing sucrose's palatability remains to be determined.

This study identified a new role of LHA^{Vgat+} neurons in encoding and enhancing sucrose's oromotor palatability responses. Sucrose's palatability was defined as the enhancement of hedonically positive oromotor responses triggered by increasing sucrose concentrations (Berridge and Grill, 1983; Spector et al., 1998; Villavicencio et al., 2018). Specifically, oromotor responses include an increase in lick rate and bout size. Thus, it should not be confused with a conscious hedonic feeling of pleasant taste that humans experience (Grill and Berridge, 1985; Sclafani, 1991; Berridge and Kringelbach, 2008). We found that opto-stimulation of LHA GABAergic neurons increases the consumption of the most palatable and proximal tastant. They accomplish this by potentiating the palatability of nearby gustatory stimuli. For aversive stimuli, the effect of these neurons is different. In a single bottle test, we found that water deprivation increased the tolerance for bitter compounds and gated a window of opportunity where the activation of GABAergic neurons is sufficient to temporarily reassign the negative hedonic value of quinine and promote its intake. Nevertheless, in a three-option preference test, mice failed to develop a quinine preference when

sucrose was available under these neurons' activation, thus, demonstrating that activation of GABAergic neurons does not merely trigger indiscriminate oromotor tongue movements; rather, the animals' evoked consummatory behavior largely depends on their internal state and on the palatability of the stimulus. Moreover, optogenetic activation of LHA^{Vgat+} neurons evoked many hallmark behaviors resembling those seen in LHA electrical stimulation. In this regard, and consistent with their positive role in palatability, our results could indirectly explain why electrical ICSs are further facilitated by the presence of sweet solutions (Phillips and Mogenson, 1968; Poschel, 1968). We also found that LHA^{Vgat+} neurons are the common neural substrate for both reward and feeding since after repeated self-stimulation, the more the VGAT-ChR2 mice opto-self-stimulated, the stronger the laser-induced licking they exhibited. We conclude that a subpopulation of GABAergic LHA^{Vgat+} neurons combines stimulus proximity and palatability-related information to enhance nearby energy-rich foods' palatability and further increase consummatory behaviors.

MATERIALS AND METHODS

Animal Subjects

We used 42 VGAT-ChR2-EYFP mice (number ID 014548; Jackson Laboratory, Sacramento, CA, USA) and 25 wild-type (WT) littermates, which served as controls. Mice were from both sexes between 8 and 16 weeks old, and they were individually housed in their home cages and maintained in a temperature-controlled ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) room with 12:12 h light–dark cycle. Unless otherwise mentioned, chow food (PicoLab Rodent Diet 20, MO, USA) and water were available *ad libitum*. For experiments with water restriction, after each behavioral session, mice were allowed to drink water for 1 h daily. All procedures were performed with the approval of the CINVESTAV Animal Care and Use Committee. One session per day was conducted between 11:00 a.m. and 2:00 p.m.

Surgical Procedures

All mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg, i.p.) and xylazine (8 mg/kg, i.p.), and then placed into a stereotaxic apparatus (Stoelting, IL, USA). Lidocaine (0.05 ml) was administered subcutaneously under the head's skin as a local analgesic, and ophthalmic ointment (hydrocortisone, neomycin, and polymyxin-B) was applied periodically to maintain eye lubrication. The antibiotic enrofloxacin (0.4 ml/kg) was injected for 3 days after surgery.

For experiments with opto-stimulation of LHA^{Vgat+} cell somas, a single multimode optical fiber with a 200- μm core diameter and with 0.39 NA (FT200UMT; Thorlabs, NJ, USA) was implanted unilaterally targeting the LHA using the following coordinates: AP: -1.25 mm, ML: ± 1 mm, DV: -4.9 mm, from bregma. For electrophysiology recordings, a custom-made optrode was unilaterally implanted counterbalanced across hemispheres (AP: -1.25 mm, ML: ± 1 mm, from bregma; DV: -5.2 mm ventral to dura). The optrode comprises an array of 16 tungsten wires formvar coated (35 μm diameter) surrounding and protruding 1 mm from the single multimode optical fiber

tip. No significant differences were found between hemispheres, so data were pooled together (data not shown). All experiments began 7 days after surgery to allow recovery.

Histology and Immunofluorescence

Mice were sacrificed by an overdose of pentobarbital (150 mg/kg) and perfused with PBS, followed by 4% paraformaldehyde. Brains were fixed overnight in 4% paraformaldehyde and gradually replaced in a gradient of concentrations of sucrose (until 30%). For histology, brain slides (40 μ m) were cut with a cryostat (Thermo Scientific HM525 NX), and images were taken with a Nikon Eclipse E200 microscope and a Progress Gryphax microscope camera, using a 10 \times objective. For immunofluorescence, free-floating brain slides (40 μ m) were blocked with 1% BSA and 0.2% Triton in PBS for 30 min. They were then washed with 0.2% Triton in PBS three times every 10 min, followed by incubation with the following primary antibodies: mouse anti-GAD 67 primary antibody (Millipore, Mab5406, 1:1,000 dilution), and rabbit anti-GFP primary antibody (Invitrogen, A11122, 1:1,000 dilution). Incubation took place overnight at 4°C. The next day, brain slides were washed with 0.2% Triton in PBS three times every 10 min, and then incubated with the secondary antibodies Alexa 647 goat anti-mouse (Invitrogen, A21235, 1:500 dilution), and Alexa 488 donkey anti-rabbit (Invitrogen, A21206, 1:500 dilution) during 90 min at room temperature. Afterward, we applied DAPI to stain the nuclei. Brain slides were put on slides with a mounting medium for fluorescence (Vectashield), and images were taken with a Leica confocal microscope using a 63 \times objective.

Gustatory Stimuli

Sucrose of reagent-grade chemical quality (Sigma-Aldrich, Mexico City, Mexico) was used in the following concentrations: 0 (water only), 3, 10, and 18 wt%. Reagent-grade quinine hydrochloride dihydrate (QHCl) was also used at 0.04 wt% (Sigma-Aldrich, Mexico City, Mexico). Artificial saliva contained the following (in mM): 4 NaCl, 10 KCl, 6 NaHCO₃, 6 KHCO₃, 0.5 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 0.24 K₂HPO₄, and 0.24 KH₂PO₄ (Zocchi et al., 2017). We added 0.05 mM HCl to adjust pH to 7. The solutions were dissolved in distilled water, maintained under refrigeration, and used at room temperature. We also used 20 mg chocolate pellets (Bio-Serv, NJ, USA), chow food (PicoLab Rodent Diet 20, MO, USA), a high-fat diet with 45% kcal% fat (Research Diets, NJ, USA), granulated sugar cube, and cork.

Electrophysiology

Neural activity was recorded using a Multichannel Acquisition Processor System (Plexon, Dallas TX, USA) interfaced with Med Associates to simultaneously record behavioral events (Gutierrez et al., 2010). Extracellular voltage signals were first amplified by an analog head-stage (Plexon, HST/16o25-GEN2-18P-2GP-G1), then amplified and sampled at 40 kHz. Raw signals were band-pass filtered from 154 Hz to 8.8 kHz and digitalized at 12 bits resolution. Only single neurons with action potentials with a signal to noise ratio of 3:1 were analyzed (Gutierrez et al., 2010). Action potentials were isolated online using a voltage-time threshold window, and three principal components contour

templates algorithm. Furthermore, off-line spike sorting was performed (Plexon Offline Sorter), and only single units with stable waveforms across the session were included in the analyses (Gutierrez et al., 2010) (see **Supplementary Figure 1**). Also, to verify waveform stability, we correlated the waveform's shapes recorded in the brief access test and the optotagging session.

Optogenetic Stimulation

A 473-nm laser intensity was modulated by a DPSS system (OEM laser, UT, USA). Laser pulses were synchronized with behavioral events with Med Associates Inc. software and TTL signal generator (Med Associates Inc., VT, USA). The patch cord's optical power was at 15 mW, and it was measured with an optical power meter (PM20A, Thorlabs, NJ, USA). However, we delivered between 10 and 12.6 mW at the fiber optic tip, depending on each fiber's efficiency. Unless otherwise mentioned, the laser was turned on by 2 s (at 50 Hz) and 4 s off, with 10 ms pulse width and a duty cycle of 50%.

Parameters of Stimulation for LHA GABAergic Neurons

To explore the best stimulation parameters for LHA GABAergic neurons, mice were implanted with an optrode in LHA and placed in a custom-made box with dimensions of 18 \times 13 \times 7.5 cm. With no food available, the laser was turned on at different frequencies—0, 2.5, 5, 10, 20, and 50 Hz semirandomly, while the animals' neural activity was recorded for 20 min. We used a Kruskal–Wallis test to compare firing rates during the baseline (from -1 to -0.04 s) against the activity during laser presentation (from 0 to 2 s) aligned (time = 0 s) to laser onset for all frequencies tested. Neurons that significantly increased their firing rate during the laser stimulation were named “activated,” and neurons that decreased their activity were named “inhibited.”

Neural Activity Recording During a Brief Access Test and Palatability-Related Responses

We used a brief access test in water-deprived mice while the LHA activity was recorded for 30 min. We employed a licking spout consisting of independent stainless-steel needles (20-gauge) cemented together with dental acrylic at the sipper tube's tip (Villavicencio et al., 2018). Each needle was connected to a solenoid valve (Parker, Ohio, USA) by a silicon tube. The drop (~ 2 μ l) was calibrated before starting the session, using a pressurized control system. The trial structure was as follows: At the beginning of the task, the sipper was extended in lick position. To start a new trial, each mouse was required to introduce its head into the central port and then elicited a dry lick to start the reward epoch (7 s). During this period, a tastant's drop was delivered every lick. The sipper was retracted for 3 s as intertrial interval (ITI), and then re-extended in a lick position into the central port. Tastant solutions (artificial saliva, water, sucrose 3%, and sucrose 18%) were delivered in a semirandom order.

To identify neurons whose firing rate correlated with palatability-induced oromotor responses, we used a best-window analysis based on a previous study (Villavicencio et al., 2018).

This method has been used to detect palatability-related activity in a brief access test. Briefly, during each recording session, a palatability index (PI) was calculated. The PI reflects the overall appetitive oromotor responses elicited by each tastant delivered in the session. It was computed by averaging the lick rate during the entire reward epoch, including all the trials per session. In mice, the PI takes values between 0 and 8 Hz for sucrose stimuli (Glendinning et al., 2005): 0 Hz means animals ultimately rejected a solution in all trials, whereas 8 Hz indicates they licked continuously during the entire reward epoch, thus reflecting a greater palatability response elicited by the tastant. Then, the firing rate was calculated for a variety of time centers (from 0.25 to 6.75 s with 0.5 s steps) and multiple window sizes (from 0.5 to 7 s, 0.5 s steps), such that each window was estimated as the center \pm (window size/2). We identified the windows where the mean firing rate was significantly different for at least one tastant delivered (i.e., tastants, using a Kruskal–Wallis test at an alpha of 0.05). Next, we computed Pearson's correlation coefficient (r ; the alpha level at 0.05) between both the PI and the firing rate on a trial-by-trial basis. The window with the largest absolute Pearson's correlation coefficient was selected as the “best window.” Thus, for the “best window” and each statistical test (i.e., Kruskal–Wallis test and Pearson's correlation coefficient), a permutation assay was used for multiple-testing correction. This analysis was accomplished by shuffling the different tastants delivered 20,000 times (using the Matlab function “shuffle”). A corrected p -value was obtained using the following formula $p = (k + 1)/(n + 1)$, where k is when a permuted distribution leads to a p -value smaller than the original p -value and n is the number of repetitions. Only time windows with $p < 0.05$ in both tests (Kruskal–Wallis and Pearson correlation) were considered statistically significant. Thus, the “best window” is where the firing rate maximally correlated with the oromotor responses (the lick rate) elicited by sucrose's palatability on a trial-by-trial basis. Importantly, results were qualitatively similar if we used the lick bout size rather than the lick rate to compute the PI. A lick bout was defined as the collection of at least two rhythmic licks separated by a pause ≥ 500 ms during the reward epoch. The bout size was the time difference (in seconds) between the last and first lick in the bout (Gutierrez et al., 2006).

To evaluate whether palatability-related neurons dynamically track the changes in lick rate across the session, we computed the lick rate in the reward epoch as a function of trial types [artificial saliva (AS), water, sucrose 3%, and sucrose 18%], divided into blocks of 10th percentile of trials each. We verified that every block across the session has the same number of trials.

Optotagging Task

Once the brief access test was finished, each mouse was tested in the optotagging task. For this task, we removed the licking spout from the behavioral box. Over the session (15 min), the laser was turned on (at 50 Hz) during 2 or 7 s, followed by 10 s off.

Laser-activated neurons (pLHA^{Vgat}) were detected by using two methods: 1) a Kruskal–Wallis to compare firing rates during a baseline (from -1 to -0.04 s) against the activity during the presentation of laser (from 0 to 2 s, aligned to laser onset) and

2) CUMSUM statistic (Gutierrez et al., 2006) to obtain the first bin (1 ms resolution) after the first laser pulse that significantly increased the firing rate above baseline (from -20 to 0 ms). Only neurons showing a significant value in both tests were considered laser-activated pLHA^{Vgat}. From the population of pLHA^{Vgat} neurons, we identified two types of populations: (1) ChR2-expressing cells LHA^{Vgat+} or early neurons: these neurons were those with an action potential evoked within ≤ 15 ms latency (Buonomano, 2003), measured by a CUMSUM statistic; and (2) laser-activated late neurons: these were those with an action potential occurring after > 15 ms latency. Also, to classify non-LHA^{Vgat} neurons, we used the Kruskal–Wallis test as described above. Neurons with no significant modulation were classified as “unmodulated.”

Open Loop Stimulation With One Option

The front panel of an operant conditioning chamber (Med Associates Inc., VT, USA) was equipped with a central port and a sipper, where individual licks were registered by a contact lickometer (Med Associates Inc., VT, USA). To determine the best stimulation parameters to induce feeding behavior, a group of naive mice had free access to sucrose 10% solution. For open loop stimulation, mice were opto-stimulated by alternating blocks of 5 min “off” and 5 min “on” across a 40-min session (Nieh et al., 2016). During opto-stimulated blocks, the laser was turned “on” regardless of the mice's behavior and spatial position in the chamber. A different opto-stimulation frequency (0, 2.5, 5, 10, 20, and 50 Hz) was delivered daily. The laser-bound feeding index was measured as the number of licks in a 2.5-s window from laser onset divided by the total licks in the session, hereafter named laser-bound feeding, and it was plotted as a function of laser frequency.

Prestimulation Task

A group of naive mice was placed in an operant conditioning chamber with a central port. A door blocked the access to the sipper during the first 15 min (prestimulation period). Each mouse was opto-stimulated with all prestimulation protocols (0, 5, 10, and 15 min) following a Latin square design. Then, the door was opened, and a 10% sucrose solution was available during the next 15 min. During the prestimulation period, the laser was turned on for 2 s and off for 4 s.

Open Loop Stimulation With Three Options

To determine whether opto-stimulation of LHA GABAergic neurons drives the intake with a bias toward the most palatable stimulus available, a new group of naive mice was tested in an open loop stimulation task (alternating 5 min no-laser and 5 min “on” (2 s on, 4 s off) blocks across a 40-min session). The operant chamber was equipped with three ports, where mice had free access to water (central sipper), a 3% sucrose solution (left sipper), and an 18% sucrose solution (right sipper). Lateral sippers were counterbalanced across animals. This task comprises four baseline sessions (with no photostimulation, data not shown), and 11 test sessions were pooled together. The number of licks given to the sipper filled with sucrose 18%, across the 11 sessions, was also plotted.

For this experiment, we video tracked the mouse's distance and head angle relative to each of the three sippers. The sippers' position and the animal's three anatomical points, the nose, the neck, and the tail's base, were extracted using the DeepLabCut Python package (Mathis et al., 2018; Nath et al., 2019). We define the mouse position as the coordinates (x and y) for the nose, whereas the head direction was a two-dimensional vector going from the neck to the nose. For each video frame, the distance to each sipper was calculated (in pixels), as well as the angle between the head direction and position of each sipper (in degrees). An angle of 0° means the mouse is looking at the sipper, and 180° means the mouse is facing the opposite direction. For distance measuring, 100 pixels correspond to ~ 6 cm. The mouse position and direction were extracted from the train of the stimulation's first laser pulse, and the following 6-s window was analyzed to find out if the mice initiated a licking behavior at any of the three sippers. Then, we built a two-dimensional array containing the probability of licking any sipper given the mouse's distance and angle during the first laser of each opto-stimulation train.

