



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**“CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES REFORZANTES DE DISTINTOS
MACRONUTRIENTES Y SUS COMBINACIONES: UNA APROXIMACIÓN
NEUROCONDUCTUAL”**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

RAFAEL SANDOVAL RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. LUIS ALBERTO TELLEZ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DR. RANIER GUTIÉRREZ MENDOZA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, CINVESTAV



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología de la Conducta Motivada (A-11) del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutela del Dr. Luis A. Tellez y financiado con el apoyo del proyecto PAPIIT-IA200819 y la beca nacional de posgrado CONACyT (CVU:1004742). Además, se agradece la asistencia técnica del Biol. Andrés Falcón Alcántara, y a los integrantes del comité tutor por sus comentarios y sugerencias a lo largo del desarrollo del presente trabajo.

*Para Imelda, mi abuela paterna,
a quien le hubiese encantado
saber de esta aventura.*

La naturaleza de las necesidades humanas, el que se originen, por ejemplo, en el estómago o en la fantasía, en nada modifica el problema.

-Karl Marx

Abreviaturas

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
3. Justificación.....	8
4. Hipótesis.....	8
5. Objetivos.....	9
5.1 General.....	9
5.2 Particulares.....	9
6. Sujetos.....	9
7. Materiales y métodos.....	10
7.1 Procedimientos quirúrgicos.....	10
7.1.1 Implantación de cánula para microdiálisis.....	10
7.1.2 Implantación de catéter intragástrico.....	11
7.1.3 Cuidados postquirúrgicos.....	11
7.2 Estímulos y cálculo de densidades calóricas.....	11
7.3 Aparatos conductuales.....	12
7.4 Sesiones conductuales.....	12
7.4.1 Regulación de la ingesta calórica.....	12
7.4.2 Programa de razón progresiva.....	13
7.4.3 Evaluación de preferencias.....	13
7.4.4 Medición de saciedad inducida por pre-carga.....	15
7.5 Medición de liberación dopaminérgica extracelular durante infusiones pasivas.....	15
7.6 Análisis de datos.....	15
8. Resultados.....	16
8.1 Regulación de la ingesta calórica.....	16
8.2 Programa de razón progresiva.....	18
8.3 Condicionamiento sabor-nutriente.....	21
8.4 Influencia de las claves orogustativas sobre la ingesta.....	24
8.5 Saciedad inducida por los nutrientes y efectos aditivos de la mezcla sobre la ingesta.....	27
8.6 Liberación dopaminérgica en el estriado dorsal y ventral.....	30
9. Discusión y conclusiones.....	31
Referencias.....	35

Término	Abreviatura
Área tegmental ventral	VTA
Dopamina	DA
Estriado dorsal	DS
Estriado ventral	VS
Hormona concentradora de melanina	MCH
Hormona estimulante de melanocitos	MSH
Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos	NIH
Intraperitoneal	i.p
Neuropéptido Y	NPY
Núcleo accumbens	NAc
Núcleo arqueado del hipotálamo	ARC
Núcleo paraventricular del hipotálamo	PVN
Programa de reforzamiento de razón progresiva	PR
Proopiomelanocortina	POMC
Proteína similar a la agouti	AGRP
Punto de quiebre	PQ
Receptores activados por proliferadores de peroxisomas α	PPAR α
<i>Substantia nigra pars compacta</i>	SNc
Transcrito regulado por anfetamina y cocaína	CART

1. Introducción

A partir de la tendencia observada en diversas especies por mantener su peso corporal mediante el consumo adaptativo de calorías (Adolph, 1947; Rozin & Mayer, 1961; Thomas & Mayer, 1968; Spiegel, 1974; McHugh & Morgan, 1975; Denbow, 1999; Turner, Leslie, Hallahan & Cooney, 2012), se ha identificado un sistema regulador homeostático sensible al valor energético de los alimentos, responsable de ajustar la ingesta a las necesidades metabólicas en curso (Tulloch, Murray, Vaicekonyte & Avena, 2015). No obstante, la cocción, preservación e industrialización de los alimentos, ha traído consigo la creación de una variedad de mezclas y presentaciones distintas al medio en el cual nuestra especie evolucionó (Difeliceantonio, 2018). Tal es el caso de los alimentos altamente procesados, palatables, densos en energía, bajos en fibra y con altas cantidades de grasas y azúcares presentes en la cultura occidental, acuñado por algunos autores bajo el término de “western diet” (Cordain, et al., 2005; Bortolin et al., 2017).

Se ha propuesto que la distribución masiva, el fácil acceso y el bajo precio de tales alimentos le han concedido primacía a otro sistema distinto al homeostático: el sistema hedónico, el cual es responsivo a las propiedades sensoriales apetitivas de los alimentos (Saper, Chou & Elmquist, 2002; Rossi & Stuber, 2018). Aunado a la posibilidad de mantener hábitos en extremo sedentarios, se infiere que la dominancia de este sistema sobre la conducta alimentaria ha traído consigo el alza de enfermedades crónicas no transmisibles relacionadas con el sobrepeso y la obesidad (e.g. diabetes tipo II, enfermedades coronarias y cerebrovasculares, osteoartritis, entre otras); catalogándola como una epidemia mundial en las últimas décadas (Mitchell, Catenacci, Wyatt & Hill, 2011).

Tan sólo en México, a partir de los años ochenta y coincidiendo con el decurso del Tratado de Libre Comercio (Loría & Salas, 2014), los niveles de sobrepeso y obesidad se han triplicado (Villa, Escobedo & Méndez-Sánchez, 2004). Estudios recientes posicionan en primer lugar en diabetes y segundo lugar en obesidad – a nivel mundial – a la población adulta del país (OECD, 2016). Por si fuera poco, México también ha sido catalogado recientemente por la Organización Mundial de la Salud (2016) como el país

con mayor prevalencia de obesidad infantil a nivel global. Lo anterior pese a que México es parte de los países latinoamericanos que, desde inicios de siglo, han llevado a cabo esfuerzos por reducir los problemas de salud relacionados al sobrepeso y obesidad de sus poblaciones (Caballero, Vorkoper, Anand & Rivera, 2017), y que cuenta con gravámenes tanto para alimentos no esenciales y densamente energéticos, como en bebidas altamente azucaradas desde el año 2014 (Batis, Rivera, Popkin, & Taillie, 2016). Sin embargo, el alza en los índices de obesidad, tanto en México como en el mundo, continúa acentuándose (Jaacks et al., 2019; Blüher, 2019), de manera que se ha prolongado la discusión sobre las formas en que debe abordarse tal problemática de salud, y vigorizado las razones para reevaluar la concepción hedonista sobre la alimentación contemporánea.

Con base en diversos estudios, una propuesta distinta sugiere que la estimulación gustativa, olfacción retronasal y somatosensación oral, resultan ser transitorias – inclusive prescindibles– para la determinación de las propiedades reforzantes de los alimentos, tomando como elemento cardinal la asimilación inconsciente o subliminal del contenido nutrimental a partir de vías que comunican sensores nutrimentales en el tracto gastrointestinal con el sistema de recompensa ubicado en áreas subcorticales del cerebro (Araujo, Schatzker & Small, 2019).

Siguiendo la línea inaugurada por el modelo de Holman (1969), se ha encontrado que infusiones intragástricas de macronutrientes, incluso en ausencia de claves orogustativas, son suficientes para regular el reforzamiento y la ingesta de alimentos (Ferreira, Tellez, Ren, Yeckel, & Araujo, 2012; Tellez et al., 2013a; Kleberg, et al., 2015; Sclafani & Ackroff, 2016). Lo anterior, concomitante a una liberación dopaminérgica diferenciada en el estriado; área que se especula es un relieve crucial en la vía comunicante entre señales fisiológicas viscerales y el sistema nervioso central (Araujo, Ferreira, Tellez, Ren, & Yeckel, 2012; Tellez et al., 2016; Han et al, 2018; Araujo, Schatzker & Small, 2019).

El presente trabajo pretende ser la continuación natural de dichos resultados mediante la contrastación de las propiedades reforzantes de infusiones intragástricas de carbohidratos y lípidos presentadas tanto de manera individual como combinada. Las

diferencias encontradas extienden el reciente reconocimiento de la “apetitividad” proveniente de la asimilación de nutrientes en el tracto digestivo, demostrando que la composición dietética inaugurada en el occidente (y altamente distribuido en el mundo), tienen efectos aditivos en el sistema dopaminérgico de recompensa y, por ende, en la conducta.

2. Antecedentes

Aunque el sistema homeostático y hedónico no son mutuamente excluyentes (Rossi & Stuber, 2018), es frecuente la postulación de que el ambiente obesogénico contemporáneo le concede primacía al sistema responsivo a las propiedades sensoriales apetitivas de los alimentos, dando como resultado un “bloqueo” de las señales periféricas de retroalimentación negativa que modulan la ingesta homeostática (Araujo, Schatzker & Small, 2019).

El sistema homeostático consiste en señales hormonales provenientes de diferentes tejidos periféricos que “comunican” a varios núcleos hipotalámicos sobre el estado metabólico del organismo. En particular, el núcleo arqueado del hipotálamo (ARC), contiene dos grupos neuronales que expresan receptores para varias de estas hormonas periféricas. Uno de estos grupos expresa a los neuropéptidos proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por anfetamina y cocaína (CART), y es activado por las hormonas leptina (originada del tejido adiposo) y por la insulina (proveniente de las células β pancreáticas). La POMC es hendida en la hormona estimulante de melanocitos (MSH) y es liberada hacia el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), en donde actúa como un agonista mediante su unión a los receptores tipo 3 y 4 a melanocortinas promoviendo conductas anorexigénicas. En contraste, otra subpoblación de neuronas del ARC expresa el neuropéptido Y (NPY) y la proteína similar a la agouti (AGRP), que se liberan en respuesta a la hormona grelina proveniente del estómago. En consecuencia, la AGRP bloquea a los receptores de melanocortinas y la señalización de NPY promueve la aparición de conductas orexigénicas o de “hambre” (Tulloch, Murray, Vaicekonyte & Avena, 2015; Rossi & Stuber, 2018).

Respecto al sistema hedónico, se considera que los circuitos dopaminérgicos y opioides están implicados en los aspectos motivantes o recompensantes de los alimentos. En lo que a los circuitos dopaminérgicos concierne, y en los cuales el presente trabajo dirige su interés, se han identificado dos vías. Por un lado, se tiene a la vía mesolímbica/mesocortical, donde la dopamina es sintetizada por las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA), la cual envía sus proyecciones a distintas regiones tanto límbicas como corticales. Una de estas regiones límbicas es el núcleo accumbens (NAc), ubicado en la porción ventral del estriado (VS) e involucrado en la modulación de distintos procesos de reforzamiento, tales como el llamado aprendizaje relacionado a recompensas. Asimismo, se identifica a la vía nigroestriatal, donde la dopamina es sintetizada en la *substantia nigra pars compacta* (SNc) que manda sus proyecciones al núcleo caudado y putamen del estriado dorsal (DS). Esta última vía, aparte de estar ampliamente involucrada en la iniciación y modulación del movimiento, recientemente se ha propuesto como una integradora del valor recompensante de señales periféricas que informan sobre la presencia de nutrientes en el tracto digestivo (Araujo, Ferreira, Tellez, Ren, & Yeckel, 2012; Araujo, Schatzker & Small, 2019), acuñados bajo el término de apetitividad (“*appetition*”, en inglés), y que se distinguen de aquellas otras señales periféricas relacionadas con la saciedad (Sclafani, 2013).

A lo largo de los años, el paradigma del condicionamiento sabor-nutriente ha demostrado la relevancia del contenido calórico y nutrimental en el reforzamiento (Holman, 1969; Sclafani, 2001). Los animales suelen preferir soluciones asociadas con contenido nutritivo, tal como la sacarosa, sobre distintos edulcorantes, una vez que se les presentan de manera simultánea. Un caso ilustrativo de lo anterior es el de los ratones transgénicos *trpm5*^{-/-}, que despliegan preferencias para la sacarosa, así como un aumento en los niveles dopaminérgicos en el VS durante su consumo, aun cuando carecen del canal iónico TRPM5, responsable de la transducción de sabores dulces (Araujo et al., 2008). Estos resultados apuntan a que, independientemente de las claves orogustativas, distintas señales periféricas “sensan” el contenido nutrimental e influyen sobre en el sistema de recompensa, modulando y condicionando eficientemente la conducta de los animales.

Ferreira et al. (2012), extendió el papel de estas señales periféricas en el reforzamiento. Demostrando que ratones entrenados a activar infusiones intragástricas de grasa (Intralipid) por medio de lengüeteos en seco, fueron capaces de regular el número de infusiones en función de la densidad calórica, observando una relación entre la liberación dopaminérgica en el estriado con las calorías ingeridas. Otra ampliación de estos efectos se encuentra en Tellez et al. (2013a), en donde se observaron analogías entre los estudios sobre la auto-administración dosis dependiente de psicoestimulantes con las infusiones de grasa. Un decremento en la densidad calórica fue brevemente compensado por un incremento en el número de operantes (lengüeteos en seco), y mantenidos durante la sesión. Además, en sesiones de extinción, los animales respondieron con un incremento en la tasa de respuesta, y mostraron un mayor punto de quiebre para infusiones de grasa en comparación con beber esa misma emulsión en un programa de razón progresiva. Ambos efectos fueron observados tanto en animales privados como no privados de alimento. Por último, durante los protocolos de extinción, los niveles de dopamina en el estriado dorsal decrecieron significativamente y fueron recuperados a niveles casi idénticos a los observados en fases anteriores una vez que se reinstauraron las infusiones de grasa.

Puesto que el aumento en la liberación dopaminérgica estriatal es un efecto recurrente en estos estudios, resulta importante esclarecer los papeles relativos de las porciones dorsal (DS) y ventral (VS) de este sistema en la conducta de ingesta. Se ha encontrado que las señales gustativas y nutritivas de los alimentos modulan de manera separada estos circuitos (Tellez et al., 2016). Por ejemplo, el VS responde igualmente ante el lengüeteo de sucralosa acoplado a infusiones intragástricas de glucosa o sucralosa, mientras que el DS únicamente responde a infusiones de glucosa. Interesantemente, también se encontró que al amargar la bebida de sucralosa (acoplado su ingesta a infusiones intragástricas de glucosa), la liberación de dopamina en el VS decayó, mientras que incrementó en el DS y se mantuvo por arriba de los niveles basales. Un último hallazgo de notar en este estudio es que el reemplazo de infusiones de glucosa por la activación optogenética de neuronas espinosas medianas que expresan el receptor D1 en el DS aumentó el número de lengüeteos a la sucralosa, y canceló los efectos supresivos de su adulteración con denatonium. En cambio, aunque

la activación de neuronas D1 del VS también aumentó los lengüeteos a sucralosa, fue incapaz de suprimir la aversión inducida por dicha sustancia.

Actualmente, se discute la identidad de las señales metabólicas, así como de los sensores periféricos (Figura 1), que comunican la presencia de nutrientes al sistema dopaminérgico (Araujo, Schatzker & Small, 2019; Small & DiFeliceantonio, 2019). Respecto a los carbohidratos, se sabe que el aumento en los niveles dopaminérgicos estriatales se promueve con infusiones de glucosa en la vena porta, pero no con infusiones de análogos no metabolizables (Zhang et al., 2018). De igual forma, la administración de agentes antimetabólicos de la glucosa atenúan los niveles dopaminérgicos en el DS, y reducen la ingesta de glucosa (Tellez et al., 2013c). Ambos resultados apuntan a que esta señal postingestiva, debido a su rapidez, no es de naturaleza endocrina sino neural, y que está directamente relacionada con la metabolización de este macronutriente. Una serie de observaciones relevantes para este último punto son aquellas hechas por Russek a mediados del siglo pasado, que desde entonces proponía la existencia de glucoreceptores hepáticos activados por piruvato encargados de señalar la presencia de glucosa al cerebro (Russek, 1963).

Asimismo, se cree que algunas de las señales postingestivas para los lípidos se originan por un mecanismo que involucra a los receptores activados por proliferadores de peroxisomas α (PPAR α), que se expresan en los enterocitos de los segmentos duodenales y del yeyuno en el intestino delgado, y que activan a neuronas sensoriales del nervio vago con aferentes hacia el ganglio nodoso derecho, subiendo hasta la SNc y el DS (Tellez et al., 2013b; Hankir et al., 2017; Han et al., 2018). Incluso, se ha demostrado que vagotomías sub-diafragmáticas totales imposibilitan el adecuado condicionamiento a lípidos y algunos aminoácidos, lo cual no sucede para los carbohidratos (Sclafani & Lucas, 1996; Qu, Han, Niu, Tong & Araujo, 2019).

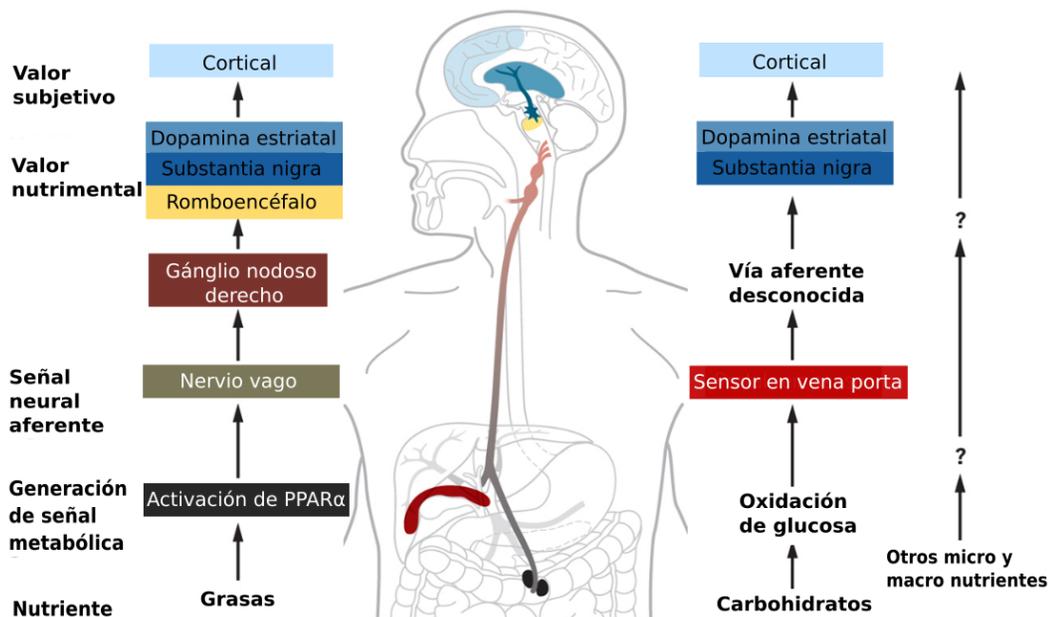


Figura 1. Diagrama de los sensores candidatos y posibles vías de los efectos postingestivos reforzantes provenientes de carbohidratos y lípidos. Adaptado de Araujo, Schatzker & Small, 2019.