Open Loop Stimulation in an Open Field With Chow, High-Fat Diet, or Granulated Sugar Cube

A new group of animals was placed in the circular arena's center (50 cm in diameter). Three or two food plates were equidistant to each other, and each contained either chow, high-fat diet, or granulated sugar cube. Mice were opto-stimulated by alternating 5 min block with no-laser and 5 min laser block across the session (20 min). In open loop, the laser was turned "on" regardless of the mice's behavior and spatial position in the arena. All sessions were recorded and analyzed with Bonsai software (<https://open-ephys.org/bonsai>). We calculated the mouse's centroid at each frame and used that information to create a heatmap of its position. The distance of the mouse's centroid from each stimulus was computed. A food interaction occurred when the distance was below 60 mm, and the animal stayed there for at least 1 s. Food plates were weighed at the beginning and end of each session.

Closed-Loop Stimulation With Three Options

To evaluate whether activation of LHA^{Vgat+} neurons induces preference for the most proximal stimulus, we used a closed-loop stimulation protocol (in the same mice from Open loop stimulation with three options), over 11 additional sessions (40 min each). As noted above, mice were placed in an operant conditioning chamber with three ports (water, central sipper; 3% sucrose solution, left sipper; 18% sucrose solution, right sipper). Photostimulation was delivered when the subject made a head entry in the central port (containing a sipper filled with water), laser was turned on by 2 s followed by a time out of 4 s (where the laser could not be reactivated), and after this, a new laser onset (2 s "on") occurred when mice performed a new head entry. Thus, in this experiment, the less palatable stimuli (water) was the nearest to opto-self-stimulation. During photostimulation, sucrose preference index was measured as the number of licks

TABLE 1 | Protocol used for closed-loop stimulation with the central port stimulus replaced.

Stimuli in the central port	Sessions tested
Water	Last 5 sessions of the closed loop (Figure 7)
Extinction (no opto-stimulation)	4
Water	3
Empty sipper	3
Water	3
0.04% Quinine	4
Airpuff	4
Unavoidable airpuff	3
Sucrose 18% (water was placed in the sucrose 18% port)	4

of 18% sucrose divided by the total licks for sucrose 18% + water. Values higher than 0.5 indicate sucrose preference.

To evaluate the laser-bound feeding development across the sessions, we correlated laser-bound feeding during open loop stimulation sessions vs. closed-loop stimulation for the first three and the last five sessions.

Closed Loop in an Open Field

In a circular arena, four stimuli were located equidistant to each other: wood cork, chow, chocolate pellets, or a sipper filled with a 10% sucrose solution. During the session, a homemade computer vision program tracked in real-time the position of the subject. Each mouse needs to enter the designated area to receive opto-self-stimulation (2 s laser on and 4 s off). Mice need to leave and re-enter the designated area to begin a new trial. Only one designated area was used per session, and it remained in the same position for up to three or four consecutive sessions. Each session's duration was 40 min (mice were the same as those used in previous task).

Closed-Loop Stimulation With Different Options in the Central Port

For the same group of mice used in Closed-loop with three options, on subsequent days, the central port's stimulus was replaced across 28 sessions, following the protocols described in **Table 1**.

Closed-Loop Stimulation Task With One Option

Mice were put in a smaller and custom-made box with $18 \times 13 \times 7.5$ cm internal dimensions. The front wall was equipped with one single sipper and a contact lickometer with a V shape to register individual licks. First, mice were tested, for 3 days, with a 0.04% quinine solution under sated state (fed mice) and then for three more days under a 23-h water-deprived condition, each session lasting 20 min. Then, mice were tested for 2 days with a sipper filled with 18% sucrose, in a sated state, and then two more days in a water-deprived condition. Opto-self-stimulation (2 s on with a time out of 4 s, where the laser could not be activated)

TABLE 2 | Protocol for opto-self-stimulation in a brief access test.

Laser on	Time on (2) (s)	No. of sessions (30 min each)
All trials	2	6
Water trials	2	3
Sucrose 3% trials	2	3
Sucrose 18% trials	2	3
All trials	7	4
Water trials	7	3
Sucrose 3% trials	7	3
Sucrose 18% trials	7	3
Mock laser (sucrose 3% trials)*	7	3

*For mock laser sessions, mice were connected to a false fiber optic, whereas the real laser was glued outside the skull to emit blue light.

was delivered when mice made a head entry in the central port. Water-deprived mice had access to *ad libitum* water for 1 h after the session ended.

Opto-Self-Stimulation During a Brief Access Test

To evaluate whether activation of GABAergic neurons enhances oromotor palatability responses, we performed a brief access test with a new group of mice over 31 sessions. The behavioral setup conditions were the same as described above, and as tastant solutions, we used water, sucrose 3%, and sucrose 18% (delivered in a semirandom order). The trial structure was similar, but this time to start a new trial, each mouse was required to introduce its head into the central port to turn “on” the laser. Then, a dry lick was elicited to start the reward epoch (7 s). Each head entry triggers the laser onset for 2 s “on” (or in different sessions for 7 s “on”; see **Table 2**). At the end of the session, mice had access to *ad libitum* water for 1 h. Protocols are described in **Table 2**.

In addition, to verify that LHA GABAergic neurons were capable of sustained activation over 7 s of opto-stimulation, we plotted the peristimulus time histograms (PSTH) of pLHA^{Vgat}, non-LHA^{Vgat}, and unmodulated neurons using the same method previously described.

Data Analysis

All data analysis was performed using MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA) and GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA). We used the mean \pm SEM and the α level at 0.05.

RESULTS

Initially, we determined the optimal stimulation parameters to activate LHA GABAergic neurons. This was accomplished by implanting an optrode in naive mice that constitutively expressed ChR2, fused with an enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) in GABAergic neurons expressing the gene for the vesicular γ -aminobutyric acid transporter (hereafter referred to as VGAT-ChR2 mice) (Zhao et al., 2011; **Figures 1A,B**). We found that

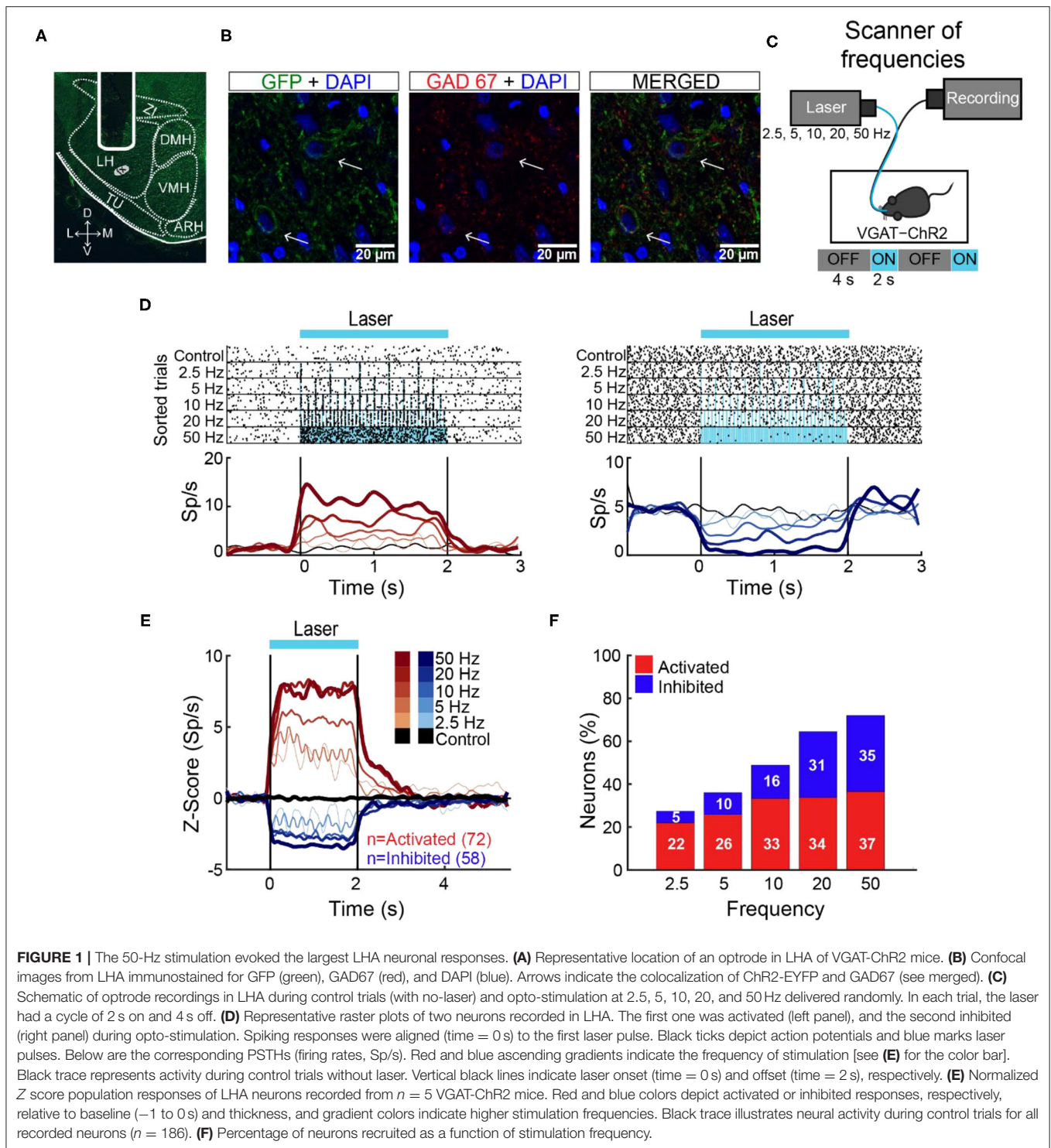
a laser stimulation of 50 Hz (10 ms width) evoked the strongest LHA neuronal responses (**Figures 1C–F**; Gigante et al., 2016). Unless otherwise mentioned, this frequency was used for all subsequent experiments.

LHA Neurons Encode Sucrose’s Oromotor Palatability Responses

In rats, previous electrophysiological studies suggest that ensembles of LHA neurons process palatability-related information (Norgren, 1970; Schwartzbaum, 1988; Yamamoto et al., 1989; Li et al., 2013). Based on these results, we then asked whether LHA neurons could provide information about sucrose’s palatability using a behavioral task with only palatable stimuli (i.e., AS, water, sucrose 3 wt%, and sucrose 18 wt%). To this end, taste responses were recorded from a total of 284 LHA neurons, while VGAT-ChR2 mice performed a brief access test (**Figure 2A**). To uncover palatability-responsive neurons, we analyzed neuronal activity using a previously described “best-window analysis” (Villavicencio et al., 2018) (see section Materials and Methods). This strategy detects the optimal interval, where the firing rate best correlates with the sucrose’s PI computed as the average lick rate (or bout size), on a session-by-session basis, evoked by each gustatory stimulus in the reward epoch (**Figure 2B**; one-way ANOVA, $F_{(3,108)} = 10.35$, $p < 0.0001$; **Supplementary Figure 2A**; one-way ANOVA, $F_{(3,108)} = 2.926$, $p < 0.05$). **Figure 2C** depicts the responses of two representative LHA neurons: As expected, we found one whose activity increased as the sucrose concentration increased (positive Pearson’s correlation, $r = 0.87$; **Figure 2C, left**), and the other was negatively associated with palatability oromotor responses evoked by sucrose ($r = -0.64$; **Figure 2C, right**). **Figure 2D** shows the normalized activity exhibiting either positive (59/284 neurons, 21%) or negative correlations (76/284, 27%) with the PI. Also, qualitatively similar results were found using the bout size to compute the PI (**Supplementary Figure 2B**). Thus, these data confirmed that the LHA mice’s neurons exhibit palatability-related responses, and this activity can be either correlated or anticorrelated with the sucrose solution’s PI.

Dynamic Tracking of Palatability Over the Entire Course of a Behavioral Session

Having demonstrated that LHA neurons encode sucrose’s palatability-induced oromotor responses, we then explored whether LHA palatability-related neurons can dynamically adjust their responses to track the changes in sucrose’s palatability across the session when the animals would approach satiation. We found that the lick rate declined across the session as a function of sucrose’s palatability (**Figure 2E**; RM ANOVA, main effect of stimuli, $F_{(3,402)} = 163.7$, $p < 0.0001$; effect of time, $F_{(9,1206)} = 100.4$, $p < 0.0001$; and stimuli by time interaction, $F_{(27,3,618)} = 16.54$, $p < 0.0001$). Briefly, early in the session, animals licked more for all stimuli, but as the session progressed, the lick rate declined, especially for AS and water but not for sucrose (3 and 18%), indicating that they tracked palatability responses rather than satiety (**Figure 2E**). Similar to what we have shown in the nucleus accumbens shell (NAcSh) (Villavicencio



et al., 2018), a brain region that sends outputs to LHA and is involved in feeding and also contains palatability-related neurons (O'Connor et al., 2015; Villavicencio et al., 2018), we also found that the LHA neuron's firing rate (either increasing or decreasing neurons) adjusts across the session to reflect sucrose's palatability (**Figure 2F**). These data indicate that within

the session, as the animals approach satiety, the responses of the palatability-related neurons tracked the rapid decline in the lick rate mainly for the two less palatable stimuli (i.e., AS and water) but not for the higher sucrose concentration (sucrose 3 and 18%), suggesting these neurons are tracking palatability and no satiety.

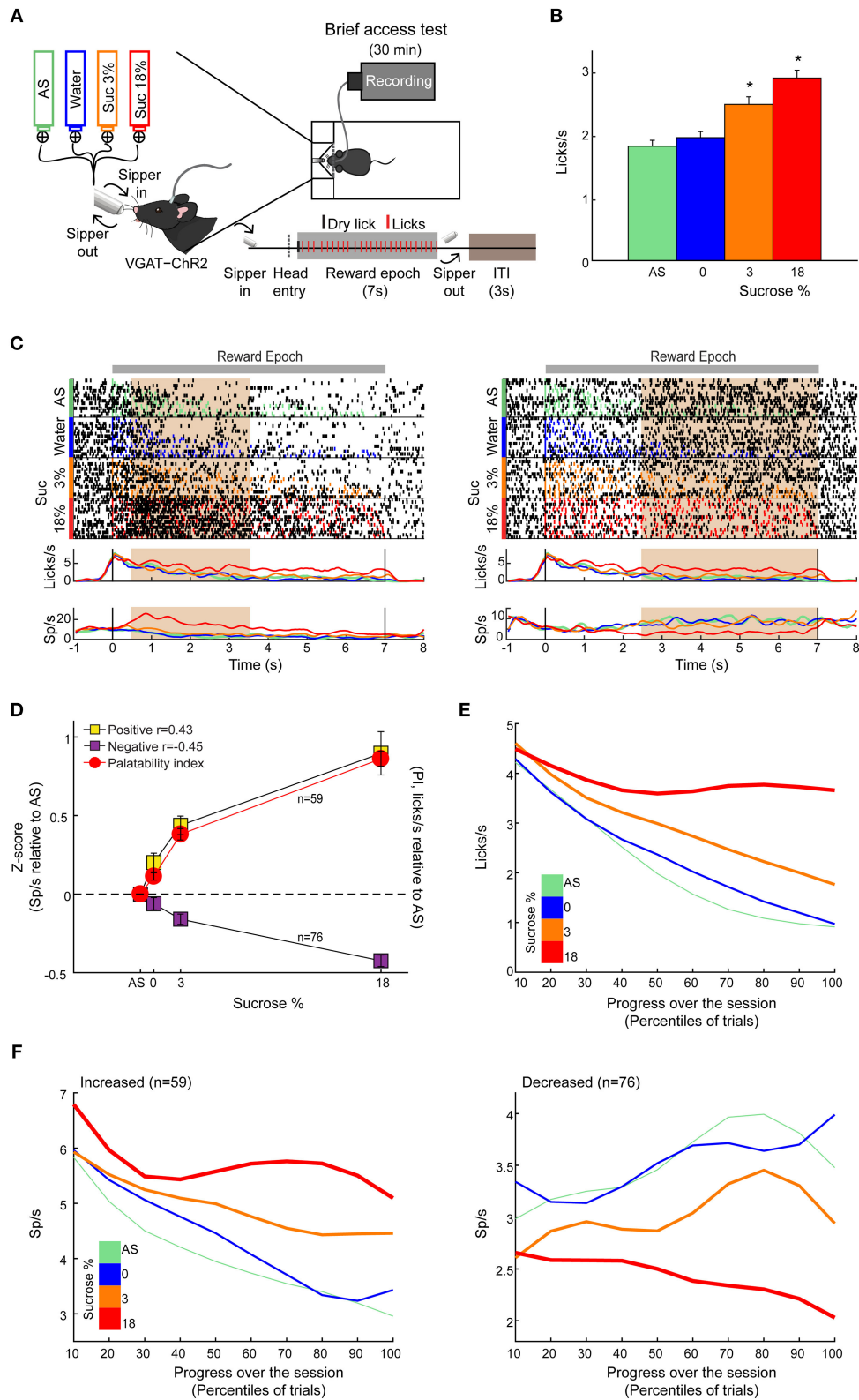


FIGURE 2 | LHA neurons process palatability-related information. **(A)** Brief access taste setup depicting a behavioral box equipped with a computer-controlled retractile sipper that for each lick independently delivers a drop of artificial saliva (AS), water, sucrose 3%, or 18% concentrations. After a head entry (dashed line), the first dry lick (black line) enables the 7-s reward epoch. During this period, in each lick (red), a drop of the four tastants was randomly delivered. After the reward epoch, (Continued)

FIGURE 2 | the sipper was retracted for an intertrial interval (ITI) of 3 s and then re-extended to start a new trial. **(B)** Average lick rate during the entire reward epoch, reflecting greater palatability as a function of sucrose concentration. * Indicates significant difference ($p < 0.05$) among the stimuli. Using one-way ANOVA followed by the Holm–Sidak test. **(C)** Representative raster plot of two LHA neurons recorded while mice performed a brief access test. Spikes are plotted as black ticks, whereas licks for each tastant are color-coded (green, AS; blue, water; orange, sucrose 3%; red, sucrose 18%). Below are the corresponding peristimulus time histograms (PSTHs) of lick rate (licks/s) and firing rate (spikes/s; Sp/s) as a function of trial type. Neuronal responses were aligned (time = 0 s) to the first rewarded lick. The brown rectangles depict the “best” window with the maximum Pearson correlation coefficient between firing rates and sucrose’s palatability index (PI). The left and right raster plots displayed two neurons with a positive and negative correlation, respectively. **(D)** Z score normalized activity (relative to AS trials) for LHA neurons with either positive or negative correlation against PI (red circles). **(E)** Population PSTHs of the lick rates given in the reward epoch as a function of trial type, divided into blocks of 10th percentiles of trials each. **(F)** Population PSTHs of the firing rate during the reward epoch of the palatability-related neurons across the session for each trial type. The *left panel* depicts neurons that fired more to higher sucrose concentrations [positive sucrose’s palatability correlation; **(D)** yellow], whereas the *right panel* illustrates neurons with decreasing firing rates as the sucrose concentration increased [i.e., negative correlation with sucrose’s palatability; **(D)** purple].