Por otra parte, es poco lo que se sabe de la posible sinergia de las señales postingestivas apetitivas ante la asimilación simultánea de ambos macronutrientes sobre el sistema de recompensa (Araujo, Schatzker & Small, 2019). Un estudio reciente con resonancia magnética funcional en humanos reveló que sus participantes estuvieron dispuestos a pagar más por fotos mostrando alimentos que contenían grasa y carbohidratos, en comparación con fotos de alimentos isocalóricos, igualmente gustados y familiares de estos nutrientes por separado. De igual forma, se describió una red de regiones cerebrales que consisten en el caudado, putamen y tálamo mediodorsal, cuya actividad se correlacionó con este efecto (Difeliceantonio et al., 2018). Tales resultados sugieren que la grasa y los carbohidratos interactúan para potenciar sus valores recompensantes individuales, dando como resultado una preferencia por estímulos asociados a su combinación. El presente trabajo evaluó dichas propiedades en un modelo animal, mediante una batería de protocolos conductuales, así como la caracterización de sus efectos sobre los niveles dopaminérgicos en el estriado, encontrando que la combinación de ambos nutrientes modifica la conducta de ingesta y la liberación de dopamina.

3. Justificación

Aún es difuso si el consumo de calorías depende de la fuente nutrimental o de las claves orogustativas de los alimentos; y si los efectos postingestivos de estos nutrientes tienen propiedades reforzantes particulares. Pese a que se conoce a profundidad el establecimiento de preferencias hacia soluciones asociadas con contenido calórico, aún permanece inexplorado si existe un efecto sinérgico en la preferencia a estímulos asociados a las calorías provenientes de una mezcla de carbohidratos y lípidos, representativa de la dieta occidental.

Aunque se ha reportado que los circuitos del estriado responden a la presencia de carbohidratos y lípidos en el tracto digestivo, aún se desconoce si existe un efecto sinérgico en la liberación dopaminérgica en estos circuitos ante infusiones de calorías provenientes de la mezcla de estos dos nutrientes.

La exploración de dichos efectos en las esferas conductuales y neurobiológicas pudiese dar cuenta de los patrones alimenticios observados en la sociedad contemporánea que hasta ahora han sido parcialmente explicados por un supuesto apoderamiento de las propiedades apetitivas sensoriales de los alimentos sobre la ingesta.

4. Hipótesis

- Cada fuente nutrimental tiene una ingesta calórica particular que es independiente de las claves orogustativas y la densidad calórica de las infusiones.
- Cada fuente nutrimental presenta propiedades reforzantes particulares, independientes de las claves orogustativas y la densidad calórica, relacionadas con los efectos postingestivos de los nutrientes.
- La identidad nutrimental, no las calorías ingeridas ni las claves orogustativas, determinan las preferencias alimentarias.

- En condiciones isocalóricas, la ingesta de la mezcla de carbohidratos y lípidos induce en el estriado una liberación dopaminérgica distinta a la observada cuando se ingieren estos macronutrientes de manera individual.

5. Objetivos

5.1 General

Contrastar en ratones C57BL/6J, las respuestas conductuales y la liberación dopaminérgica en el estriado ante calorías provenientes de tres distintas identidades nutrimentales, definidas como soluciones isocalóricas de lípidos, carbohidratos y su combinación.

5.2 Particulares

- Evaluar la ingesta calórica en función de la identidad nutrimental y con independencia de las claves orogustativas.
- Estimar el “valor específico” de reforzamiento para las calorías provenientes de distintas identidades nutrimentales.
- Caracterizar la formación de preferencias alimenticias derivadas de los efectos postingestivos de las distintas identidades nutrimentales.
- Contrastar los niveles de dopamina extracelular en el estriado dorsal y ventral en respuesta a infusiones pasivas de carbohidratos y lípidos en su conjunto y de manera individual.

6. Sujetos

Se utilizaron un total de 20 ratones macho C57BL/GJ de 12 a 17 semanas de edad al comienzo de los experimentos. Los animales fueron alojados de manera individual bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12:12, bajo un régimen de restricción del alimento (manteniendo su consumo al 90% de su ingesta diaria de “chow” antes del inicio de los protocolos experimentales). Los experimentos fueron realizados en la fase lumínica del día y conducidos de acuerdo con las normas de uso y manejo de animales de laboratorio

del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM; cumpliendo con los lineamientos del cuidado y manejo de la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) clave NOM-062-ZOO-1999, y con los criterios de ética para el uso de animales de investigación según los estándares internacionales de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH).

7. Materiales y métodos

7.1 Procedimientos quirúrgicos

7.1.1 Implantación de cánula para microdiálisis

Se indujo anestesia por medio de una inyección intraperitoneal (i.p) de ketamina/xilacina (100/15 mg/kg) y se posicionó los animales en un aparato estereotáxico bajo un flujo constante de 1% de isoflurano. En un hemisferio, se perforó una craneotomía circular en la región dorsal del estriado con coordenadas respecto a bregma AP = 1.0mm y ML = ± 1.7 mm, con la implantación de una cánula guía (DV = -2.0mm desde la superficie del cráneo). Asimismo, del lado contralateral, se perforó una segunda craneotomía en la región del estriado ventral con coordenadas respecto a bregma AP = 1.5mm y ML = ± 0.8 mm, con la implantación de una cánula guía (DV = -3.7mm desde la superficie del cráneo). Finalmente, las cánulas fueron fijadas al cráneo con resina acrílica y metacrilato de metilo.

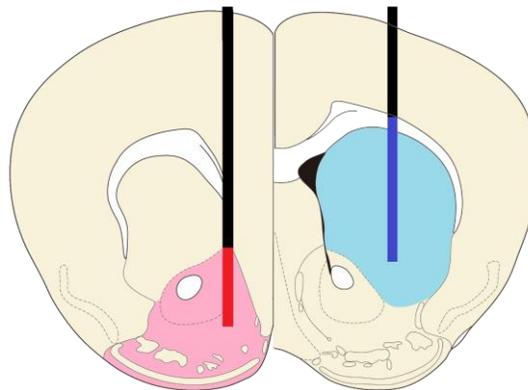


Figura 2. Representación correspondiente a la porción ventral (**rojo**) y dorsal (**azul**) del estriado en ratones, y la posición de las sondas de microdiálisis.

7.1.2 Implantación de catéter intragástrico

Una vez que los animales fueron anestesiados (inyección i.p de ketamina/xilacina 100/15 mg/kg), se realizó una incisión en la línea media del abdomen. El estómago fue exteriorizado y se suturó un cuadrante en la región no glandular en la cual se insertó un tubo de MicroRenathane® justo en la porción medial. La sutura se apretó alrededor del tubo para luego ser tunelizado vía subcutánea al dorso del animal mediante un pequeño agujero hecho en el músculo abdominal. Posteriormente, se hizo una pequeña incisión dorsal entre las placas de los hombros para permitir la exteriorización del catéter. Concluido lo anterior, las incisiones abdominales fueron suturadas y desinfectadas.

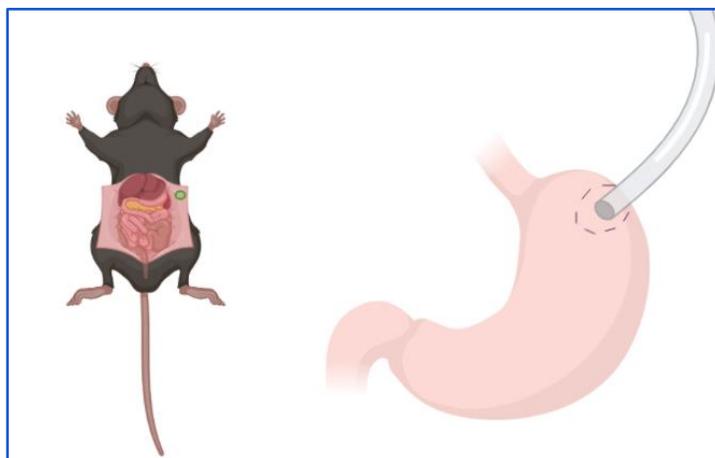


Figura 3. Esquematación de la implantación del catéter intragástrico. Las líneas punteadas indican la posición de las suturas realizadas para ajustar el tubo en el estómago el cual será canalizado hacia el dorso para permitir su exteriorización

7.1.3 Cuidados postquirúrgicos

Aproximadamente 40 minutos después de la cirugía, se les administró a los animales gentamicina i.p. (5 mg/kg). Durante las semanas de recuperación, los animales fueron monitoreados cada 12 horas con la finalidad de detectar señales de dolor o morbilidad.

7.2 Estímulos y cálculo de densidades calóricas

Se prepararon 3 grupos de soluciones isocalóricas de: a) glucosa (Sigma, USA), b) Intralipid (Sigma, USA) y c) una mezcla 50:50 (V/V) de ambos. Estas soluciones fueron preparadas a partir de la misma solución emulsificadora utilizada en el Intralipid, hecha

a base de 1.2% fosfolípidos, 2.25% glicerol y agua. Las densidades calóricas empleadas fueron 0.5, 1 y 2 kcal/mL. La solución asociada a las infusiones durante las sesiones de regulación de la ingesta calórica y en los programas de reforzamiento progresivo, fue sucralosa 2mM (Sigma, USA). Mientras que para las sesiones de condicionamiento sabor-nutriente, se utilizaron soluciones de 3 distintos sabores (arándano, piña y naranja) de la marca Zuko® siguiendo las sugerencias de preparación del fabricante (0.5g x 1000mL).

7.3 Aparatos conductuales

Todos los experimentos conductuales fueron llevados a cabo en una cámara experimental personalizada de tres módulos de estímulo respuesta ubicados en una misma pared operativa. Las infusiones intragástricas fueron activadas por el lengüeteo de los animales a un sorbete conectado a un detector de contacto que permitió la medición de las respuestas con una resolución de 10 ms. Las infusiones estuvieron controladas por un software generador de pulsos TTL en respuesta a la detección de lengüeteos, cada infusión tuvo una duración de 3 segundos a un ritmo de 0.6 mL/min (30µl por infusión); aquellas respuestas emitidas mientras una infusión ocurría no tuvieron consecuencias programadas (*i.e.* no generaron una nueva infusión). Todas las respuestas fueron registradas y almacenadas para su posterior análisis.

7.4 Sesiones conductuales

7.4.1 Regulación de la ingesta calórica

Un total de 9 ratones fueron expuestos a nueve sesiones de 1 hora para cada una de las densidades calóricas empleadas, en donde el lengüeteo de un sorbete con sucralosa 2mM (ubicado en la zona central de la pared derecha) estuvo asociado a la activación de las infusiones de los distintos macronutrientes. Estas sesiones estuvieron bajo un programa de reforzamiento continuo. En estas sesiones el sabor se mantuvo constante, pero la identidad nutricional de las soluciones de infusión varió entre sesiones. La presentación de los distintos macronutrientes fue aleatoria a través de los días y animales para controlar por el orden de exposición.

7.4.2 Programa de reforzamiento de razón progresiva

Los mismos sujetos experimentales fueron expuestos a sesiones de 1 hora en donde se replicaron las mismas condiciones que para las sesiones anteriores, con la excepción de que las respuestas operantes estuvieron bajo un programa de razón progresiva aritmética de 9 (Figura 4) de fórmula:

$$\text{requerimiento de respuesta acumulado} = a + (n-1)d$$

donde *a* corresponde a 1 (equivalente al primer término de la secuencia para este programa), *n* al número de infusiones acumuladas y *d* a la progresión (equivalente a 9 en este programa).

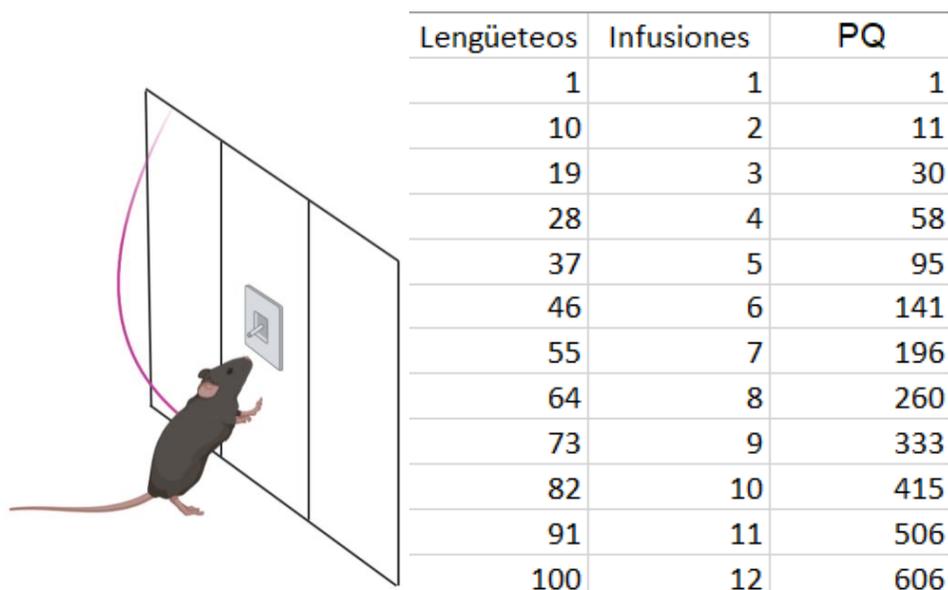


Figura 4. Programa de razón progresiva aritmética de 9 (PR9). Se entrenó a los ratones (*n* = 9) a beber de un único bebedero con sucralosa 2mM ubicado en la pared derecha de la cámara experimental para recibir infusiones intragástricas de las distintas identidades nutrimentales bajo un PR9. A la derecha se muestran el requerimiento progresivo de respuestas (lengüeteos), los reforzadores acumulados (Infusiones) y el punto de quiebre (PQ) alcanzado para cada nivel.

7.4.3 Evaluación de preferencias

Las preferencias iniciales de los sujetos fueron establecidas mediante tres sesiones de acceso breve (5 minutos de duración), donde se les presentaron simultáneamente tres sabores distintos y novedosos de soluciones no metabolizables, en ausencia de infusiones, y variando la posición de los sabores entre las sesiones. Posteriormente, se

realizaron 4 sesiones independientes de condicionamiento de 1 hora de duración para cada uno de los pares sabor-nutriente (12 sesiones en total), presentando de manera pseudo-aleatoria dichos pares para controlar por el orden de exposición. En estas sesiones se mantuvo fija la ingesta total a 1.2 kcal/sesión. Tras el condicionamiento, se realizó nuevamente el ensayo de acceso breve para medir las preferencias. En las sesiones de reverseo, se repitió este procedimiento reasignando la identidad de los pares sabor-nutriente. Finalmente, se realizó una vez más este protocolo reasignando la identidad de los pares sabor-nutriente, pero dejando “libre” la ingesta calórica (*i.e.* las calorías ingeridas estuvieron bajo el control de los animales).

Las preferencias se calcularon como:

$$\text{proporción de preferencia al sabor } x = \frac{n(\text{Sabor 1})}{n(\text{Sabor 1}) + n(\text{Sabor 2}) + n(\text{Sabor 3})}$$

donde n indica el número de lengüeteos realizados para un determinado sabor durante el ensayo de acceso breve (test).

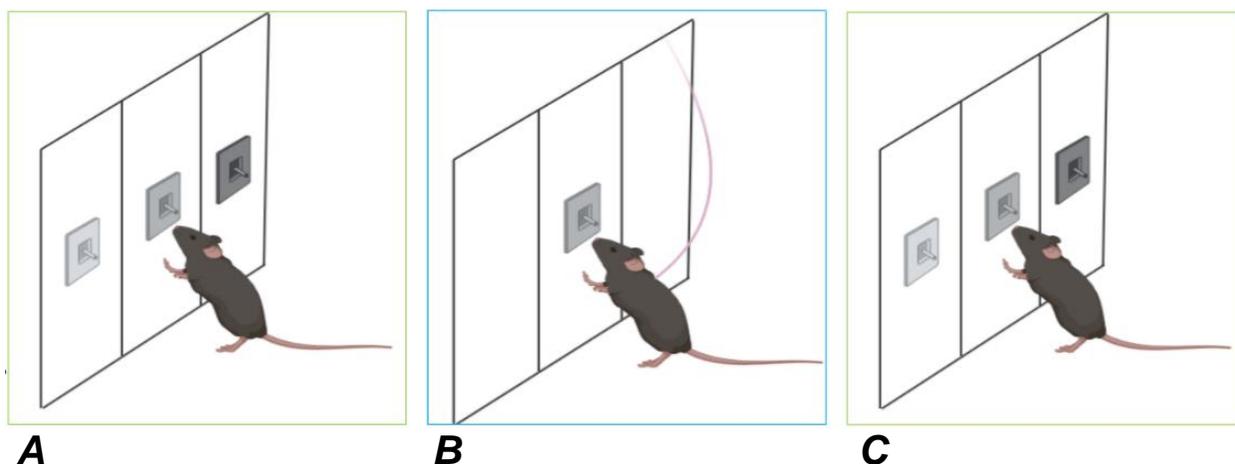


Figura 5. Condicionamiento sabor-nutriente. **A**, los animales ($n=9$) fueron expuestos simultáneamente a tres sabores novedosos de soluciones sin contenido nutricional durante ensayos breves de 5 minutos para establecer sus preferencias iniciales. **B**, durante las sesiones de condicionamiento, se asociaron los sabores con infusiones intragástricas de los nutrientes. **C**, tras el condicionamiento se volvieron a medir las preferencias.

7.4.4 Medición de saciedad inducida por pre-carga.

Las diferencias en saciedad inducidas por los distintos nutrientes, fue evaluada usando animales (n=10) restringidos de alimento por 24 horas, realizando primero sesiones donde se les dio libre acceso a 3.5 gramos de chow (LabDiet® 5008) durante 2 horas monitoreando su consumo cada 30 minutos. Una vez establecida la línea base de ingesta, se realizaron sesiones donde, previo al inicio de las mediciones, se efectuaron pre-cargas, que consistieron en infusiones intragástricas de los distintos macronutrientes (0.6 mL a un ritmo de 25µl/min; 1.2kcal). Terminada la pre-carga se les dio libre acceso a los 3.5 gramos de chow y se monitoreó su consumo. Se realizó una sesión para cada uno de los macronutrientes, distribuyendo su presentación de manera contrabalanceda entre sujetos para controlar por el orden de exposición. En todas las sesiones, incluyendo las de la línea base, la comida que no fue consumida durante las 2h de medición se entregó a los animales 3h después de haber concluido la sesión.

7.5 Medición de liberación dopaminérgica extracelular durante infusiones pasivas

Tras el periodo de recuperación de la cirugía, una sonda de microdiálisis fue insertada en el estriado dorsal o ventral (n=6) a través de la cánula guía. Las sondas fueron conectadas a una bomba que perfundió líquido cefalorraquídeo artificial a un ritmo de 1.2 µl/min. Una vez concluido el periodo de lavado de 40 min, se comenzaron los periodos de recolecta. Las muestras fueron recolectadas, separadas y cuantificadas por HPLC acoplado a métodos de detección electroquímica, utilizando un estándar de dopamina con una concentración de 5pg/µl (Sigma). Una vez establecida la línea base, se realizaron las infusiones pasivas de carbohidratos, lípidos y su mezcla con una densidad calórica de 2 kcal/mL, utilizando el promedio del ritmo de las infusiones autoadministradas durante las últimas sesiones de regulación de la ingesta calórica. Asimismo, se mantuvo la ingesta calórica de las sesiones a 1.2 kcal.