A Subpopulation of Opto-Identified LHA^{Vgat+} Neurons Encodes Sucrose’s Palatability

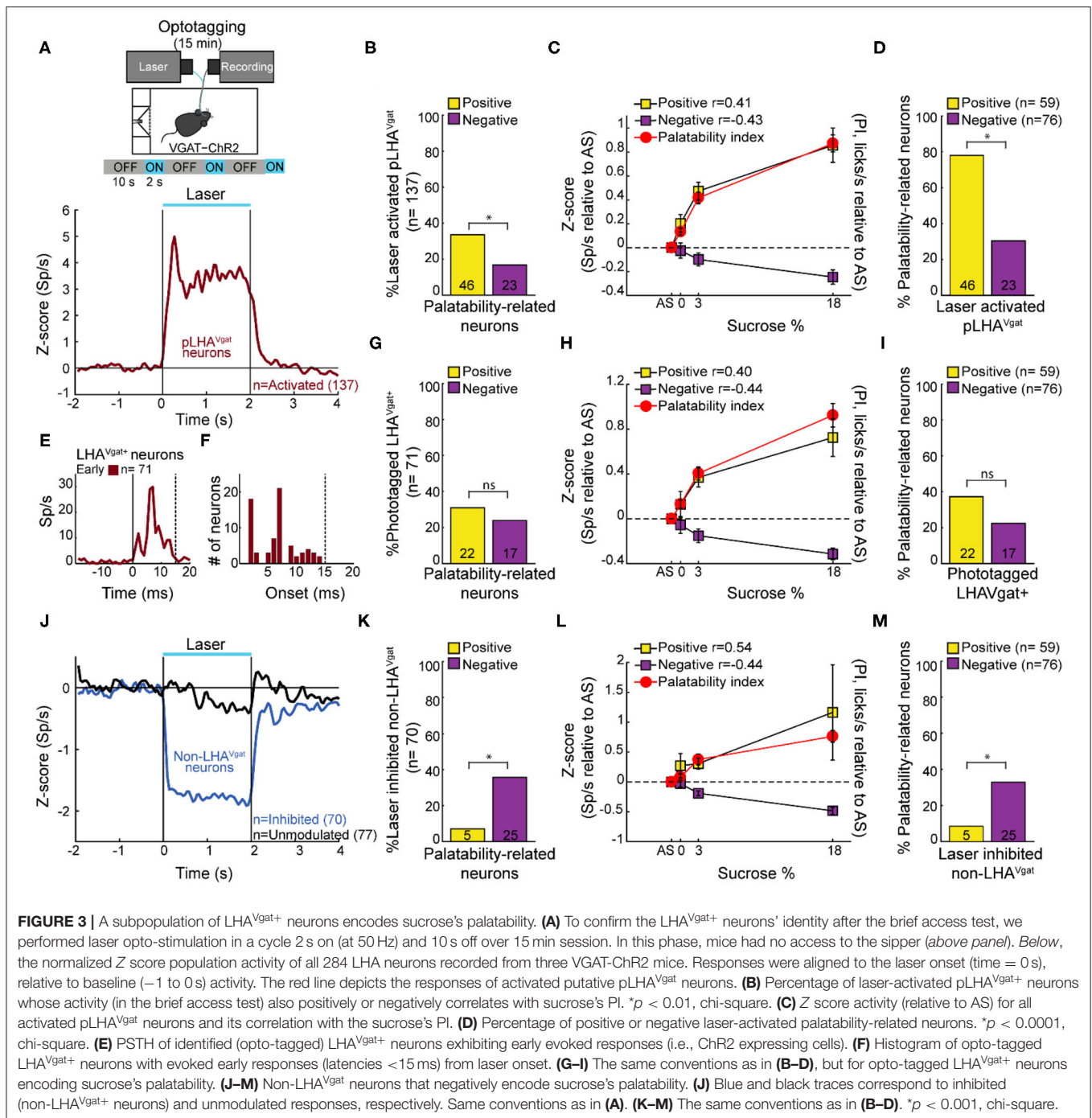
To identify LHA^{Vgat+} neurons from our recordings, we opto-stimulated the same mice recorded in the brief access test seen in **Figure 2**. We verified the stability of the waveforms between tasks (i.e., brief access test and optotagging), and we only included single units with stable waveforms in the analysis (see section Materials and Methods; **Supplementary Figure 1**). **Figure 3A** displays the setup and the normalized (Z score) activity of laser-activated neurons (48%; 137/284) (for details, see section Materials and Methods). Since these neurons may include ChR2-expressing cells and other LHA neurons modulated by indirect polysynaptic feedback of afferent fibers from other areas in the brain (Nieh et al., 2015), we decided to name them putative LHA^{Vgat} (pLHA^{Vgat}) neurons. Note that pLHA^{Vgat} neurons comprise the ensemble recruited by the optogenetic stimulation of LHA GABAergic neurons, suggesting they convey similar information. Therefore, we next evaluated whether pLHA^{Vgat} neurons were correlated with sucrose’s palatability. In total, 50% (69/137) of laser-activated neurons exhibited responses that were significantly palatability related; specifically, 34% showed a positive correlation (46 out of 137), whereas 17% (23 out of 137) had a negative correlation with sucrose’s palatability (**Figure 3B**; positive vs. negative chi-square test_(1,274) = 10.25, $p < 0.01$). **Figure 3C** shows the population activity of pLHA^{Vgat} neurons with either a positive (yellow) or negative (purple) Pearson’s correlation coefficients with the PI (red). Furthermore, from all recorded LHA neurons that encode sucrose-induced oromotor palatability responses with a positive correlation ($n = 59$, see **Figure 2D**), we found that more than 78% (46/59) belonged to the pLHA^{Vgat} (**Figure 3D**). In contrast, only 30% (23/76) of pLHA^{Vgat} neurons were negative palatability related (**Figure 3D**; positive vs. negative chi-square test_(1,135) = 30.25, $p < 0.0001$). Similar results were found when we analyzed the laser-activated late neurons (hereafter named late neurons) from the pLHA^{Vgat} population. These neurons exhibited a delayed laser-evoked action potential with a slow latency (>15 ms), $n = 66$ (see **Supplementary Figure 3A**). We compared the proportion of late neurons against all palatability-responsive neurons recorded in the LHA and found that 41% (24/59) belonged to the positive palatability-related population, and only 8% (6/76) were negative palatability-related neurons (**Supplementary Figures 3B,C**; chi-square test_(1,135) = 20.65,

$p < 0.0001$). Thus, pLHA^{Vgat} encode sucrose’s palatability with a biased toward positive correlations.

To confirm the identity of LHA^{Vgat+} neurons, we searched for neurons in which a brief pulse of light evoked an action potential with an early latency (≤ 15 ms) that would reflect the expression of ChR2 in their somas (Buonomano, 2003). In total, from the pLHA^{Vgat} population, 52% (71/137) neurons exhibited an early response to blue light (**Figures 3E,F**), suggesting that these pLHA^{Vgat} neurons were LHA^{Vgat+} neurons. We found that over half of the identified LHA^{Vgat+} neurons, 55% (39/71), were involved in encoding sucrose’s oromotor palatability, and the remaining (45%) were unmodulated by sucrose. From the LHA neurons related to sucrose’s oromotor palatability, 31% of LHA^{Vgat+} neurons positively correlated with sucrose’s palatability (22/71), and 24% were anticorrelated (17/71) (**Figure 3G**; positive vs. negative chi-square test_(1,142) = 0.88, $p = 0.34$). The LHA^{Vgat+} neuronal responses with positive and negative Pearson’s correlation coefficients with lick-related palatability responses are seen in **Figure 3H**. Once again, we compared the proportion of opto-identified LHA^{Vgat+} neurons against all palatability-responsive neurons recorded in the LHA. We found a trend to encode sucrose’s palatability in a positive rather than negative manner. That is, 37% (22/59) of LHA^{Vgat+} neurons belonged to the positive palatability-related population, whereas only 22% (17/76) were negative palatability-related neurons (**Figure 3I**; positive vs. negative chi-square test_(1,135) = 3.59, $p = 0.057$). Altogether, these data suggest that LHA^{Vgat+} neurons tend to encode sucrose’s palatability in a positive rather than in a negative manner. More importantly, our data agree with the idea that the LHA^{Vgat+} neurons comprised heterogeneous subpopulations with different functional responses (Jennings et al., 2015).

Non-LHA^{Vgat} Neurons Negatively Encode Sucrose’s Palatability

In contrast, we found that 25% of the LHA neurons exhibited a laser-induced inhibition (70/284, non-LHA^{Vgat} neurons, **Figure 3J**, blue trace), and the remaining 27% (77/284) were unmodulated during blue light stimulation (**Figure 3J**, black trace). Unlike pLHA^{Vgat} neurons, only 7% (5 out of 70) of the non-LHA^{Vgat} neurons showed a positive correlation, whereas the vast majority, 36% (25 out of 70), had a negative correlation with sucrose’s palatability (**Figures 3K,L**; positive vs. negative chi-square test_(1,140) = 16.97, $p < 0.0001$). These results

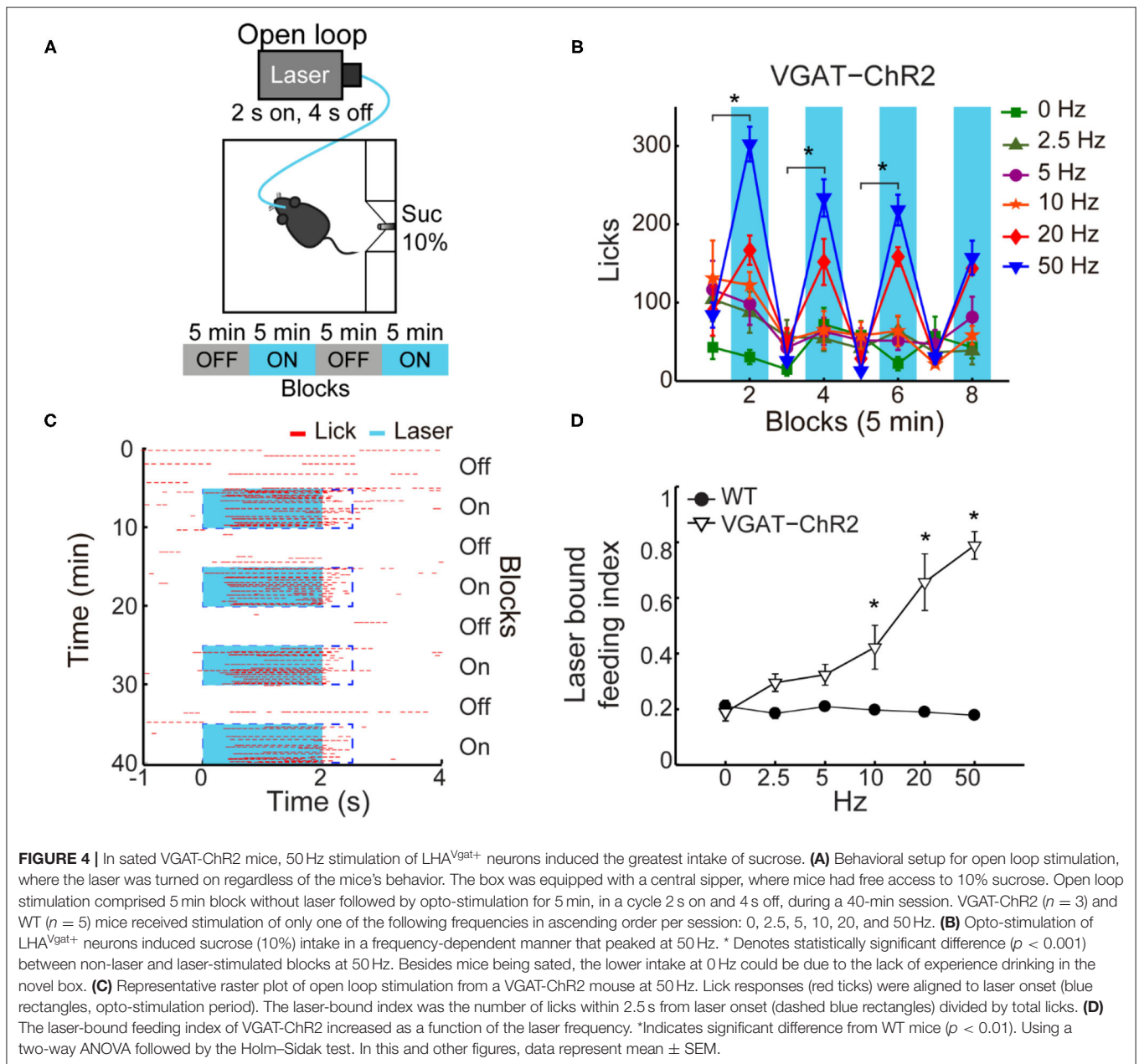


suggest that non-LHA^{Vgat} neurons (perhaps glutamatergic Vglut2 neurons) preferentially encode sucrose's palatability with negative correlations (**Figure 3M**; positive vs. negative chi-square test_(1,135) = 11.46, *p* < 0.001).

Activation of LHA^{Vgat+} Neurons Drives Sucrose Intake

If a subpopulation of LHA GABAergic neurons preferentially encodes sucrose's palatability by increasing firing rates, its

optogenetic stimulation should promote increased sucrose intake. To characterize its impact on sucrose intake, we used an open loop optogenetic stimulation involving 5-min blocks with laser and no-laser stimulation, while naive VGAT-ChR2 mice had *ad lib* access to a sipper filled with sucrose 10% (**Figure 4A**). We analyzed the intake as a function of laser frequency (**Figure 4B**; two-way ANOVA, frequency by blocks interaction, $F_{(35,96)} = 2.268$, *p* < 0.01); a *post hoc* test uncovered that in the first three blocks with laser, 50 Hz stimulation induced a significant increase



in sucrose intake (**Figure 4B**; blocks 2, 4, and 6) compared with the previous blocks of no-laser (**Figure 4B**; $p < 0.001$; blocks 1, 3, and 5). **Figure 4C** shows a raster plot for licking responses of a representative open loop session. At 50 Hz, we found that feeding (licking) was elicited within a 0.72 ± 0.03 -s latency from laser onset, and it abruptly stopped (0.27 ± 0.1 s) after laser offset (see blue dash rectangles). VGAT-ChR2 mice exhibited an increase in the laser-bound feeding as the laser frequency increased (**Figure 4D**; two-way ANOVA, group by frequency interaction, $F_{(5,36)} = 12.86$, $p < 0.0001$). Thus, to induce sucrose intake, LHA^{Vgat+} neurons require continued activation. Our data then confirmed that 50 Hz is the best stimulation frequency to drive neuronal responses and sucrose intake.