7.6 Análisis de datos

Todos los eventos/parámetros conductuales descritos fueron adquiridos y guardados en archivos con extensión xlsx, que posteriormente fueron organizados, procesados y analizados con el software MATLAB ® (v.20a, Mathworks) y GraphPad Prism ® 8

(GraphPad). Los análisis hicieron uso de pruebas estadísticas no paramétricas a excepción del análisis de los distintos cursos temporales en donde se emplearon pruebas de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para medidas repetidas. Todos los resultados muestran la media y su error estándar. Todos los p valores asociados a las pruebas estadísticas corresponden a pruebas bilaterales con un nivel de 5% y fueron corregidas por comparaciones múltiples. En los pies de figura, se especifica la prueba estadística empleada y el tamaño de la muestra (n , indica el número de animales utilizados).

8. Resultados

8.1 Regulación de la ingesta calórica

Con el propósito de explorar la relación entre la regulación de la ingesta calórica y la identidad nutrimental de forma independiente de las claves orogustativas, se realizaron sesiones en donde las infusiones para los tres nutrientes (carbohidratos, lípidos y su mezcla) fueron activadas por la ingesta oral (lengüeteo) de un mismo sabor (sucralosa 2mM).

Usando infusiones con una densidad de 1 kcal/mL (Figura 6A), se encontró que tanto la ingesta total de lípidos y de la mezcla fueron mayores a la de glucosa. Al aumentar la densidad a 2 kcal/mL (Figura 6B), la ingesta total para lípidos también fue mayor a la de glucosa, pero se desvaneció la diferencia entre la mezcla y glucosa. En ambas densidades no hubo diferencias entre las ingestas promedio para lípidos y la mezcla. Al analizar los cursos temporales de la ingesta (Figuras 6C y 6D), se observó que, para la densidad de 1 kcal/mL (Figura 6C), a partir de los 12 y 18 minutos la ingesta de glucosa comenzó a ser significativamente menor a la de la mezcla y lípidos, respectivamente; tales diferencias se mantuvieron hasta el final de la sesión, y solo a partir de los 42 minutos aparecieron diferencias entre la ingesta entre lípidos y la mezcla. Para la densidad de 2 kcal/mL (Figura 6D), desde los minutos 12 y 18 la ingesta de glucosa fue menor a la de mezcla y lípidos, respectivamente; manteniéndose distintas hasta el final de la sesión. Para esta densidad calórica la ingesta de lípidos y mezcla llegó a ser distinta solo hasta los 48 minutos.

Adicionalmente, al comparar de manera individual la ingesta en ambas densidades calóricas para cada uno de los nutrientes (Figura 6E), se encontró que los animales presentaron una ingesta promedio constante para cada uno de ellos. Sugiriendo que la identidad del nutriente determina una ingesta particular para cada uno.

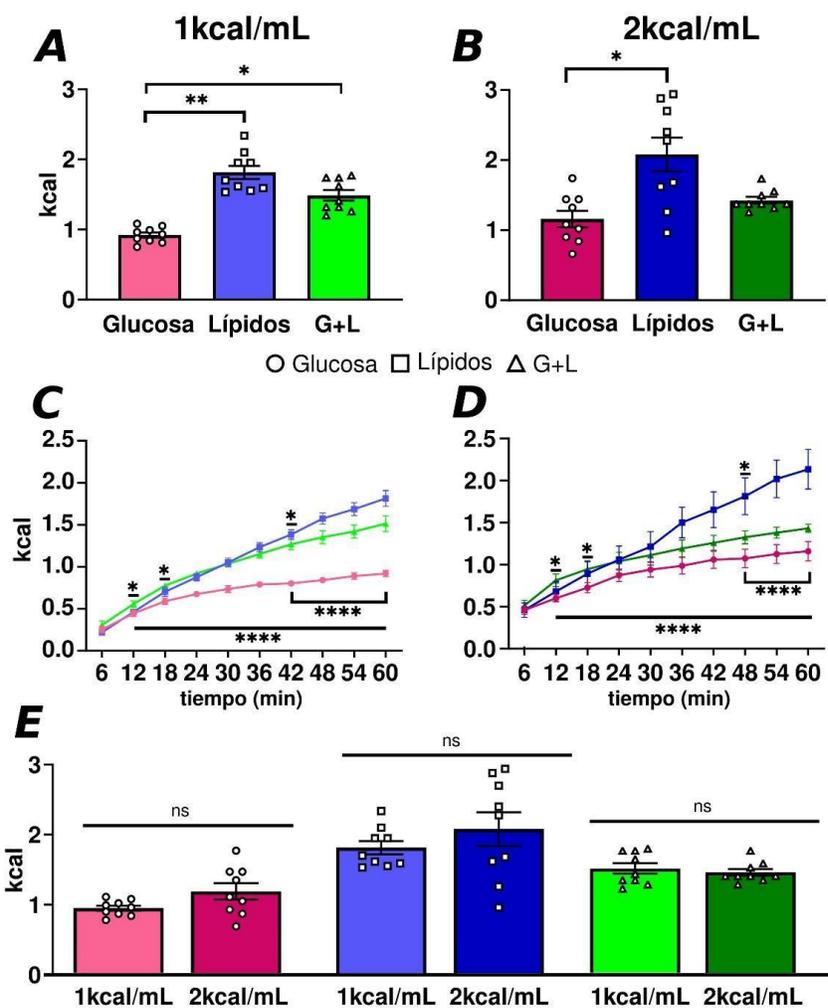


Figura 6. Regulación de la ingesta calórica (n=9). **A**, para las soluciones de 1 kcal/mL los ratones presentaron una ingesta mayor tanto para infusiones intragástricas de lípidos como de mezcla, que fue significativamente distinta a la de glucosa (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 14.89$, **** $p < 0.0001$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples *** $p < 0.0005$ y * $p < 0.02$, respectivamente). **B**, para las soluciones de 2 kcal/mL, nuevamente presentaron una ingesta mayor para las infusiones de lípidos, que resultó significativamente distinta a la de glucosa (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 8.00$, * $p < 0.01$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples * $p < 0.01$.); no obstante, bajo esta densidad, la ingesta calórica para la mezcla no fue significativamente distinta a la de lípidos ($p = 0.47$) o glucosa ($p = 0.47$). **C**, los cursos temporales de la ingesta bajo una densidad de 1 kcal/mL, mostraron efectos de los factores tiempo, nutriente e interacción tiempo x nutriente (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 189.2$, **** $p < 0.0001$, nutriente: $F(2, 16) = 43.96$, **** $p < 0.0001$ e interacción: $F(18, 144) = 35.02$, **** $p < 0.0001$). Una prueba Tukey para comparaciones

múltiples indicó que las ingestas entre mezcla y glucosa comenzaron a ser significativamente diferentes al minuto 12 (* $p = 0.02$), mientras que entre lípidos y glucosa al minuto 18 (** $p = 0.01$). Para el minuto 42, las ingestas calóricas entre todos los nutrientes fueron significativamente diferentes (G vs. M: **** $p < 0.0001$, G vs. L: **** $p < 0.0001$ y L vs. M: * $p = 0.02$). **D**, Para las infusiones de nutrientes con una densidad de 2 kcal/mL, hubo efectos de los factores tiempo, nutriente e interacción tiempo x nutriente (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 120.0$, **** $p < 0.0001$, nutriente: $F(2, 16) = 4.01$, * $p = 0.03$ e interacción tiempo x nutriente: $F(18, 144) = 7.63$, **** $p < 0.0001$). Una prueba Tukey para comparaciones múltiples indicó que la ingesta calórica entre glucosa y mezcla comenzó a ser significativamente distinta al minuto 12 (* $p = 0.04$), y entre glucosa y lípidos al minuto 18 (* $p = 0.04$). Para el minuto 48, las ingestas calóricas entre todos los nutrientes fueron significativamente diferentes (G vs. M: * $p = 0.01$, G vs. L: **** $p < 0.0001$ y L vs. M: **** $p < 0.0001$). **E**, no se encontraron diferencias significativas en la ingesta para ninguna de las tres presentaciones nutricionales al comparlas entre las dos densidades calóricas empleadas (Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas, Glucosa 1 kcal/mL vs. Glucosa 2 kcal/mL: $z = -1.83$, $p = 0.07$, Lípidos 1 kcal/mL vs. Lípidos 2 kcal/mL: $z = -1.18$, $p = 0.25$ y Mezcla 1 kcal/mL vs. Mezcla 2 kcal/mL: $z = -0.70$, $p = 0.54$). Todos los datos muestran la media y su error estándar.

8.2 Programa de reforzamiento de razón progresiva

Una vez establecido que, en efecto, los animales consumen calorías de manera diferencial para cada nutriente, se evaluó qué tan dispuestos estaban a efectuar una operante (lengüeteos) para recibir infusiones de las tres identidades nutrimentales. Para ello, se emplearon las mismas condiciones que aquellas para las sesiones de regulación de la ingesta calórica, excepto que ahora las infusiones estuvieron bajo un programa de razón progresiva aritmética de 9 (Figura 7).

Se observó que para la densidad de 1 kcal/mL (Figura 7A), los animales mostraron puntos de quiebre (PQ) similares para las tres identidades nutrimentales. En contraste, a una densidad de 2 kcal/mL (Figura 7B), los PQ tanto para infusiones de lípidos como de mezcla fueron mayores que aquellos realizados para glucosa; mientras que los PQ para infusiones de lípidos y la mezcla fueron similares.

Puesto que el PQ se define como el requerimiento de respuesta activo en el que el último reforzador fue obtenido (Cain & Bardo, 2010), es posible que existieran diferencias en la cantidad de respuestas totales (lengüeteos) para recibir alguna de estas infusiones que no se vean reflejadas en los PQ. Sin embargo, al comparar la cantidad total de lengüeteos, se observaron los mismos resultados que los obtenidos de los PQ (Figuras 7C y 7D).

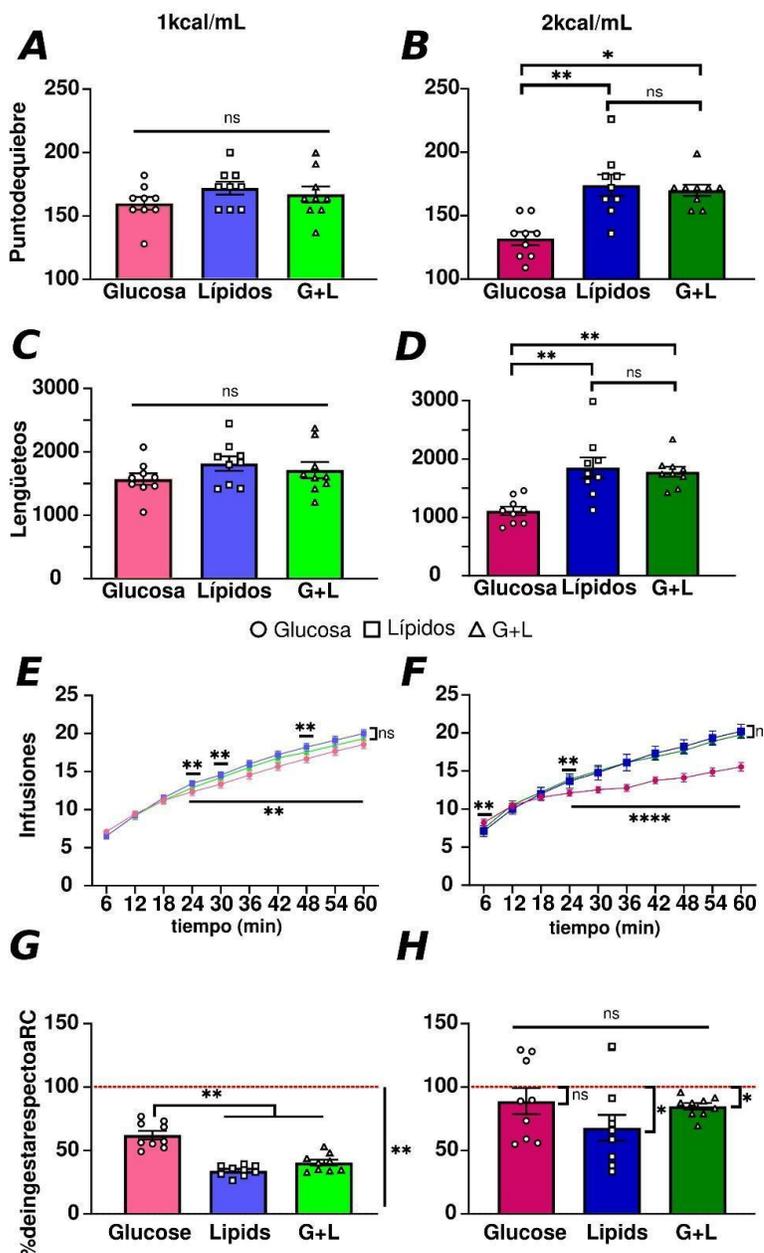
Al analizar el curso temporal de las infusiones durante estas sesiones, se observó que, a una densidad de 1 kcal/mL, el número de infusiones para glucosa fue menor al de lípidos a los 24 minutos, y al de la mezcla a los 30 minutos; diferencias que se mantuvieron durante el resto de la sesión. Aunque se apreciaron diferencias transitorias entre el número de infusiones para lípidos y la mezcla a los 48 minutos, estas no perduraron hacia el final de la sesión. Mientras que para las infusiones de 2 kcal/mL (Figura 7F), a los 6 minutos el número de infusiones para glucosa fue mayor al de lípidos. Sin embargo, esta diferencia desapareció entre los minutos 12 y 18. Para los 24 minutos el número de infusiones para glucosa fue menor tanto para lípidos y la mezcla. Estas

últimas diferencias perduraron hasta el final de la sesión. Las infusiones para lípidos y mezcla nunca fueron diferentes entre sí en esta densidad calórica.

Finalmente, debido a que durante las sesiones de regulación de la ingesta calórica (RC) se encontró un consumo calórico diferencial para cada nutriente, decidimos contrastar las ingestas entre ambos protocolos, usando como referencia la obtenida durante las sesiones de regulación (Figura 7). Para la densidad de 1 kcal/mL, se observó que la ingesta de todos los nutrientes fue menor a su consumo en las sesiones de regulación de la ingesta. No obstante, el porcentaje de ingesta para glucosa durante el reforzamiento progresivo fue mayor al de los otros nutrientes (Figura 7G). Por su parte, a una densidad de 2 kcal/mL, si bien no se encontraron diferencias en la ingesta entre los nutrientes durante el programa de reforzamiento, la ingesta de glucosa fue la única que alcanzó niveles comparables a los observados para la regulación de la ingesta (Figura 7H). Estos resultados sugieren que los bajos niveles para glucosa desplegados en el protocolo de reforzamiento progresivo, podrían estar relacionados con el umbral de ingesta y las propiedades saciantes de la glucosa, las cuales no necesariamente implican una menor motivación por su consumo.

Figura 7. Programa de razón progresiva de 9 (n=9).

A, a una densidad calórica de 1 kcal/mL, no hubo diferencias significativas entre los puntos de quiebre alcanzados por los ratones para recibir infusiones de nutrientes (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 4.56$, $*p=0.11$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples: G vs. L: $p=0.23$, G vs. M: $p=0.86$ y L vs. M: $p>0.99$). **B**, en cambio, en soluciones de 2 kcal/mL, los ratones alcanzaron puntos de quiebre significativamente diferentes para infusiones de lípidos y mezcla en comparación con aquellas de glucosa. (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 12.88$, $***p=0.0005$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples, G vs. L: $**p=0.004$ y G vs. M: $*p=0.01$). No hubo diferencias significativas entre los puntos de quiebre alcanzados para infusiones de lípidos y mezcla. ($p>0.99$). **C**, a una densidad calórica de 1 kcal/mL, no hubo diferencias significativas entre los lengüeteos totales realizados por los ratones para recibir infusiones de los nutrientes (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 3.55$, $*p=0.18$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples: G vs. L: $p=0.17$, G vs. M: $p>0.99$ y L vs. M: $p>0.99$). **D**, en cambio, en soluciones de 2 kcal/mL, los ratones realizaron un número de lengüeteos significativamente diferentes para infusiones de lípidos y mezcla en comparación con aquellas de glucosa. (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 13.56$, $***p=0.0003$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples, G vs. L: $**p=0.002$ y G vs. M: $**p=0.006$). No hubo diferencias significativas entre los lengüeteos totales para infusiones de lípidos y mezcla ($p>0.99$). **E**, el análisis de los cursos temporales encontró que a una densidad de 1 kcal/mL, hubo efectos de los factores tiempo, nutriente e interacción tiempo x nutriente (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 459.0$, $****p<0.0001$, nutriente: $F(2, 16) = 4.75$, $**p=0.02$ e interacción: $F(18, 144) = 4.95$, $****p<0.0001$). Una prueba Tukey para comparaciones múltiples indicó que el número de infusiones entre lípidos y glucosa comenzó a ser significativamente diferente a los 24 minutos ($****p<0.0001$), y a los 30 minutos entre mezcla y glucosa ($**p=0.002$). Para el minuto 48, el número de infusiones para todos los nutrientes fue significativamente diferente (G vs. L: $****p<0.0001$, G vs. M: $**p=0.002$ y L vs. M: $*p=0.02$). No obstante, para los 60 minutos, la diferencia entre el número de infusiones para lípidos y mezcla dejó de ser significativa ($p=0.08$). **F**, bajo una densidad calórica de 2 kcal/mL, hubo efectos de los factores tiempo, nutriente e interacción tiempo x nutriente (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 317.1$, $****p<0.0001$, nutriente: $F(2, 16) = 5.53$, $*p=0.01$ e interacción: $F(18, 144) = 23.03$, $****p<0.0001$). Una prueba Tukey para comparaciones múltiples indicó que el número de infusiones entre glucosa y lípidos comenzó a ser significativamente diferente a los 6 minutos ($**p=0.002$), y a los 24 minutos entre glucosa y mezcla ($****p<0.0001$). Para los últimos 60 minutos, se observó que el número de infusiones obtenidas para lípidos y mezcla nunca llegaron a ser significativamente distintas (G vs. L: $****p<0.0001$, G vs. M: $****p<0.0001$ y L vs. M: $p=0.36$). **G**, el porcentaje de ingesta para todos los nutrientes a una densidad de 1 kcal/mL durante el reforzamiento progresivo fue significativamente diferente del cien por ciento de la ingesta presentada durante el protocolo de regulación de la ingesta calórica (Prueba de Wilcoxon de una muestra,



Glucosa: $**p=0.004$; Lípidos: $**p=0.004$ y M: $**p=0.004$). Asimismo, únicamente hubo diferencias significativas entre el porcentaje de ingesta para glucosa con el de lípidos y mezcla, pero no entre lípidos y mezcla (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 14.89$, $****p<0.0001$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples, G vs. L: $***p=0.0005$, G vs. M: $*p=0.02$ y L vs. M, $p=0.71$). H, el porcentaje de ingesta para lípidos y mezcla a una densidad de 2 kcal/mL durante el reforzamiento progresivo fue significativamente diferente del cien por ciento su ingesta durante el protocolo de regulación de la ingesta calórica; sin embargo, la ingesta de glucosa fue comparable entre ambos protocolos (Prueba de Wilcoxon de una muestra, Glucosa: $p=0.32$, Lípidos: $*p=0.02$ y M: $**p=0.003$). No hubo diferencias significativas entre el porcentaje de ingesta para los nutrientes durante el reforzamiento progresivo (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 4.22$, $p=0.154$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples, G vs. L: $p=0.29$, G vs. M: $p>0.99$ y L vs. M, $p=0.17$). La línea roja punteada representa el cien por ciento de la ingesta presentada durante el protocolo de regulación de la ingesta calórica. Todos los datos muestran la media y su error estándar.