LHA^{Vgat+} Neurons Do Not Induce a Persistent Hunger State

A previous study showed that brief optogenetic stimulation of “hunger-inducing” AgRP neurons in the arcuate nucleus before food availability promotes consummatory behavior that persists for several minutes in the absence of continued AgRP neuron activation (Burnett et al., 2016; Chen et al., 2016). Based on this study, we tested whether the prestimulation of LHA^{Vgat+} neurons could evoke a similar hunger state. Unlike AgRP neurons (Burnett et al., 2016; Chen et al., 2016), prestimulation of LHA^{Vgat+} neurons failed to evoke and sustain subsequent sucrose intake (see **Supplementary Figure 4**; two-way ANOVA, group by prestimulation protocol, $F_{(3,56)} = 0.50$, $p = 0.68$). Our

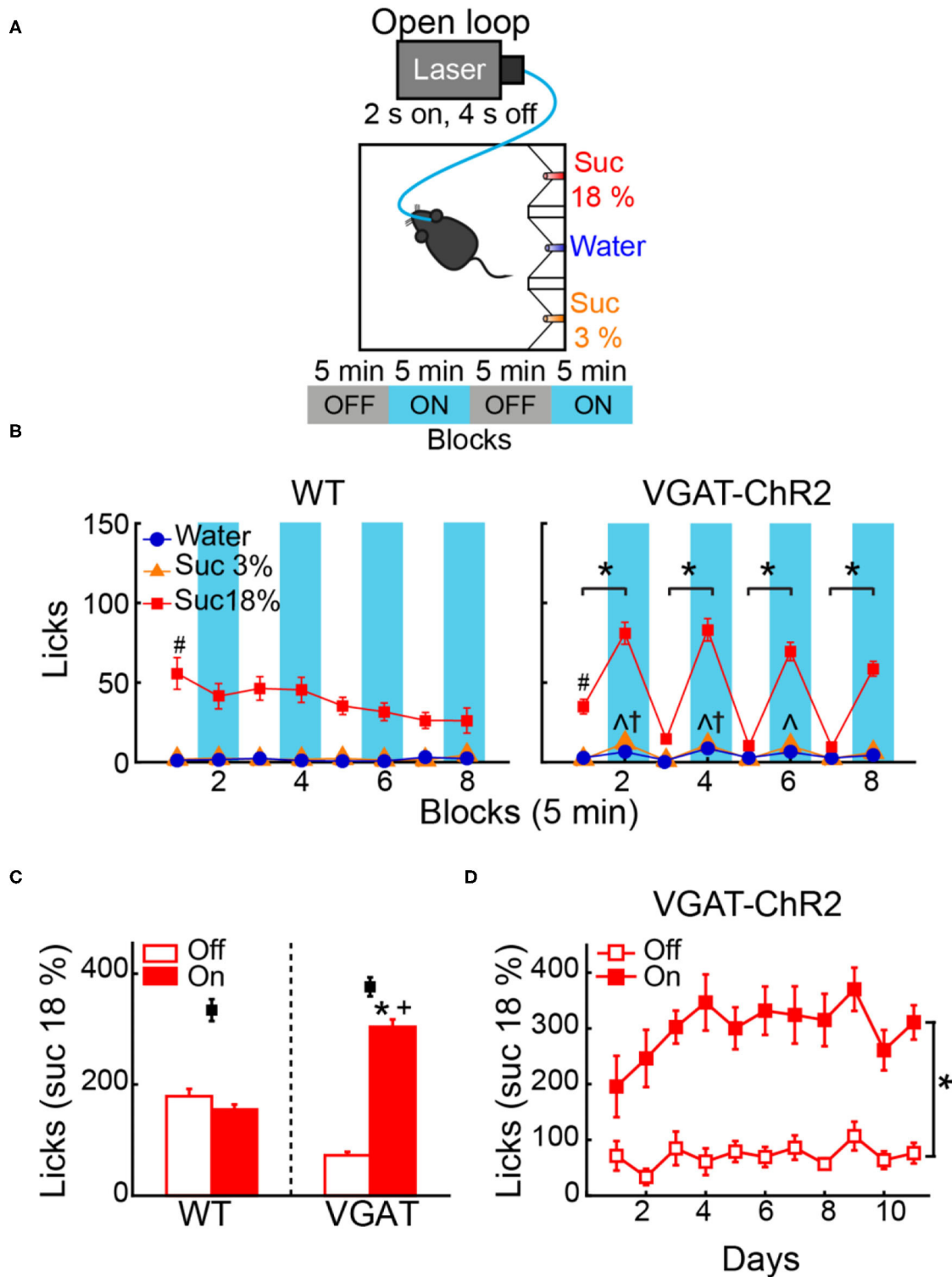


FIGURE 5 | Open loop stimulation of LHA^{Vgat+} neurons biases consumption toward the most palatable tastant and reinforces intake during opto-stimulation. **(A)** Behavioral protocol. Sated mice ($n = 6$ WT and $n = 12$ VGAT-ChR2) were located in an operant box equipped with three ports. The left port contained sucrose 18%, the central port water, and the right port sucrose 3%, counterbalanced across individuals. For details of the open loop, see **Figure 4A**. **(B)** *Left and right panels*, number of licks for each gustatory stimulus for WT and VGAT-ChR2 mice. Note that the VGAT-ChR2 mice increased consumption of the most palatable stimulus available (sucrose 18%) mainly in opto-stimulated blocks (blue rectangles), while it decreased intake in blocks without laser. **(C)** Mean licks for sucrose 18%, during blocks with laser on and off from WT and VGAT-ChR2 mice. Black squares show the total licks given for each group. **(D)** Licks for sucrose 18% during blocks with or (Continued)

FIGURE 5 | without laser across days. *Indicates a significant difference ($p < 0.0001$) between laser and no-laser blocks. # $p < 0.0001$ statistically significant difference between sucrose 18% and the other stimuli. ^ $p < 0.01$ between WT and VGAT-ChR2 for sucrose 3%; † $p < 0.01$ higher intake of water of VGAT-ChR2 compared with WT; ‡ $p < 0.0001$ higher consumption of VGAT-ChR2 compared with WT for sucrose 18% during blocks with laser. Using a two-way ANOVA and RM ANOVA followed by the Holm–Sidak test.

results suggest that feeding occurs while LHA^{Vgat+} neurons are active (Figure 4C), but they do not induce a persistent hunger state as AgRP neurons do (Chen et al., 2016).

Open Loop Activation of LHA^{Vgat+} Neurons Drives Intake of the Highest Sucrose Concentration Available

To test whether activation of LHA^{Vgat+} neurons promotes the intake of the most palatable available stimulus, naive WT and VGAT-ChR2 mice were opto-stimulated in an open loop protocol, with access to three adjacent ports containing water, sucrose 3%, or sucrose 18% (Figure 5A). As expected, both WT and VGAT-ChR2 mice preferred sucrose 18% over water, and sucrose 3% (Figure 5B; WT: two-way ANOVA main effect tastants; $F_{(2,1,560)} = 543.3$, $p < 0.0001$; VGAT-ChR2: $F_{(2,3,144)} = 983$, $p < 0.0001$). However, we found that sated VGAT-ChR2 mice increased their intake of 18% sucrose mainly during the laser-activated blocks compared with controls (Figure 5B, right; two-way ANOVA group by laser block interaction $F_{(7,1,568)} = 31.86$, $p < 0.0001$) and rarely licked in the absence of stimulation (Figure 5C). In this regard, VGAT-ChR2 mice seem to counteract the evoked sucrose intake by voluntarily restraining consumption in the no-laser blocks (blocks 3, 5, and 7), resulting in no significant differences between groups in the total intake of 18% sucrose (Figure 5C, see black squares; unpaired Student's *t*-test, $t_{(196)} = 1.512$, $p = 0.1320$). A between-days analysis revealed that the evoked 18% sucrose intake began from the first stimulation day (Figure 5D; RM ANOVA laser blocks, $F_{(1,22)} = 64.64$, $p < 0.0001$), although sucrose consumption ramps up throughout the days (Figure 5D; RM ANOVA main effect days, $F_{(10,220)} = 2.169$, $p < 0.05$). This suggests that LHA^{Vgat+} neurons, rather than inducing hunger *per se*, induced a learning process that potentiates the intake of the most palatable stimulus and confines consumption mainly in the presence of opto-stimulation.

The small increase in water and sucrose 3% intake observed during opto-stimulation of LHA^{Vgat+} neurons could be explained by random stimulation near those tastants (Figure 5B, right panel). Accordingly, we found in laser blocks 2, 4, and 6 a significant increase in water and sucrose 3% in the VGAT-ChR2 mice compared with the WT mice that completely neglected those tastants (Figure 5B, ^ $p < 0.05$ for sucrose 3%; † $p < 0.05$ for water). We hypothesize that this additional intake can be attributed to trials where laser activation occurred near these less palatable stimuli. To answer this, we employed a videography analysis (Figures 6A,B). When opto-stimulation occurred in the distance minor to 50 pixels (~3 cm, see section Materials and Methods) relative to sucrose 3% or water ports, the licking probability increased significantly after opto-stimulation (Figure 6B; sucrose 3%: $F_{(9,155)} = 29.33$, $p < 0.0001$; water: one-way ANOVA; $F_{(9,153)} = 12.74$, $p < 0.0001$). The angle of the

head was less informative (Figures 6C,D; sucrose 3%: $F_{(17,147)} = 0.71$, $p = 0.78$; water: one-way ANOVA; $F_{(17,145)} = 0.96$, $p = 0.49$; sucrose 18%: one-way ANOVA; $F_{(17,153)} = 0.49$, $p = 0.95$). Conversely, since mice are naturally attracted to the most palatable tastant, they spent more time near the lateral port with 18% sucrose, increasing their overconsumption (Figure 6C, Supplementary Video 1). Moreover, we observed that for the sucrose 18% port, even when the mouse position was twice as far (i.e., 6 cm) from the sucrose 18% port, the licking probability increased significantly (Figure 6B, right panel; one-way ANOVA, $F_{(9,161)} = 82.87$, $p < 0.0001$). These data are consistent with a study showing that opto-stimulation of LHA^{Vgat+} neurons promotes the intake of the nearest stimulus (Nieh et al., 2016) but further demonstrates that the most palatable stimulus has nearly twice the distance of attraction than the other less palatable options.

Open Loop Activation of LHA^{Vgat+} Neurons Also Increases the Time Spent and Drives the Intake of the Most Palatable Solid Food Available

We also explored whether LHA GABA neurons could induce the intake of the most palatable solid food available. Thus, using an open loop protocol, we opto-stimulate these neurons while mice choose among different solid foods. We found that optogenetic activation of LHA^{Vgat+} neurons increased the time spent near the most palatable food available. VGAT-ChR2 mice spent more time near the high-fat diet than the granulated sugar cube or the chow food pellet, relative to the WT group. Also, the intake of transgenic mice was higher for high-fat diet than the other food stimuli (see Supplementary Figure 5, Supplementary Video 2; time spent: one-way ANOVA, $F_{(5,306)} = 38.52$, $p < 0.0001$; intake: one-way ANOVA, $F_{(5,282)} = 68.76$, $p < 0.0001$); however, both WT and VGAT-ChR2 mice consumed similar amounts of high-fat diet ($p = 0.0985$), perhaps because it is a highly palatable food. When mice were able to choose between a sugar cube and a chow pellet, now the activation of these neurons increased the time spent and consumption of sugar cube over chow (see Supplementary Figure 6, Supplementary Video 3; time spent: one-way ANOVA, $F_{(3,96)} = 16.13$, $p < 0.0001$; intake: one-way ANOVA, $F_{(3,92)} = 13.65$, $p < 0.0001$). Our data suggest that open loop stimulation of LHA GABAergic neurons promotes the attraction to and the intake of the most palatable food available.

Closed-Loop Stimulation of LHA^{Vgat+} Neurons Drives the Intake of the Nearest Appetitive Stimuli

To further test the idea that LHA^{Vgat+} neurons could induce a preference for a proximal (but less palatable) stimulus over a distal one with higher hedonic value, we used a closed-loop

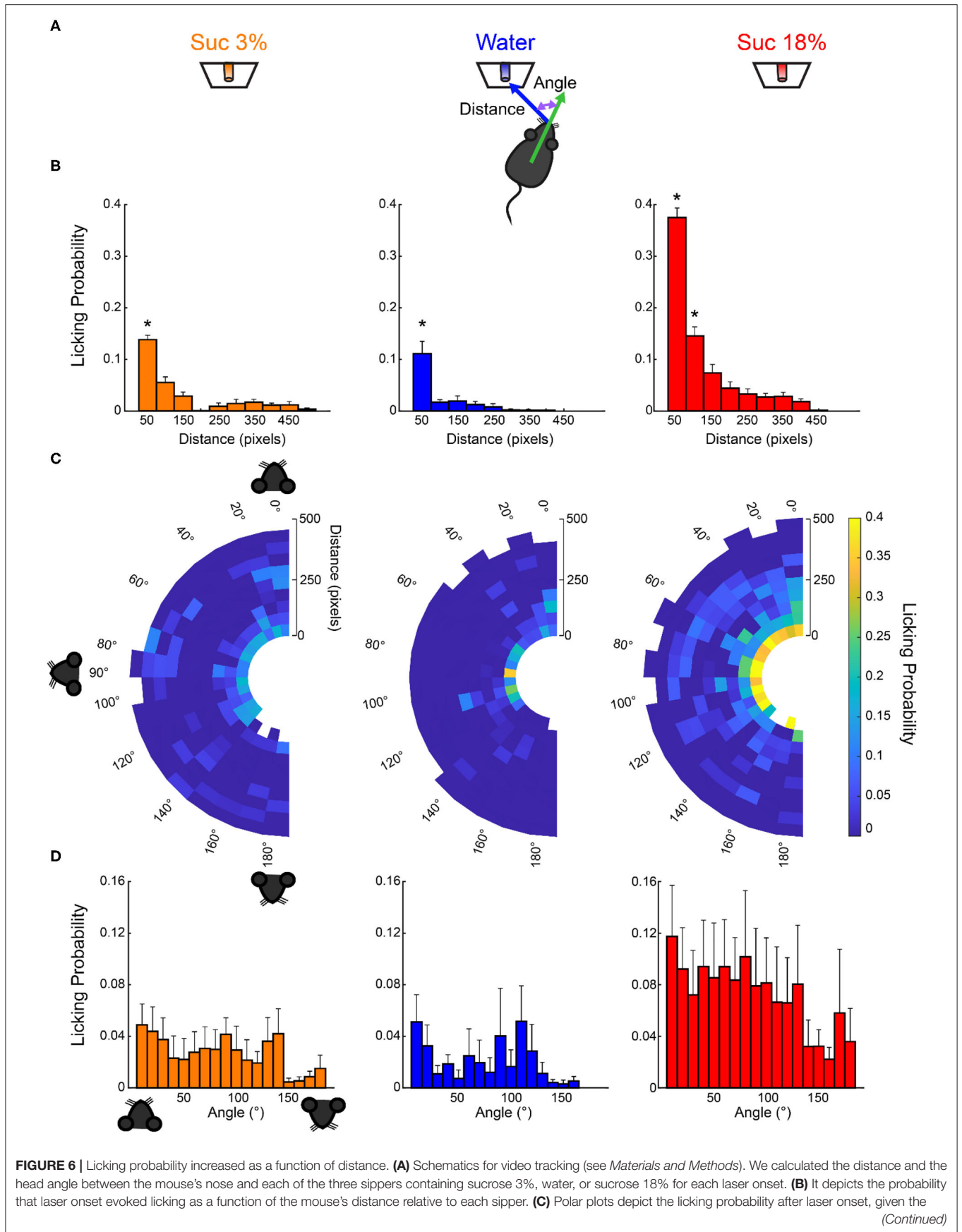


FIGURE 6 | distance and angle of the mouse relative to a licking sipper. At the onset of each laser stimulation, we computed the head angle and distance relative to each sipper, and in the following 6-s window, we tally if the mouse licked to any sipper. We normalized by dividing the number of times licking was elicited by the number of first lasers occurring on those coordinates. The drawing of the mice's head illustrates that if a mouse was facing toward the sipper, the angle is 0°, in a perpendicular position (90°), or 180° if it was looking in the opposite direction. **(D)** The probability of licking after laser onset vs. the angle between the head direction and the sipper. * Indicates significantly different ($p < 0.001$) from all other distances. One-way ANOVA followed by the Holm-Sidak test.

stimulation protocol. That is, the same mice (from **Figure 5**) were photostimulated, but here the laser was triggered by each head entry in the central port (i.e., opto-self-stimulation). This closed-loop configuration guarantees that stimulation only occurs proximal to water, the least palatable stimulus of the three in the box (**Figure 7A, right**). We found that activation of LHA^{Vgat+} neurons is rewarding since transgenic mice visited the central port significantly more and performed a higher number of opto-self-stimulations than the WT mice (**Figure 7B**; unpaired Student's t test, $t_{(196)} = 12$, $p < 0.0001$). Surprisingly, the total number of licks in the session seen in **Figure 7C** shows that during closed-loop stimulation, the VGAT-ChR2 mice explored and consumed more water than the WT mice (two-way ANOVA group by tastants interaction, $F_{(2,585)} = 13.09$, $p < 0.0001$, *post hoc* test at water, $p < 0.0001$). Note that in both open loop and closed-loop protocols, the WT and VGAT-ChR2 mice exhibited, at the end of the session, similar number of licks for 18 wt% sucrose (**Figure 7C**; two-way ANOVA group by protocol interaction, $F_{(1,391)} = 2.172$, $p = 0.1414$). That is, the total licks for sucrose 18% were not significantly different between groups, suggesting that these neurons do not interfere with the overall attractiveness of sucrose. However, by counting the number of licks given when the laser was turned on (in a 2.5-s window from laser onset—see **Figure 7D**), we uncovered a striking change in preference. As noted, in the open loop, the VGAT-ChR2 mice exhibited a higher preference for sucrose 18 wt%, over both sucrose 3 wt% and water. Now, in the closed-loop protocol, the same transgenic mice consumed more water compared with WT (two-way ANOVA group by tastants interaction, $F_{(2,585)} = 12.18$, $p < 0.0001$, *post hoc* test at water, $p < 0.0001$), and the consumption of water was about the same as sucrose 18% ($p = 0.8731$, n.s.; **Figure 7D**). The increase in water intake was selective to the photostimulation window since the transgenic mice only drank sucrose 18%, and neglected water when the laser was turned off (see arrow in **Figure 7E**; two-way ANOVA group by tastants interaction, $F_{(2,585)} = 64.16$, $p < 0.0001$, *post hoc* test at water vs. sucrose 18%, $p < 0.0001$). Thus, LHA^{Vgat+} neurons could promote water intake, but only when it is the nearest stimulus. The sucrose preference index (**Figure 7F**) showed that during the open loop, all VGAT-ChR2 mice preferred sucrose 18% over water (**Figure 7F**; values >0.5 and near to 1), whereas in the closed-loop protocol, when water was the nearest stimulus, most mice ($n = 9$ out of 12) significantly diminished their sucrose preference (**Figure 7F**, see the drop in preference index; paired Student's t -test, $t_{(58)} = 7.98$, $p < 0.0001$). From these nine animals, six exhibited a higher preference for water over sucrose 18% (preference index values <0.5 ; **Supplementary Video 4**). **Figure 7G** shows the color-coded location of fiber optic tips

in each VGAT-ChR2 mice plotted in **Figure 7F**. However, the location of the optical fibers does not explain the variability in preference. Perhaps the variability is due to different behavioral strategies used by each mouse. Nevertheless, the large variability in the drop of sucrose preference resembles the findings with sweet-induced facilitation by electrical ICSs (Poschel, 1968). These data suggest that LHA^{Vgat+} neurons drive consummatory behavior by integrating the stimulus proximity and hedonic value.

After Repeated Stimulation, the Correlation Between Laser-Bound Feeding and Self-Stimulation Strengthens

Previous studies have shown that after repeated LHA bulk stimulation (either electrically or with optogenetic targeting all cell types together), subjects switched from exhibiting stimulus-bound feeding to only self-stimulating, indicating that LHA-evoked feeding and reward could represent two distinct processes (Gigante et al., 2016; Urstadt and Berridge, 2020). Consequently, we explored whether laser-bound feeding changed after repeated optogenetic stimulation. In contrast to previous studies, we observed that laser-bound feeding induced by LHA^{Vgat+} neurons strengthened across sessions (**Figure 8A**, first 3 days: $r = 0.12$, $p = 0.69$; last 5 stimulation days: $r = 0.63$, $p < 0.05$), and after repeated stimulation, both opto-self-stimulation and laser-bound feeding exhibited a robust correlation (**Figure 8B**, first 3 days: $r = 0.42$, $p = 0.16$; last 5 days: $r = 0.61$, $p < 0.05$), suggesting that LHA-evoked feeding (licking) involves a learning process (Sharpe et al., 2017) and that LHA GABAergic neurons are a common neural substrate for feeding and reward.

The “Stimulus Proximity Effect” Is Not Restricted to Liquid Tastants, and It Also Occurs With Chocolate and Chow Pellets

The “proximity effect” evoked by LHA^{Vgat+} neurons was not restricted to liquid tastants; it also applied to solid foods. In a real-time place preference arena with four stimuli (**Figure 9A**), when chocolate pellets or chow food was the designated food near opto-self-stimulation of LHA^{Vgat+} neurons, mice also increased the time spent near those foods (**Figure 9B**; pellet: one-way ANOVA; $F_{(4,145)} = 99.05$, $p < 0.0001$; chow, $F_{(4,145)} = 182$, $p < 0.0001$) as well as their intake (**Figure 9C**; pellet: unpaired Student's t test, $t_{(68)} = 3.234$, $p < 0.05$; chow: unpaired Student's t test, $t_{(68)} = 3.651$, $p < 0.05$) (see **Supplementary Video 5**). Thus, these LHA GABAergic neurons reinforced the approach and exploration to any, if not the most appetitive stimulus, that happened to be proximal to the opto-stimulation.

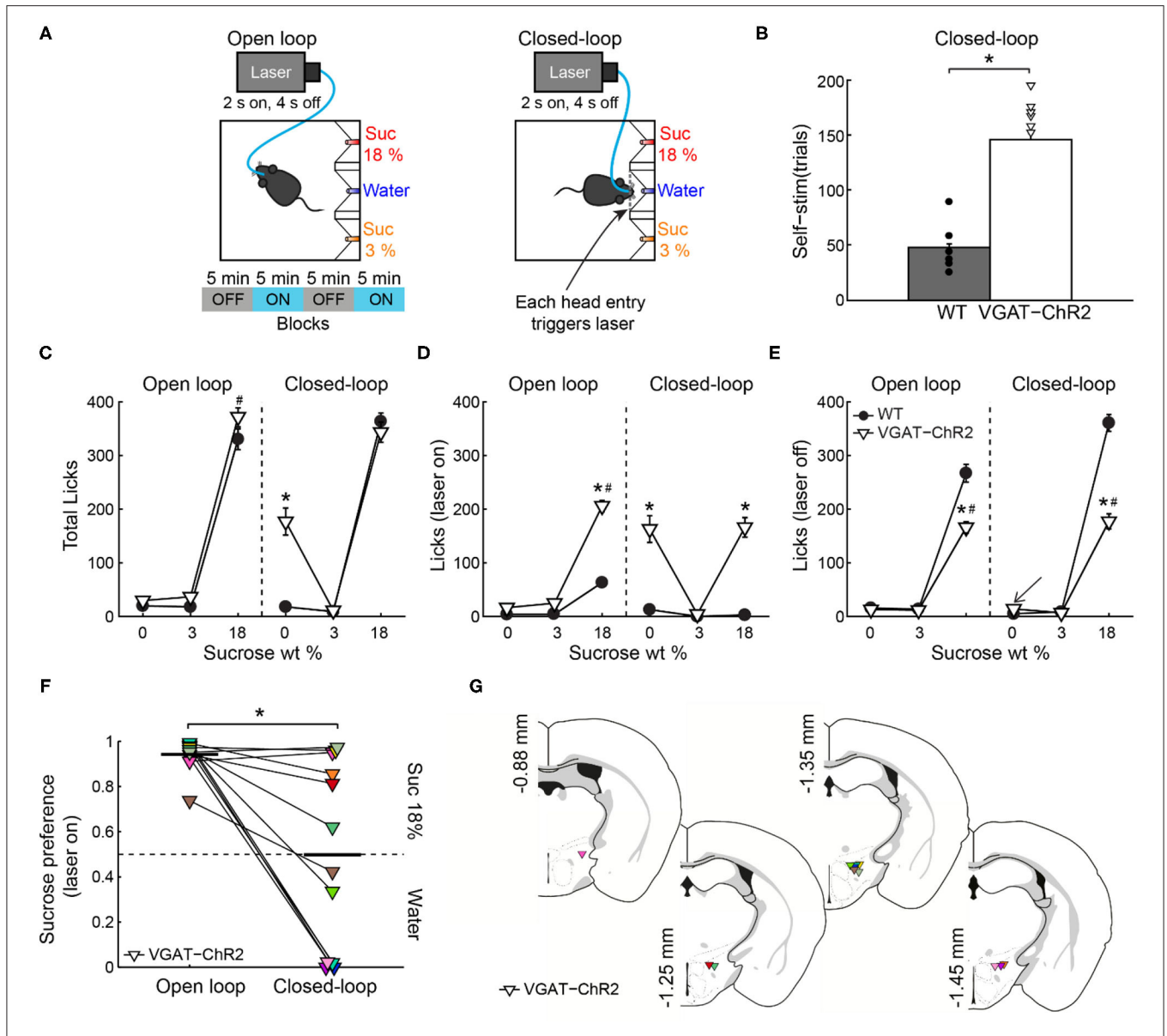
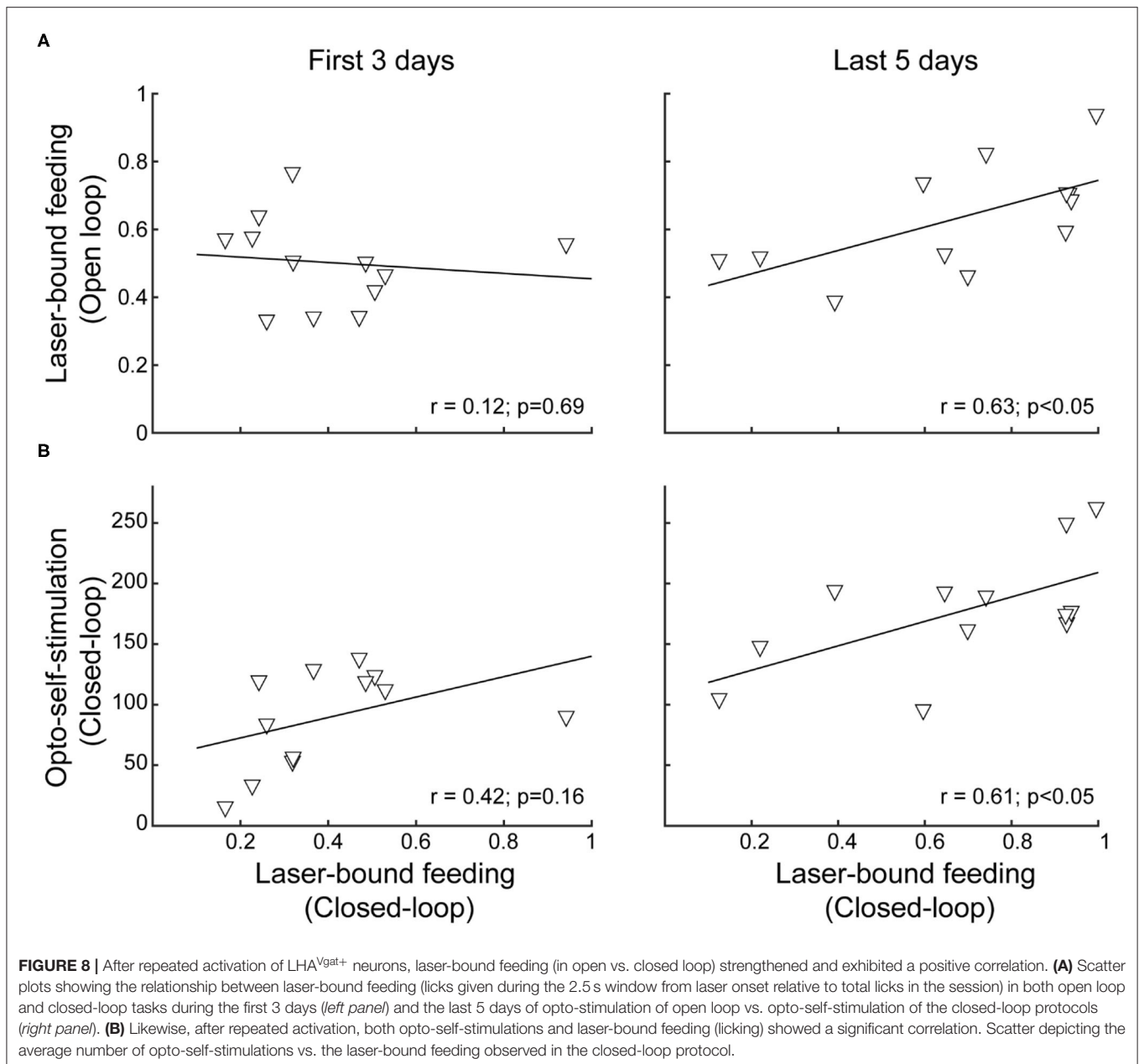


FIGURE 7 | If stimulation occurred near the less palatable stimulus, LHA^{Vgat+} neurons induced water intake despite sucrose. **(A)** For the open loop stimulation, the laser was activated (2 s on, 4 s off) regardless of behavior and mice position. The same mice and conventions as in **Figure 5A**. In the closed-loop configuration, the laser was triggered by a head entry in the central port. **(B)** The number of laser activations during the closed-loop protocol. The VGAT-ChR2 mice self-stimulate more than the WT mice. Each dot and triangle represent a single mouse. Unpaired *t*-test. **(C)** The total number of licks given for each stimulus during the entire session. In the open loop, both mice groups licked more sucrose 18% than water or sucrose 3%. However, in the closed-loop configuration, the VGAT-ChR2 consumed more water (0% sucrose) than the WT mice. **(D)** The number of licks evoked during 2.5 s after laser onset for each gustatory stimulus. **(E)** The number of licks when laser was turned off for each gustatory stimulus. **(F)** The water–sucrose 18% preference index from VGAT-ChR2 mice during photostimulation was defined as the number of 18% sucrose licks divided by the total licks for sucrose 18% + water. Thus, values higher than 0.5 indicate sucrose 18%, and values lower than 0.5 indicate preference for water. Some VGAT-ChR2 mice preferred water over sucrose. The horizontal black lines indicate mean preference in both stimulation protocols. Paired *t*-test. **(G)** Fiber optic location in the LHA of VGAT-ChR2 mice. **p* < 0.0001 indicates a significant difference from WT mice and stimulation protocols. #*p* < 0.0001 between sucrose 18% and the other stimuli. Two-way ANOVA followed by the Holm–Sidak test.

LHA^{Vgat+} Neurons' Activation Is Rewarding

In the same WT and VGAT-ChR2 mice tested in the closed-loop configuration seen in **Figure 7**, we went on to show that mice visited the central water port to opto-self-stimulate. To do this, we performed extinction sessions with the laser

disconnected (**Figure 10A**). We observed a rapid decrease in the number of opto-self-stimulations (**Figure 10B**; extinction phase, gray shadow). As expected, self-stimulation rapidly recovered when the laser was turned on again (**Figure 10**, see water after extinction). Thus, LHA^{Vgat+} neurons convey



a hedonically positive, rewarding signal (Jennings et al., 2015).

LHA^{Vgat+} Neurons Also Promote Licking an Empty Sipper

A previous study demonstrated that chemogenetic activation of LHA^{Vgat+} neurons increased gnawing to non-edible cork (Navarro et al., 2016). In the absence of other stimuli but cork, we also observed gnawing behavior in some mice, although we did not systematically study stereotypy (see **Supplementary Video 6**). Instead, we further explored this idea by replacing water, in the central port, with

an empty sipper (**Figure 10**, empty sipper). Transgenic mice continued opto-self-stimulating at the same pace as if water were still present in the central port. LHA^{Vgat+} stimulation evoked licking an empty sipper compared with WT mice (**Figure 10C**, unpaired Student's t -test, $t_{(40)} = 2.532$, $p < 0.05$). Thus, LHA^{Vgat+} neurons evoke an imminent urge to express consummatory behavior even in the form of dry licking an empty sipper, a non-biological relevant stimulus, but only when it is the nearest stimulus to photostimulation. This effect is perhaps also mediated by an increase in the rewarding value of appetitive oromotor responses *per se*.