8.3 Condicionamiento sabor-nutriente

Para caracterizar la formación de preferencias derivadas de los efectos post-ingestivos de estos nutrientes, los ratones fueron expuestos a protocolos de condicionamiento sabor-nutriente. Inicialmente, con el propósito de evitar que la ingesta calórica diferencial observada en los distintos nutrientes pudiera traducirse en diferencias en la preferencia, se estableció un criterio de consumo total de 1.2 kcal por sesión para todos ellos durante el condicionamiento (*i.e.*, las infusiones siguieron bajo el control de los lengüeteos, pero al alcanzar una ingesta de 1.2 kcal no se permitieron más infusiones). Cabe mencionar que este punto de corte fue significativamente menor al consumo para lípidos y la mezcla durante las sesiones de regulación de la ingesta calórica (Figura 8A).

Después de presentar y establecer las preferencias iniciales de los sujetos a tres sabores novedosos de soluciones no metabolizables (pre-condicionamiento), se condicionó la presentación de cada uno de los sabores con la infusión de un nutriente en particular; tanto la asignación de cada nutriente con un sabor específico, como la presentación de los sabores durante el condicionamiento, se realizaron de manera contrabalanceada y pseudoaleatoria evitando que hubiera sesgos iniciales en las preferencias (Figura 8B) y asegurando que todos los sabores estuvieran igualmente representados en los 3 nutrientes. Al término de las sesiones de condicionamiento (4 exposiciones x nutriente), se evaluaron nuevamente las preferencias de los sujetos (post-condicionamiento).

Tras este condicionamiento, se observó una redistribución de las preferencias iniciales, encontrando que los sabores asociados con infusiones de la mezcla mostraron una preferencia significativamente mayor que aquella para los sabores asociados con

infusiones de lípidos; adicionalmente, los sabores asociados con la mezcla y con lípidos fueron los únicos con preferencias distintas a la indiferencia (Figura 8C).

Para corroborar la influencia de la identidad nutrimental sobre la formación y el establecimiento de preferencias, los pares sabor-nutriente fueron reasignados entre los mismos sujetos experimentales, y se realizó un segundo ciclo de condicionamiento (reverseo). La distribución de las preferencias mostró un patrón semejante al observado después del primer condicionamiento, siendo los sabores asociados con la mezcla los que desplegaron una mayor preferencia, manteniendo diferencias significativas entre la mezcla y los lípidos, y siendo las preferencias de estos dos nutrientes las únicas distintas a la indiferencia. Tras este re-condicionamiento también aparecieron diferencias entre los sabores asociados con glucosa y los asociados con lípidos, con una marcada inferioridad en la preferencia de los sabores asociados con lípidos (Figura 8D). Sin embargo, estos resultados podrían estar relacionados con el punto de corte impuesto al consumo calórico (1.2 kcal/sesión), que está por debajo del consumo para este nutriente durante las sesiones de regulación de la ingesta (Figura 8A). Para evaluar esta posibilidad, se asignaron nuevos pares sabor-nutriente y se realizó una última ronda de re-condicionamiento en el que la ingesta calórica fue “liberada” (*i.e.* estuvo bajo el control de los animales durante las sesiones de condicionamiento). Una vez más se obtuvo un patrón de preferencias similar a los anteriores, con diferencias significativas entre la mezcla y lípidos, y siendo la elección para estos nutrientes distinta a la indiferencia. En esta condición, las preferencias entre los sabores asociados con glucosa y los asociados con lípidos no fueron diferentes (Figura 8E).

Con el propósito de tener una mejor caracterización de la influencia de la identidad nutrimental, se analizó el cambio en las preferencias de los sabores a través de los distintos protocolos de condicionamiento (*i.e.* la diferencia entre las preferencias para los sabores antes y después de cada ronda de condicionamiento). Este análisis encontró que después del primer protocolo de condicionamiento hubo un incremento significativo en la preferencia de los sabores asociados a la mezcla, y que este cambio fue distinto del generado en los sabores asociados a lípidos, en los que se observó un decremento en su preferencia (Figura 8F). El mismo efecto se encontró en el resto de los

condicionamientos (Figuras 8F-H), donde los sabores asociados con la mezcla siempre presentaron una modulación positiva (aumento en la preferencia); mientras que, los sabores asociados con los lípidos siempre mostraron una modulación negativa (decremento en la preferencia).

En su conjunto, estos resultados indican que es la identidad nutrimental –y no las calorías ingeridas- la que regula la formación de las preferencias, y sugieren un efecto aditivo de la combinación de lípidos y carbohidratos que se traduce en una mayor predilección por los sabores asociados con su ingesta.

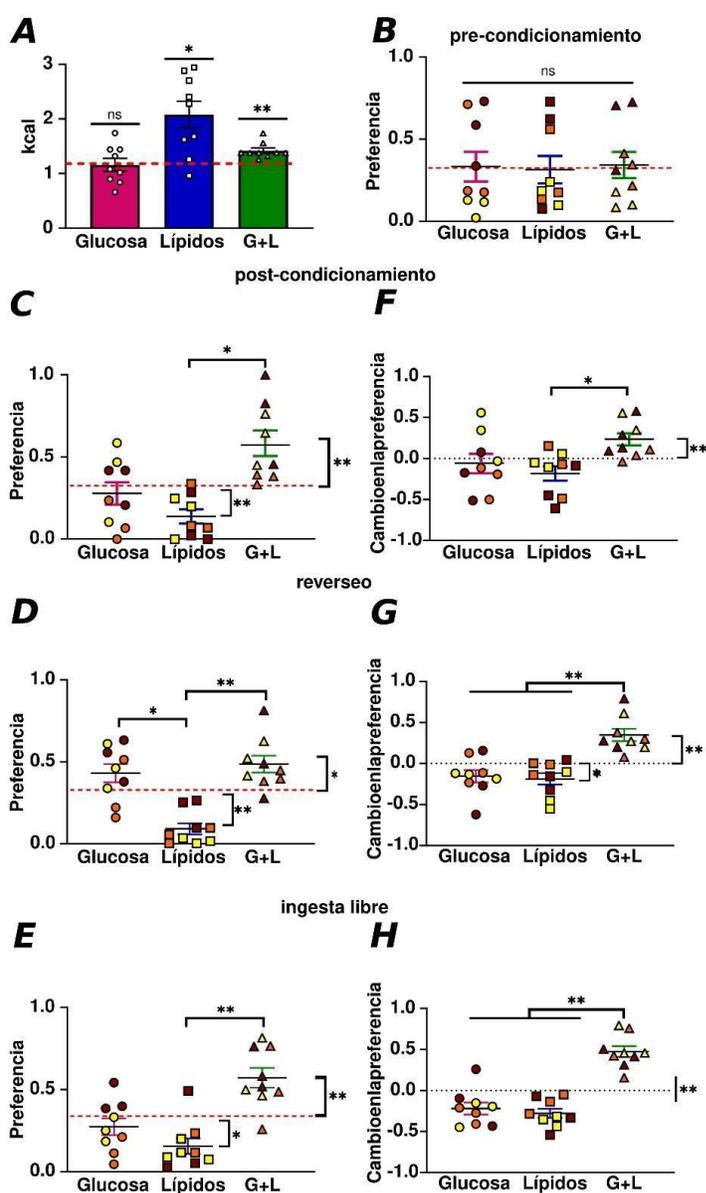


Figura 8. Condicionamiento sabor-nutriente (n=9). **A**, el criterio de ingesta calórica utilizado para las sesiones de condicionamiento (1.2 kcal/sesión) no fue significativamente distinto de la ingesta de glucosa, pero sí de los otros dos nutrientes durante las sesiones de regulación de la ingesta (Prueba de Wilcoxon de una muestra, 1.2 kcal vs. Glucosa: $p=0.73$, 1.2 kcal vs. Lípidos: $*p=0.01$ y 1.2 kcal vs. Mezcla: $**p=0.003$). **B**, preferencias iniciales de los pares sabor-nutriente antes del condicionamiento (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 0.22$, $p=0.97$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples: G vs. L: $p>0.99$, G vs. M: $p>0.99$ y L vs. M: $p>0.99$; y de la indiferencia, Prueba de Wilcoxon de una muestra, 0.33 vs. Glucosa: $p=0.91$, 0.33 vs. Lípidos: $p>0.99$ y 0.33 vs. Mezcla: $p>0.99$). **C**, preferencias de los pares sabor-nutriente después de la primera ronda de condicionamiento, las preferencias de los sabores asociados a infusiones de lípidos y mezcla fueron significativamente distintos de la indiferencia (Prueba de Wilcoxon de una muestra, 0.33 vs. Glucosa: $p=0.42$, 0.33 vs. Lípidos: $**p=0.007$ y 0.33 vs. Mezcla: $**p=0.003$). Asimismo, la preferencia a los sabores asociados a infusiones de mezcla fue significativamente distinta de aquella para los sabores asociados a lípidos (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 7.94$, $*p=0.01$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples: G vs. L: $p=0.17$, G vs. M: $p>0.99$ y L vs. M: $*p=0.02$). **D**, preferencias al concluir las sesiones de recondicionamiento (reverseo), las preferencias a los sabores ahora asociados a infusiones de glucosa y mezcla fueron significativamente diferentes de aquellos ahora asociados a lípidos (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 10.89$, $**p=0.002$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples: G vs. L: $*p=0.02$, G vs. M: $p>0.99$ y L vs. M: $**p=0.002$).