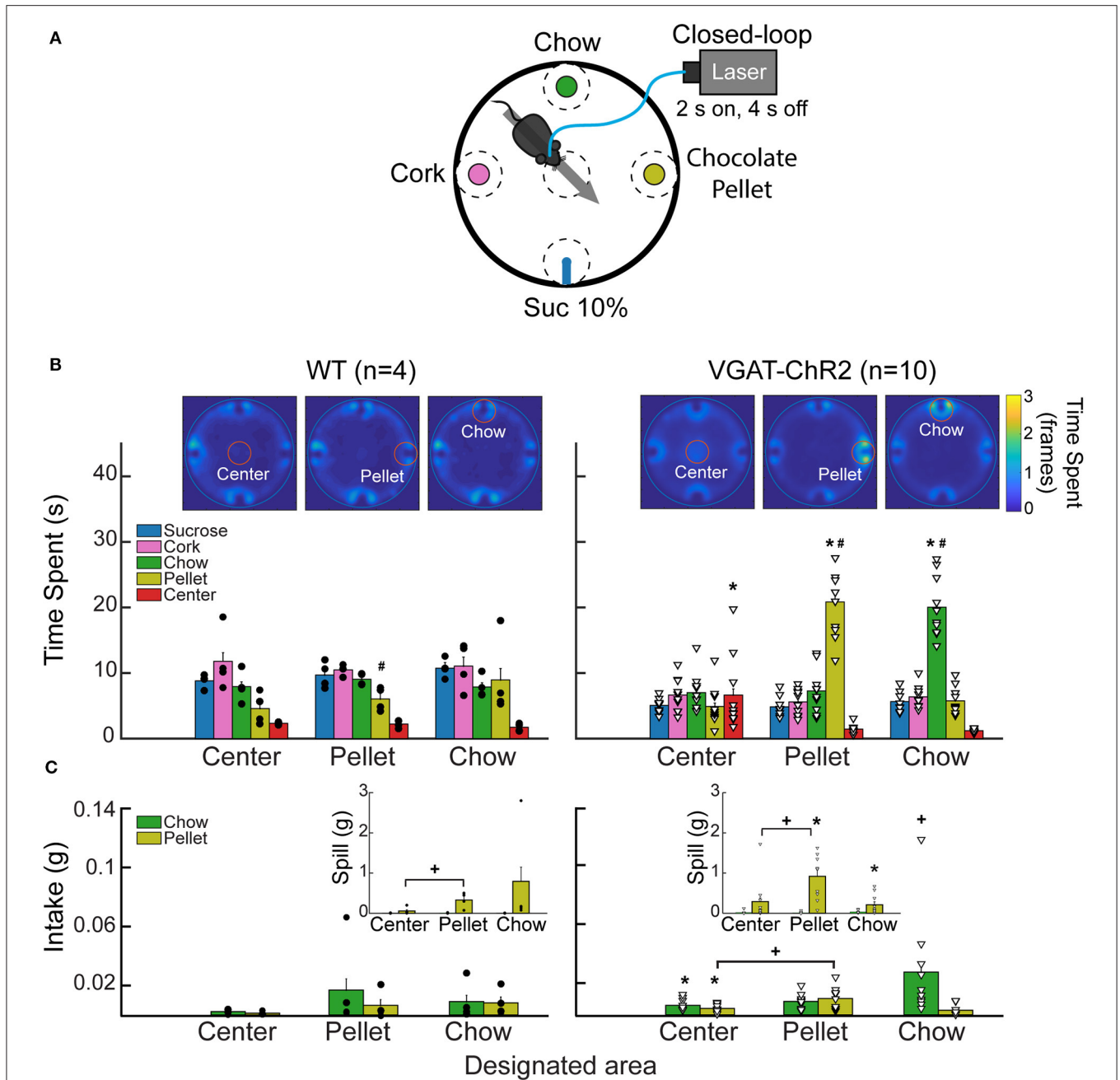


FIGURE 9 | Stimulation of LHA^{Vgat+} neurons is rewarding and biases the approach toward the nearest stimulus. **(A)** Different stimuli (plates containing cork, chow, chocolate pellets, or a sipper filled with 10% liquid sucrose) were presented simultaneously in a circular arena. In this task, when mice cross a designated area (dashed circles), the laser was turned on (2 s on; 4 s off) in a 40-min session. Thus, a mouse had to leave and re-enter the designated area to receive a new opto-self-stimulation. Only one designated area was used per session, and it remained in the same position for up to three or four consecutive sessions. **(B)** Heatmap and time spent from a representative WT (left panel) and VGAT-ChR2 mice (right panel), when the designated area was either the center, the pellet, or the chow (see red circles for the currently designated zone). The color bar indicates the number of frames the subject was detected in a given pixel; higher values indicate it remained in the same place for a longer time. Below, bar graphs depict the time spent in seconds exploring the designated area (within a radius of 5 cm). Each dot and triangle represent a single individual. Though mice normally avoid exploring the center of an open field, opto-self-stimulation in the center zone increased the time transgenic mice spent exploring it, compared with WT. Transgenic mice spent more time exploring the chocolate pellets and the chow food when they were in the designated zones. **(C)** Intake of chocolate pellet and chow. Activation of LHA^{Vgat+} neurons in the center zone increased chocolate pellets and chow consumption compared with the WT. *Inset*: Spill from chocolate pellets and chow. *Indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) from the WT. + $p < 0.05$ shows a significant increase in intake and spill during the session that a designated area was opto-self-stimulated relative to the sessions where the center was opto-self-stimulated. Unpaired Student's *t*-test. # $p < 0.01$ indicates a significant difference between designated area opto-stimulated and the other open field areas. One-way ANOVA followed by the Holm-Sidak test. See **Supplementary Video 5**.

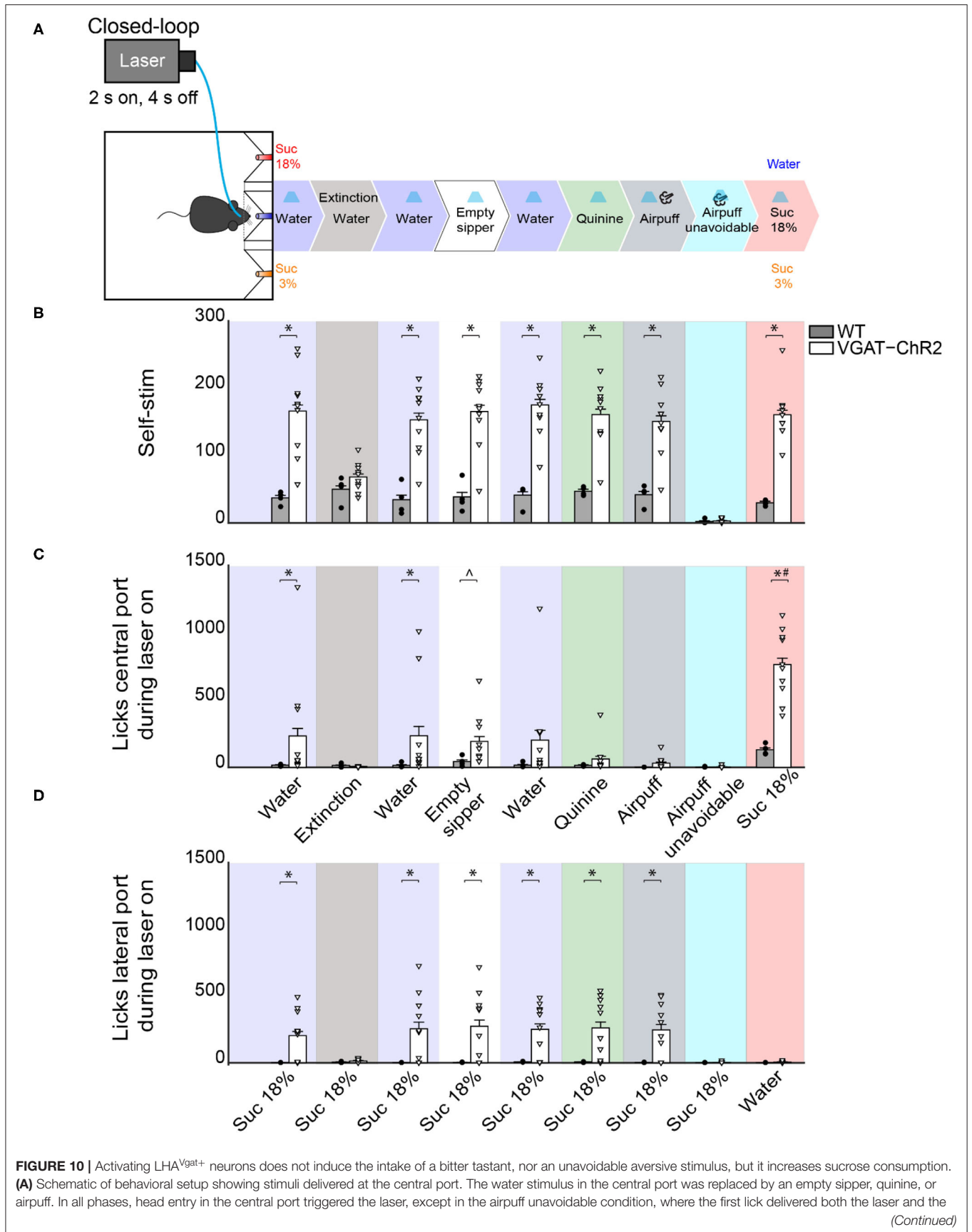


FIGURE 10 | airpuff. Finally, the airpuff in the central port was replaced by sucrose 18%. **(B)** The number of opto-self-stimulations given for each stimulus. The VGAT-ChR2 mice performed more self-stimulations than WT, except during extinction sessions and when the airpuff was unavoidable. **(C)** The number of licks given to the central port. The licks in the central port decreased when an aversive stimulus was present, such as quinine or airpuffs. In contrast, a non-edible stimulus such as an empty sipper elicited more licks from VGAT-ChR2 mice ($p < 0.05$). Moreover, when sucrose 18% was in the central port, the VGAT-ChR2 group increased its consumption substantially compared with the WT. **(D)** The number of licks in the lateral port containing sucrose 18% during opto-self-stimulation. The intake of the lateral port of sucrose 3% is not shown because it was neglectable. Each dot and triangle represent a single individual. ^Denotes statistically significant difference ($p < 0.0001$) from WT. Unpaired Student's *t*-test. * $p < 0.05$ relative to the WT group. # $p < 0.05$ between sucrose 18% from other stimuli delivered at the central port. Two-way ANOVA followed by the Holm-Sidak test.

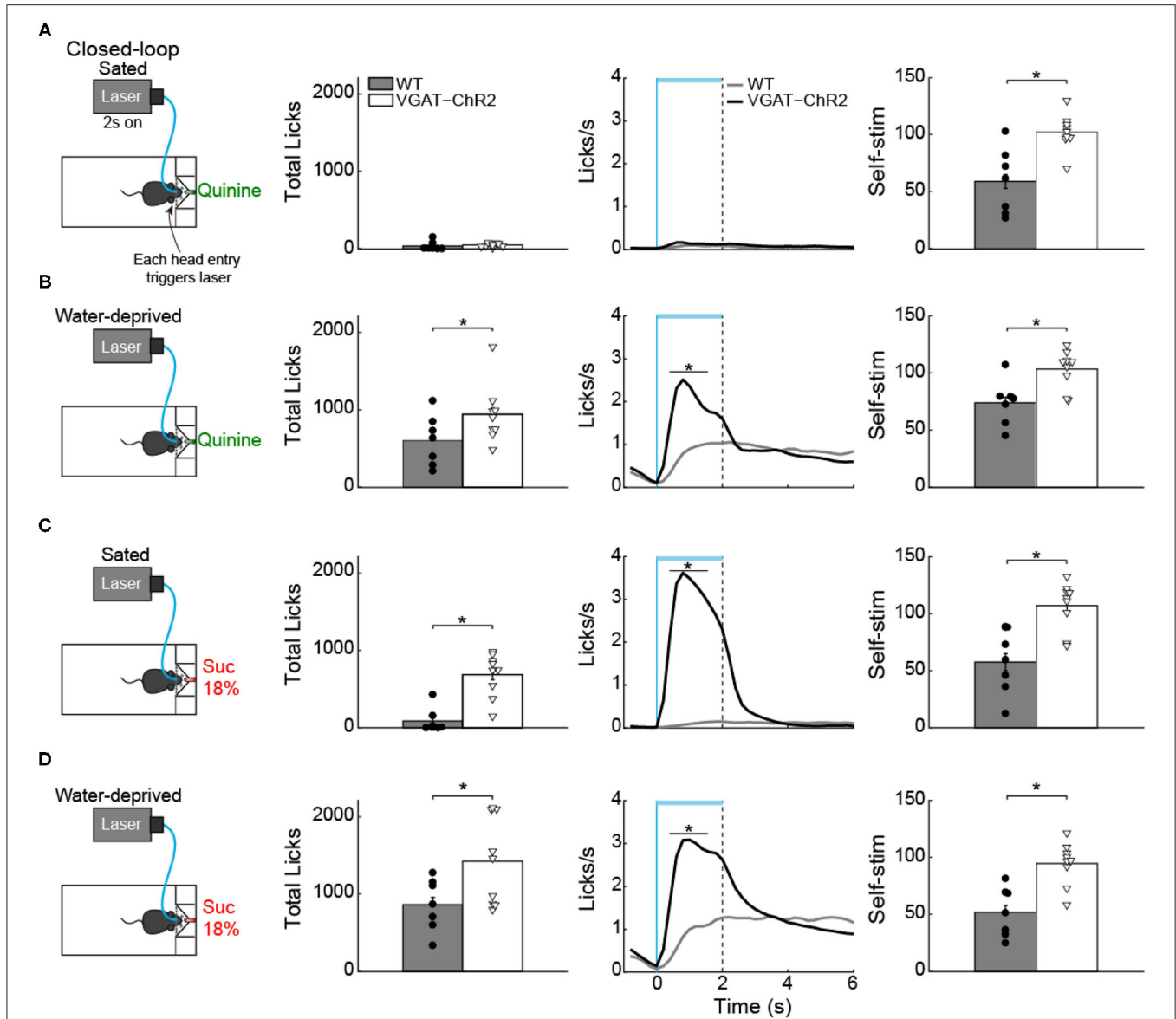
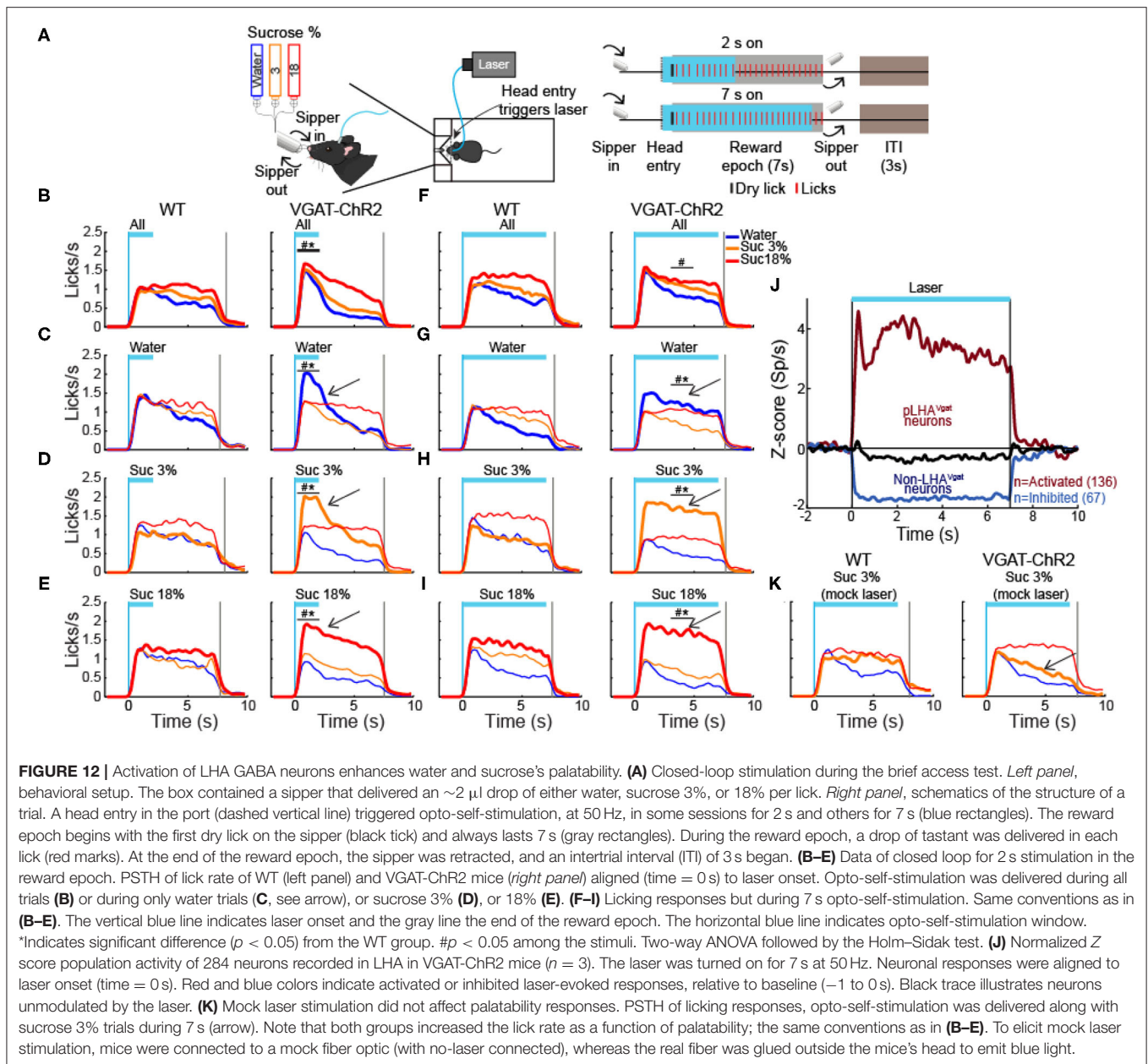


FIGURE 11 | Water deprivation gates a time window where activation of LHA GABAergic neurons increases quinine intake. **(A)** Sated mice had free access to one sipper filled with quinine. The laser was turned "on" in a closed-loop protocol (*left panel*). Each head entry triggers 2-s laser "on" followed by a 4-s time out with no-laser. In sated VGAT-ChR2 mice, activation of these neurons did not increase quinine intake (*central panel* shows the PSTH of the lick rates aligned to laser onset) (time = 0 s). Although sated transgenic mice do not lick for quinine, they continued opto-self-stimulating (*right panel*). **(B)** Water-deprived transgenic mice consumed more quinine than WT mice (*central panel*) when the laser was turned on (horizontal blue line). **(C,D)** Total licks, PSTH of the lick rate (*central panels*), and number of opto-self-stimulations of 18% sucrose during sated and water deprivation conditions (*right panel*). The horizontal blue line indicates opto-self-stimulation window. The vertical blue line indicates the laser onset, and the black dashed line the laser offset. * $p < 0.01$ indicates significant differences compared with WT mice according to an unpaired Student's *t*-test.



When Sucrose Is Available, Activation of LHA^{Vgat+} Neurons Neither Promotes Intake of an Aversive Bitter Tastant nor Tolerance of Punishment, but It Further Increases Sucrose Consumption

To explore whether the “stimulus proximity effect” was also applied to aversive stimuli, we replaced the central stimulus (water) with aversive stimuli, including quinine (a tastant that humans experience as bitter taste) or airpuffs (**Figure 10A**). Upon quinine presentation, the number of licks given in the central port sharply decreased (**Figure 10C**, green), but transgenic mice continued to self-stimulate and go to the

lateral port to lick for sucrose 18% (**Figure 10D**, green). We obtained similar results to those in quinine stimulation during the airpuff delivery phase (**Figure 10D**, dark gray). Under this condition, transgenic mice completely stopped self-stimulation (**Figure 10B**, cyan) and aborted 18% sucrose intake from the lateral port (**Figure 10D**, cyan). These results suggest that, in sated mice, LHA^{Vgat+} neurons did not induce quinine intake nor increase tolerance to airpuffs.

Finally, we explored whether proximity to the most palatable tastant further facilitated its overconsumption. Thus, we exchanged the position of water and sucrose 18%. When sucrose 18% was delivered in the central port, transgenic mice greatly overconsumed it (**Figure 10C**, pink). The intake of sucrose 18%

was higher than for all the other tastants tested previously ($p < 0.0001$). These results collectively suggest that activation of LHA^{Vgat+} neurons is rewarding and promotes increased consumption of the nearest stimulus even if it is not the most palatable (e.g., water and empty sipper). If the nearest stimulus happens to be the most palatable (i.e., sucrose 18%), then LHA GABA neurons further facilitated its consumption.

LHA GABA Neurons Increased Quinine Intake but Only in Water-Deprived Mice

Having demonstrated that in the presence of sucrose, activation of these neurons failed to increase quinine intake (Figure 10C, green), with a new group of naive mice, we then explored whether LHA^{Vgat+} neurons could induce quinine intake when it was the only option. As expected, in sated mice, we found that activation of LHA^{Vgat+} neurons did not affect quinine intake compared with WT (Figure 11A; unpaired Student's t -test, $t_{(46)} = 0.9925$, $p = 0.3262$). Surprisingly, it promoted a higher quinine intake when transgenic mice were water-deprived (Figure 11B; unpaired Student's t -test, $t_{(46)} = 2.958$, $p < 0.01$), specifically during the photostimulation window (Figure 11B; unpaired Student's t -test, $t_{(46)} = 4.473$, $p < 0.0001$), suggesting that activation of these neurons is sufficient to increase the acceptance of bitter tastants but only during water deprivation. In contrast, we found that regardless of homeostatic needs, activation of these neurons increased sucrose 18% intake relative to WT mice (Figures 11C,D; unpaired Student's t -test, $t_{(30)} = 6.933$, $p < 0.0001$; unpaired Student's t -test, $t_{(30)} = 3.183$, $p < 0.01$).

Activation of LHA^{Vgat+} Neurons Enhances Palatability

We next explored whether, at equal stimulus distance, these neurons could enhance palatability responses. To do this, in a new group of water-deprived mice, we employed a brief access test again. In this task, we delivered gustatory stimuli water, sucrose 3%, and sucrose 18% from the same sipper tube, but in different trials. Figure 12A displays the trial's structure (same conventions as in Figure 2). We found that both groups increased their licking rate as a function of sucrose's concentration, reflecting its palatability (Figure 12B; two-way ANOVA main effect of tastants, $F_{(2,174)} = 9.101$, $p < 0.001$). However, during the 2 s of laser stimulation, the VGAT-ChR2 mice exhibited a greater lick rate for all three tastants. After the laser was turned "off," these mice abruptly stopped licking for water and sucrose 3% compared with the WT group (Figure 12B, right panel; two-way ANOVA group by tastants interaction, $F_{(2,174)} = 5.293$, $p < 0.01$). Moreover, when stimulation was paired with water trials, transgenic mice selectively increased their lick rate to water relative to WT (Figure 12C, blue line and arrow; two-way ANOVA group by tastants interaction, $F_{(2,84)} = 6.009$, $p < 0.01$), even surpassing licking responses evoked by the most palatable sucrose 18%. A similar enhancement of oromotor responses was observed by pairing sucrose 3% trials with LHA^{Vgat+} opto-self-stimulation (Figure 12D, orange; two-way ANOVA group by tastants interaction, $F_{(2,84)} = 16.72$, $p < 0.0001$). Likewise, the laser-bound feeding (licking rate) was

strongest when sucrose 18% was paired with the optogenetic stimulation (Figure 12E, red, see arrow; two-way ANOVA group by tastants interaction, $F_{(2,84)} = 16.49$, $p < 0.0001$).

Finally, we show that palatability responses could be artificially extended as long as LHA^{Vgat+} neurons were continuously activated. For this, we photostimulated them for up to 7 s. We observed a similar enhancement pattern, maintained for the duration of opto-stimulation (see Figures 12F–I, arrows; all trials: two-way ANOVA main effect of tastants, $F_{(2,114)} = 12.53$, $p < 0.0001$; water trials: two-way ANOVA group by tastants interaction, $F_{(2,84)} = 9.850$, $p < 0.001$; sucrose 3% trials: two-way ANOVA group by tastants interaction, $F_{(2,84)} = 33.47$, $p < 0.0001$; sucrose 18% trials: two-way ANOVA group by tastants interaction, $F_{(2,84)} = 8.360$, $p < 0.001$), suggesting that LHA^{Vgat+} neurons can adjust the enhancement of oromotor palatability responses by simply sustaining its neuronal activity. We verified that using optrode recordings, 7-s optogenetic stimulation produced sustained LHA^{Vgat+} neuronal responses (Figure 12J). Moreover, transgenic mice did not merely use the light as a cue to guide behavior since laser stimulation with a mock optical fiber failed to increase licking (Figure 12K; two-way ANOVA group by tastants interaction, $F_{(2,54)} = 1.619$, $p = 0.207$). In sum, our data demonstrate that activation of LHA^{Vgat+} neurons triggers a reinforcing signal that amplifies the positive hedonic value of proximal stimuli, promoting overconsumption.

DISCUSSION

LHA has historically been viewed as a critical center for feeding (Anand and Brobeck, 1951; Delgado and Anand, 1953; Teitelbaum and Epstein, 1962), although it also processes sucrose's palatability-related information (Norgren, 1970; Ono et al., 1986; Li et al., 2013). In addition to nutritive value, sucrose's palatability is the affective or hedonic attribute of sweetness that determines whether to like it or not (Grill and Berridge, 1985). Despite the importance of palatability to promote overconsumption, the specific LHA cell type(s) identity involved in processing sucrose's palatability has remained elusive. Our results demonstrated that a subpopulation of LHA^{Vgat+} GABAergic neurons encodes sucrose's palatability by exhibiting two opposite modulatory patterns, either correlating positively or negatively with the palatability index, with a bias toward a positive correlation. Furthermore, opto-stimulation of LHA^{Vgat+} cell somas promoted the approach and intake of the most palatable tastant available. In contrast, opto-self-stimulation promoted increased liquid intake of the less attractive and proximal stimuli, despite having more palatable but distal tastants available. These findings show that LHA^{Vgat+} neurons compute and/or combine, at least, two types of information: one related to stimulus proximity and the other to palatability that results in enhancing stimulus saliency (Nieh et al., 2016). Experiments with solid food also unveiled that transgenic mice spent more time near the most palatable food available. More importantly, among the many other functions already ascribed to these neurons [see below and Nieh et al. (2016)], our data uncovered a new

function of LHA^{Vgat+} neurons as physiological potentiators of sucrose-induced oromotor palatability responses.

Previous studies have shown that the LHA^{Vgat+} population contains many subpopulations with different functional responses, with at least one ensemble responding to appetitive (approach) and others to consummatory behaviors (Jennings et al., 2015). Furthermore, activation of these neurons is rewarding, induces voracious eating (Jennings et al., 2015; Navarro et al., 2016), and promotes interaction of the nearest stimulus (either objects or other mice) (Nieh et al., 2016), suggesting that they play a role in multiple motivated behaviors. However, it is also known that LHA connects and receives direct inputs from multiple cortical and subcortical gustatory regions (Simerly, 2004; Berthoud and Münzberg, 2011), and some electrophysiological studies report that LHA neurons respond to gustatory stimuli—in particular to tastant palatability (Norgren, 1970; Ono et al., 1986; Schwartzbaum, 1988; Yamamoto et al., 1989; Karádi et al., 1992). As noted in rodents, palatability is operationally defined as the enhancement of hedonically positive oromotor responses induced by stimulating the tongue with ascending sucrose concentrations (Berridge and Grill, 1983; Spector et al., 1998; Villavicencio et al., 2018). Specifically, these hedonically positive oromotor responses may include an increase in the lick rate or the bout size. In agreement with this definition, we found that a subpopulation of LHA palatability-related neurons tracked licking oromotor-related responses by increasing or decreasing their activity in a sucrose concentration-dependent manner. Within a session, LHA neurons tracked the sucrose's palatability rather than satiety or hunger signals. We showed that these LHA^{Vgat+} neurons could function as enhancers of sucrose's palatability. Optogenetic activation of these neurons can also enhance water's palatability if it is the nearest stimulus. We found an increased lick rate for water during these neurons' activation as if the animal were sampling a high sucrose concentration. Moreover, their activation promotes the intake of liquid sucrose (or solid granulated sugar cube). These neurons also increased the consumption of other more palatable stimuli like high-fat pellets (see **Supplementary Figure 5**; **Supplementary Video 2**), similar to the other GABAergic neurons but in the zona incerta (Zhang and van den Pol, 2017). Thus, our data demonstrate that activation of LHA GABAergic drives the intake of the most palatable stimulus available in the animal's environment.

Although activation of LHA^{Vgat+} promotes substantial feeding behavior, it has become clear that LHA^{Vgat+} neurons are not directly involved in evoking hunger (Burnett et al., 2016; Navarro et al., 2016; Marino et al., 2020), as AgRP neurons in the arcuate do (Chen et al., 2016). In this regard, and unlike AgRP neurons, prestimulation of LHA GABAergic neurons did not trigger a sustained sucrose intake in the absence of continuous activation (**Supplementary Figure 4**). Thus, to induce a consummatory behavior, these neurons are required to remain active. Moreover, and in agreement with these findings, we found that the intake induced by LHA^{Vgat+} neurons conveys a positive valence signal that combines both stimulus proximity and palatability-related information. Thus, these neurons enhance the saliency of nearby hedonically positive stimuli, whether those stimuli are sapid chemicals, as we show, or

social cues, as in the approach behavior toward juvenile or female intruders and new objects (Nieh et al., 2016).

It is important to highlight that opto-self-activation of LHA^{Vgat+} neurons resembles many hallmark behaviors evoked by LHA electrical stimulation. In particular, our results could shed some light on why, at low-intensity electrical currents, lever pressing to deliver ICSs only occurs if food (or sucrose) is in close proximity (Mendelson, 1967; Coons and Cruce, 1968; Valenstein et al., 1968; Valenstein and Phillips, 1970). Consistent with its role in enhancing sucrose's palatability, a subpopulation of GABAergic neurons could indirectly explain why sweet tastants further potentiate the rate of LHA electrical ICSs (Poschel, 1968). We concluded that a subpopulation of LHA^{Vgat+} neurons could account for many, if not all, of these electrically induced phenomena. Also, we found differences between unspecific LHA stimulation and our targeted LHA^{Vgat+} stimulation. Unlike electrical LHA stimulation, we found that the laser-bound feeding was observed in all tested VGAT-ChR2 mice ($n = 31$, **Figures 4–12**). In contrast, to the high variability found in rats exhibiting LHA electrically induced feeding, one study reported that only 12 of 34 rats showed stimulus-bound feeding (Valenstein and Cox, 1970). Similarly, a large variability was observed when unspecific bulk optogenetic stimulation activated *all* cell types found in LHA, simultaneously (Urstadt and Berridge, 2020). These studies reported that after repeated LHA stimulation (either electrically or with optogenetics), some subjects switched from exhibiting stimulus-bound feeding to only self-stimulating, suggesting that these two processes were flexible and not correlated (Gigante et al., 2016; Urstadt and Berridge, 2020). In contrast, we found that repeated stimulation of LHA^{Vgat+} neurons increases laser-induced feeding (licking). Likewise, the correlation between optogenetic self-stimulation and laser-bound feeding increases over stimulation days (**Figure 8**). That is, the more the animals self-stimulated, the stronger the evoked laser-bound licking was. Thus, LHA^{Vgat+} neurons are the common neural substrate for evoking both feeding and reward, though it was recently shown that they do it by using two projection pathways: reward via a VTA projection and feeding via the peri-locus coeruleus nuclei (Marino et al., 2020).

Given that LHA is involved in reward and aversion (Ono et al., 1986), we next tested whether LHA^{Vgat+} neurons could promote bitter tastants' intake. We found that opto-stimulation of LHA^{Vgat+} neurons failed to promote quinine intake, a bitter tastant, or tolerance of an aversive airpuff when sucrose was also available. Thus, these neurons play a minimal role in increasing the preference for a proximal but aversive stimulus over distal sucrose. Furthermore, in sated mice and using a single bottle test, these neurons also failed to increase quinine intake. Unexpectedly, during water deprivation, a copious quinine consumption was observed. These results demonstrate that the consummatory drive induced by the activation of GABAergic neurons largely depends on the palatability of the stimulus and the animal's internal state. These results agree with previous findings that chemogenetic inhibition of LHA^{Vgat+} neurons did not alter the quinine rejection responses. Thus, in sated mice, these neurons are not necessary to express hedonically negative responses induced by bitter tastants (Fu et al., 2019).

However, they did not explore their sufficiency. Our results showed that water deprivation temporarily gated LHA^{Vgat+} neurons to promote quinine intake and further demonstrated that their activation is sufficient to increase acceptance of an aversive tastant during water deprivation.

The LHA comprises multiple heterogeneous and overlapping populations based on the expression of genetic markers for neuropeptides, receptors, and proteins involved in the synthesis and vesicular packaging of neurotransmitters (Bonnaïon et al., 2016; Mickelsen et al., 2019). Thus, the LHA^{Vgat+} population can be further subdivided into GABA neurons expressing leptin receptor (LepRb) (Leininger et al., 2009; Mickelsen et al., 2019), or the neuropeptide galanin (Gal), or neurotensin (Nts) (Qualls-Creekmore et al., 2017; Kurt et al., 2019; Mickelsen et al., 2019). It is known that the activation of LHA GABA-LepRb is rewarding (Giardino et al., 2018), similar to LHA^{Vgat+} neurons. Likewise, LHA GABA-Gal-expressing neurons are related to food reward behavior, but unlike LHA^{Vgat+}, these neurons do not promote food consumption (Qualls-Creekmore et al., 2017). From these subpopulations, only the LHA GABA-Nts neurons recapitulate some (but not all) of the behavioral effects reported here. Unlike LHA^{Vgat+} neurons, a previous study found that LHA GABA-Nts neurons do not increase chow intake. Instead, they promote the liquid intake of palatable tastants (water, NaCl, and sucrose). In sated mice, chemogenetic activation of GABA-Nts increased the intake of bitter quinine, albeit with lower magnitude, when it was the only liquid available to eat with chow food, a marked contrast to our findings with broad LHA GABAergic neurons' activation, although they did not explore quinine intake in the absence of chow food or water-deprived mice. However, they performed a two-bottle test and found that GABA-Nts neurons increased water intake over quinine, suggesting that activation of these neurons is not involved in driving mice's preference for bitter tastants, similar to what we found for the LHA^{Vgat+} population. Also, similar to our findings, activation of LHA GABA-Nts induced water drinking, which was further facilitated if the solution was sucrose (Kurt et al., 2019). Thus, it will be interesting to determine the role that LHA GABA-Nts neurons play in encoding and potentiating sucrose's palatability. It follows that the LHA contains nested functions encoded in each subpopulation (or cell types) that are then recruited selectively to exert a more refined control over feeding and reward.

A caveat of this study is that we employed bacterial artificial chromosomes (BAC) transgenic strain mouse, VGAT-ChR2, that constitutively expressed ChR2 in GABAergic neurons expressing the gene for the VGAT (Zhao et al., 2011). In this model, we cannot rule out the unintended activation of GABAergic terminals from distal regions (Thoeni et al., 2020), which also occurs with classic electrical stimulation. Nevertheless, in the more specific transgenic model, the Vgat-ires-Cre mice, a similar feeding-bound behavior for chow food has been found (Marino et al., 2020), as we have shown here (see chow in **Figures 9B,C; Supplementary Video 5**). Moreover, the VGAT-ChR2 transgenic model affords important advantages such as a consistent expression of ChR2 (Zeng and Madisen, 2012) and heritable transgene expression patterns across experimental cohorts (Ting and Feng, 2013), which increased reproducibility

across animals tested. It is also a more selective model to characterize GABAergic neurons (excluding the glutamatergic component) and their effects recapitulating classical effects observed with electrical LHA stimulation (Delgado and Anand, 1953; Phillips and Mogenson, 1968).

In summary, here, we found that at least a subpopulation of LHA^{Vgat+} neurons could be an important hub that links stimulus proximity and palatability-related information to potentiate the palatability of nearby energy-rich foods, especially those containing sucrose.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this article are available on request to the corresponding author. Requests to access the datasets should be directed to Ranier Gutierrez, ranier@cinvestav.mx.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by CINVESTAV Animal Care and Use Committee.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AG, AC, JL-I, and RG designed the research. AG, AC, JL-I, LP-S, and ML performed the research. MV contributed unpublished analytic tools. AG, AC, JL-I, and RG analyzed the data, AG and RG wrote the paper. All authors reviewed and approved the manuscript for publication.

FUNDING

This project was supported in part by Productos Medix 3247, Cátedra Marcos Moshinky, fundación Miguel Alemán Valdés, CONACyT Grants Fronteras de la Ciencia 63, and Problemas Nacionales 464 (to RG).

ACKNOWLEDGMENTS

Aketzali Garcia had a CONACyT doctoral fellowship, and data in this work is part of her doctoral dissertation in the Posgrado en Ciencias Biomédicas of the Universidad Nacional Autónoma de México. We want to thank Martin Vignovich and Professor Sidney A. Simon for helpful comments in an early version of this manuscript. We thank Mario Gil Moreno for building homemade optrode, and the valuable help of Juan de Dios Rodríguez-Callejas during the acquisition of confocal microscope images is also acknowledged. We also thank Ricardo Gaxiola, Victor Manuel García Gómez, and Fabiola Hernandez Olvera for invaluable animal care. This manuscript has been released as a preprint at Biorxiv (Garcia et al., 2020).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2020.608047/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Anand, B. K., and Brobeck, J. R. (1951). Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 77, 323–324.
- Berridge, K. C., and Grill, H. J. (1983). Alternating ingestive and aversive consummatory responses suggest a two-dimensional analysis of palatability in rats. *Behav. Neurosci.* 97, 563–573.
- Berridge, K. C., and Kringelbach, M. L. (2008). Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology* 199, 457–480. doi: 10.1007/s00213-008-1099-6
- Berridge, K. C., and Valenstein, E. S. (1991). What psychological process mediates feeding evoked by electrical stimulation of the lateral hypothalamus? *Behav. Neurosci.* 105, 3–14. doi: 10.1037//0735-7044.105.1.3
- Berthoud, H.-R., and Münzberg, H. (2011). The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics. *Physiol. Behav.* 104, 29–39. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.04.051
- Bonnavion, P., Mickelsen, L. E., Fujita, A., de Lecea, L., and Jackson, A. C. (2016). Hubs and spokes of the lateral hypothalamus: cell types, circuits and behaviour. *J. Physiol.* 594, 6443–6462. doi: 10.1111/JP271946
- Buonomano, D. V. (2003). Timing of neural responses in cortical organotypic slices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4897–4902. doi: 10.1073/pnas.0736909100
- Burnett, C. J., Li, C., Webber, E., Tsaousidou, E., Xue, S. Y., Brüning, J. C., et al. (2016). Hunger-driven motivational state competition. *Neuron* 92, 187–201. doi: 10.1016/j.neuron.2016.08.032
- Chen, Y., Lin, Y.-C., Zimmerman, C. A., Essner, R. A., and Knight, Z. A. (2016). Hunger neurons drive feeding through a sustained, positive reinforcement signal. *Elife* 5:e18640. doi: 10.7554/eLife.18640
- Coons, E. E., and Cruce, J. A. (1968). Lateral hypothalamus: food current intensity in maintaining self-stimulation of hunger. *Science* 159, 1117–1119. doi: 10.1126/science.159.3819.1117
- Delgado, J. M., and Anand, B. K. (1953). Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Am. J. Physiol.* 172, 162–168. doi: 10.1152/ajplegacy.1952.172.1.162
- Ferrosiwi, A., Cardo, B., and Velley, L. (1987). Gustatory preference-aversion thresholds are increased by ibotenic acid lesion of the lateral hypothalamus in the rat. *Brain Res.* 437, 142–150. doi: 10.1016/0006-8993(87)91535-6
- Fu, O., Iwai, Y., Narukawa, M., Ishikawa, A. W., Ishii, K. K., Murata, K., et al. (2019). Hypothalamic neuronal circuits regulating hunger-induced taste modification. *Nat. Commun.* 10:4560. doi: 10.1038/s41467-019-12478-x
- Garcia, A., Coss, A., Luis-Islas, J., Puron-Sierra, L., Luna, M., Villavicencio, M., et al. (2020). Lateral Hypothalamic GABAergic neurons encode and potentiate sucrose's palatability. *bioRxiv [Preprint]*. doi: 10.1101/2020.06.30.180646
- Giardino, W. J., Eban-Rothschild, A., Christoffel, D. J., Li, S.-B., Malenka, R. C., and de Lecea, L. (2018). Parallel circuits from the bed nuclei of stria terminalis to the lateral hypothalamus drive opposing emotional states. *Nat. Neurosci.* 21, 1084–1095. doi: 10.1038/s41593-018-0198-x
- Gigante, E. D., Benaliouad, F., Zamora-Olivencia, V., and Wise, R. A. (2016). Optogenetic activation of a lateral hypothalamic-ventral tegmental drive-reward pathway. *PLoS ONE* 11:e0158885. doi: 10.1371/journal.pone.0158885
- Glendinning, J. I., Chyou, S., Lin, I., Onishi, M., Patel, P., and Zheng, K. H. (2005). Initial licking responses of mice to sweeteners: effects of tas1r3 polymorphisms. *Chem. Senses* 30, 601–614. doi: 10.1093/chemse/bji054
- Grill, H. J., and Berridge, K. C. (1985). "Taste reactivity as a measure of the neural control of palatability," in *Progress in Psychobiology and Physiological Psychology* (Orlando, FL: Academic Press), 1–54.
- Gutierrez, R., Carmona, J. M., Nicoletis, M. A. L., and Simon, S. A. (2006). Orbitofrontal ensemble activity monitors licking and distinguishes among natural rewards. *J. Neurophysiol.* 95, 119–133. doi: 10.1152/jn.00467.2005
- Gutierrez, R., Fonseca, E., and Simon, S. A. (2020). The neuroscience of sugars in taste, gut-reward, feeding circuits, and obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 3469–3502. doi: 10.1007/s00018-020-03458-2
- Gutierrez, R., Simon, S. A., and Nicoletis, M. A. (2010). Licking-induced synchrony in the taste-reward circuit improves cue discrimination during learning. *J. Neurosci.* 30, 287–303. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0855-09.2010
- Jennings, J. H., Rizzi, G., Stamatakis, A. M., Ung, R. L., and Stuber, G. D. (2013). The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science* 341, 1517–1521. doi: 10.1126/science.1241812
- Jennings, J. H., Ung, R. L., Resendez, S. L., Stamatakis, A. M., Taylor, J. G., Huang, J., et al. (2015). Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell* 160, 516–527. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.026
- Karádi, Z., Oomura, Y., Nishino, H., Scott, T. R., Lénárd, L., and Aou, S. (1992). Responses of lateral hypothalamic glucose-sensitive and glucose-insensitive neurons to chemical stimuli in behaving rhesus monkeys. *J. Neurophysiol.* 67, 389–400. doi: 10.1152/jn.1992.67.2.389
- Kurt, G., Woodworth, H. L., Fowler, S., Bugescu, R., and Leininger, G. M. (2019). Activation of lateral hypothalamic area neurotensin-expressing neurons promotes drinking. *Neuropharmacology* 154, 13–21. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.09.038
- Leininger, G. M., Jo, Y.-H., Leshan, R. L., Louis, G. W., Yang, H., Barrera, J. G., et al. (2009). Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab.* 10, 89–98. doi: 10.1016/j.cmet.2009.06.011
- Li, J. X., Yoshida, T., Monk, K. J., and Katz, D. B. (2013). Lateral hypothalamus contains two types of palatability-related taste responses with distinct dynamics. *J. Neurosci.* 33, 9462–9473. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3935-12.2013
- Marino, R. A. M., McDevitt, R. A., Gantz, S. C., Shen, H., Pignatelli, M., Xin, W., et al. (2020). Control of food approach and eating by a GABAergic projection from lateral hypothalamus to dorsal pons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* doi: 10.1073/pnas.1909340117
- Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K. M., Abe, T., Murthy, V. N., Mathis, M. W., et al. (2018). DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat. Neurosci.* 21, 1281–1289. doi: 10.1038/s41593-018-0209-y
- Mendelson, J. (1967). Lateral hypothalamic stimulation in satiated rats: the rewarding effects of self-induced drinking. *Science* 157, 1077–1079. doi: 10.1126/science.157.3792.1077
- Mickelsen, L. E., Bolisetty, M., Chimileski, B. R., Fujita, A., Beltrami, E. J., Costanzo, J. T., et al. (2019). Single-cell transcriptomic analysis of the lateral hypothalamic area reveals molecularly distinct populations of inhibitory and excitatory neurons. *Nat. Neurosci.* 22, 642–656. doi: 10.1038/s41593-019-0349-8
- Mogenson, G. J., and Stevenson, J. A. (1967). Drinking induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Exp. Neurol.* 17, 119–127. doi: 10.1016/0014-4886(67)90139-2
- Nath, T., Mathis, A., Chen, A. C., Patel, A., Bethge, M., and Mathis, M. W. (2019). Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nat. Protoc.* 14, 2152–2176. doi: 10.1038/s41596-019-0176-0
- Navarro, M., Olney, J. J., Burnham, N. W., Mazzone, C. M., Lowery-Gionta, E. G., Pleil, K. E., et al. (2016). Lateral hypothalamic GABAergic neurons modulate consummatory behaviors regardless of the caloric content or biological relevance of the consumed stimuli. *Neuropsychopharmacology* 41, 1505–1512. doi: 10.1038/npp.2015.304
- Nieh, E. H., Matthews, G. A., Allsop, S. A., Presbrey, K. N., Leppla, C. A., Wichmann, R., et al. (2015). Decoding neural circuits that control compulsive sucrose seeking. *Cell* 160, 528–541. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.003
- Nieh, E. H., Vander Weele, C. M., Matthews, G. A., Presbrey, K. N., Wichmann, R., Leppla, C. A., et al. (2016). Inhibitory input from the lateral hypothalamus to the ventral tegmental area disinhibits dopamine neurons and promotes behavioral activation. *Neuron* 90, 1286–1298. doi: 10.1016/j.neuron.2016.04.035
- Norgren, R. (1970). Gustatory responses in the hypothalamus. *Brain Res.* 21, 63–77. doi: 10.1016/0006-8993(70)90021-1
- O'Connor, E. C., Kremer, Y., Lefort, S., Harada, M., Pascoli, V., Rohner, C., et al. (2015). Accumbal D1R neurons projecting to lateral hypothalamus authorize feeding. *Neuron* 88, 553–564. doi: 10.1016/j.neuron.2015.09.038
- Olds, J., and Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 47, 419–427. doi: 10.1037/h0058775
- Ono, T., Nakamura, K., Nishijo, H., and Fukuda, M. (1986). Hypothalamic neuron involvement in integration of reward, aversion, and cue signals. *J. Neurophysiol.* 56, 63–79. doi: 10.1152/jn.1986.56.1.63
- Phillips, A. G., and Mogenson, G. J. (1968). Effects of taste on self-stimulation and induced drinking. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 66, 654–660. doi: 10.1037/h0026523
- Poschel, B. P. H. (1968). Do biological reinforcers act via the self-stimulation areas of the brain? *Physiol. Behav.* 3, 53–60. doi: 10.1016/0031-9384(68)90031-0

- Qualls-Creekmore, E., Yu, S., Francois, M., Hoang, J., Huesing, C., Bruce-Keller, A., et al. (2017). Galanin-Expressing GABA neurons in the lateral hypothalamus modulate food reward and noncompulsive locomotion. *J. Neurosci.* 37, 6053–6065. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0155-17.2017
- Schwartzbaum, J. S. (1988). Electrophysiology of taste, feeding and reward in lateral hypothalamus of rabbit. *Physiol. Behav.* 44, 507–526. doi: 10.1016/0031-9384(88)90313-7
- Sclafani, A. (1991). “The hedonics of sugar and starch,” in *The Hedonics of Taste* (New York, NY: Lawrence Erlbaum Associates, Inc), 59–87.
- Sharpe, M. J., Marchant, N. J., Whitaker, L. R., Richie, C. T., Zhang, Y. J., Campbell, E. J., et al. (2017). Lateral hypothalamic gabaergic neurons encode reward predictions that are relayed to the ventral tegmental area to regulate learning. *Curr. Biol.* 27, 2089–2100.e5. doi: 10.1016/j.cub.2017.06.024
- Simons, R. B. (2004). “Anatomical substrates of hypothalamic integration,” in *The Rat Nervous System* (Burlington: Academic Press).
- Spector, A. C., Klumpp, P. A., and Kaplan, J. M. (1998). Analytical issues in the evaluation of food deprivation and sucrose concentration effects on the microstructure of licking behavior in the rat. *Behav. Neurosci.* 112, 678–694.
- Stuber, G. D., and Wise, R. A. (2016). Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat. Neurosci.* 19, 198–205. doi: 10.1038/nn.4220
- Teitelbaum, P., and Epstein, A. N. (1962). The lateral hypothalamic syndrome: recovery of feeding and drinking after lateral hypothalamic lesions. *Psychol. Rev.* 69, 74–90.
- Thoeni, S., Loureiro, M., O'Connor, E. C., and Lüscher, C. (2020). Depression of accumbal to lateral hypothalamic synapses gates overeating. *Neuron* 107, 158–172.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2020.03.029
- Ting, J. T., and Feng, G. (2013). Development of transgenic animals for optogenetic manipulation of mammalian nervous system function: progress and prospects for behavioral neuroscience. *Behav. Brain Res.* 255, 3–18. doi: 10.1016/j.bbr.2013.02.037
- Urstadt, K. R., and Berridge, K. C. (2020). Optogenetic mapping of feeding and self-stimulation within the lateral hypothalamus of the rat. *PLoS ONE* 15:e0224301. doi: 10.1371/journal.pone.0224301
- Valenstein, E. S., and Cox, V. C. (1970). Influence of hunger, thirst, and previous experience in the test chamber on stimulus-bound eating and drinking. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 70, 189–199. doi: 10.1037/h0028708
- Valenstein, E. S., Cox, V. C., and Kakolewski, J. W. (1968). Modification of motivated behavior elicited by electrical stimulation of the hypothalamus. *Science* 159, 1119–1121. doi: 10.1126/science.159.3819.1119
- Valenstein, E. S., and Phillips, A. G. (1970). Stimulus-bound eating and deprivation from prior contact with food pellets. *Physiol. Behav.* 5, 279–282. doi: 10.1016/0031-9384(70)90099-5
- Villavicencio, M., Moreno, M. G., Simon, S. A., and Gutierrez, R. (2018). Encoding of sucrose's palatability in the nucleus accumbens shell and its modulation by exteroceptive auditory cues. *Front. Neurosci.* 12:265. doi: 10.3389/fnins.2018.00265
- Yamamoto, T., Matsuo, R., Kiyomitsu, Y., and Kitamura, R. (1989). Response properties of lateral hypothalamic neurons during ingestive behavior with special reference to licking of various taste solutions. *Brain Res.* 481, 286–297. doi: 10.1016/0006-8993(89)90805-6
- Zeng, H., and Madisen, L. (2012). Mouse transgenic approaches in optogenetics. *Prog. Brain Res.* 196, 193–213. doi: 10.1016/B978-0-444-59426-6.00010-0
- Zhang, X., and van den Pol, A. N. (2017). Rapid binge-like eating and body weight gain driven by zona incerta GABA neuron activation. *Science* 356, 853–859. doi: 10.1126/science.aam7100
- Zhao, S., Ting, J. T., Atallah, H. E., Qiu, L., Tan, J., Gloss, B., et al. (2011). Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nat. Methods* 8, 745–752. doi: 10.1038/nmeth.1668
- Zocchi, D., Wennemuth, G., and Oka, Y. (2017). The cellular mechanism for water detection in the mammalian taste system. *Nat. Neurosci.* 20, 927–933. doi: 10.1038/nn.4575

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Garcia, Coss, Luis-Islas, Puron-Sierra, Luna, Villavicencio and Gutierrez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.