** $p=0.006$), y las preferencias a los sabores asociados a infusiones de lípidos y mezcla fueron una vez más significativamente distintos de la indiferencia (Prueba de Wilcoxon de una muestra, 0.33 vs. Glucosa: $p=0.09$, 0.33 vs. Lípidos: ** $p=0.003$ y 0.33 vs. Mezcla: * $p=0.01$). **E**, preferencias tras las sesiones de condicionamiento con ingesta libre, las preferencias a los sabores asociados a infusiones de mezcla nuevamente fueron significativamente diferentes de aquellos asociados a lípidos (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 10.89$, ** $p=0.002$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples: G vs. L: $p=0.29$, G vs. M: $p=0.29$ y L vs. M: ** $p=0.002$). Asimismo, las preferencias a los sabores asociados a infusiones de lípidos y mezcla fueron de nueva cuenta significativamente distintos de la indiferencia (Prueba de Wilcoxon de una muestra, 0.33 vs. Glucosa: $p=0.30$, 0.33 vs. Lípidos: * $p=0.01$ y 0.33 vs. Mezcla: ** $p=0.007$). **F**, cambios en las preferencias después del primer condicionamiento, únicamente los sabores asociados a las infusiones de mezcla mostraron un cambio significativo (Prueba de Wilcoxon de una muestra, Sin Cambio vs. Glucosa: $p=0.57$, Sin Cambio vs. Lípidos: $p=0.09$ y Sin Cambio vs. Mezcla: ** $p=0.007$), que fue significativamente distinto del cambio asociado a lípidos (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 6.88$, * $p=0.03$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples: G vs. L: $p>0.99$, G vs. M: $p=0.29$ y L vs. M: * $p=0.02$). **G**, cambios en las preferencias inducidos por el reverseo, después de este re-condicionamiento el cambio en la preferencia de los sabores asociados a lípidos y mezcla fueron significativos (Prueba de Wilcoxon de una muestra, Sin Cambio vs. Glucosa: $p=0.09$, Sin Cambio vs. Lípidos: * $p=0.02$ y Sin Cambio vs. M: ** $p=0.003$), el cambio generado por la mezcla fue significativamente distinto de los cambios asociados a glucosa y lípidos (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 13.56$, *** $p=0.0003$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples: G vs. L: $p>0.99$, G vs. M: ** $p=0.006$ y L vs. M: ** $p=0.002$). **H**, cambios en las preferencias inducidos por el condicionamiento con libre ingesta, para este protocolo todos los cambios fueron significativos (Prueba de Wilcoxon de una muestra, Sin Cambio vs. Glucosa: * $p=0.03$, Sin Cambio vs. Lípidos: ** $p=0.003$ y Sin Cambio vs. M: ** $p=0.003$). Adicionalmente, el cambio en los sabores asociados a la mezcla fue significativamente distinto de aquellos en los sabores asociados a lípidos y glucosa (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 10.89$, ** $p=0.002$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples: G vs. L: $p>0.99$, G vs. M: * $p=0.02$ y L vs. M: ** $p=0.006$). Todos los datos muestran la media y su error estándar. La línea punteada roja corresponde a una preferencia de 0.33 equivalente a la indiferencia, la línea negra corresponde al no cambio. Los colores de los símbolos representan los sabores utilizados: rojo (arándano), amarillo (piña), y anaranjado (naranja).

8.4 Influencia de las claves orogustativas sobre la ingesta

Para elucidar los posibles efectos de las claves orogustativas sobre el consumo de estos nutrientes, se comparó la ingesta durante las sesiones de condicionamiento sabor-nutriente (ingesta libre) con la obtenida para las sesiones de regulación de la ingesta calórica, donde se usó la misma clave (sucralosa 2mM) para todos los nutrientes.

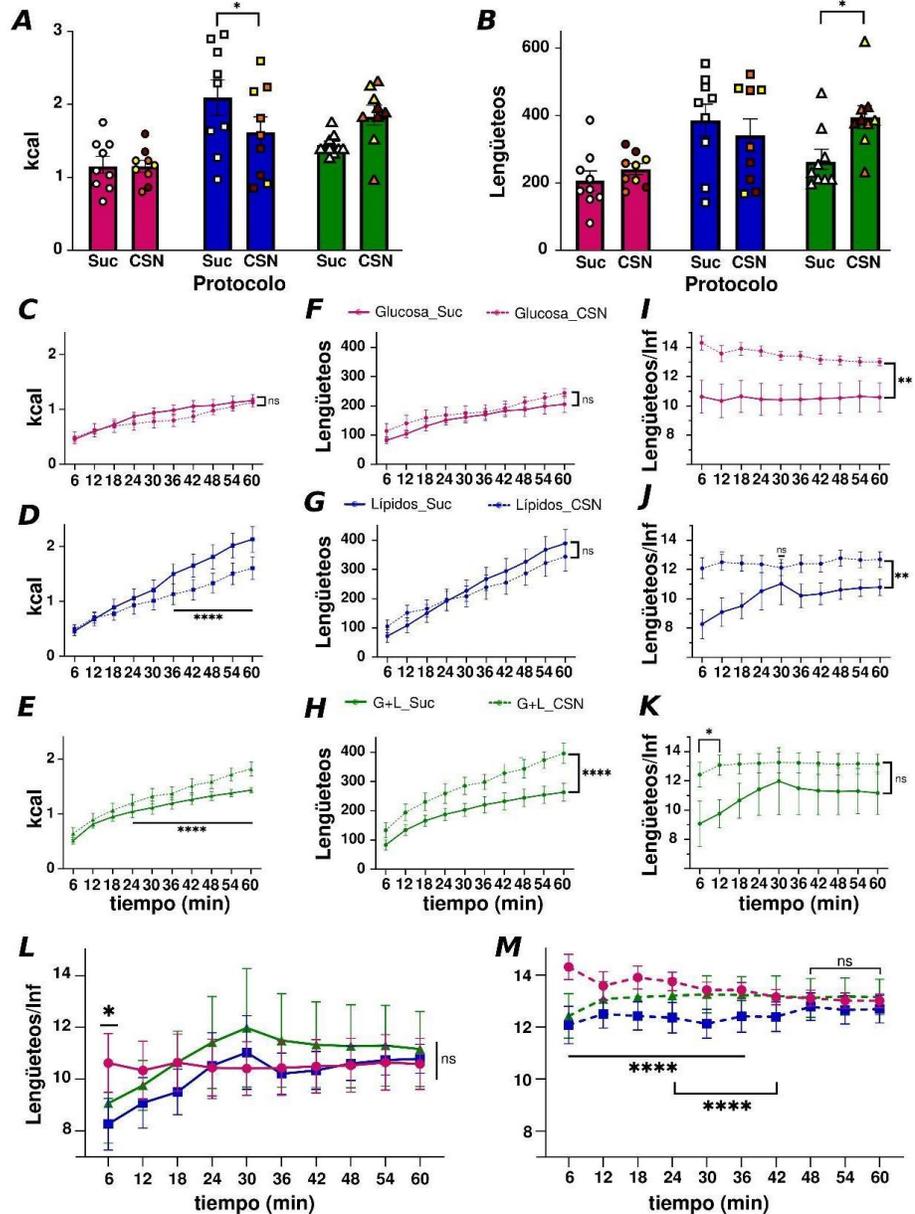
En lo que se refiere a las calorías ingeridas, se observó que la ingesta para lípidos fue la única que difirió significativamente entre estas dos condiciones, siendo menor durante las sesiones de condicionamiento (Figura 9A). En contraparte, se encontró que el número de lengüeteos totales efectuados para la mezcla fueron los únicos que difirieron entre las dos condiciones, incrementando significativamente en las sesiones de condicionamiento sabor-nutriente (Figura 9B). Por su parte, la comparación de los cursos temporales para la ingesta calórica no encontró diferencias entre ambos protocolos para glucosa (Figura 9C), pero sí para lípidos y la mezcla. La ingesta calórica de lípidos fue menor a partir de los 36 minutos durante la sesión de condicionamiento (Figura 9D); mientras que, para el caso de la mezcla, su ingesta fue en aumento a partir de los 24

minutos de la sesión de condicionamiento (Figura 9E). El análisis de los cursos temporales para el lengüeteo (Figura 9F-H), solo arrojó diferencias entre ambos protocolos para la mezcla, con un incremento significativo en la cantidad de lengüeteos, presente a lo largo de la sesión de condicionamiento (Figura 9G).

Adicionalmente, se analizó la relación entre lengüeteos e infusiones, mediante los cursos temporales de los lengüeteos efectuados por cada infusión durante ambos protocolos (Figura 9I-K). Este análisis mostró que, durante las sesiones de condicionamiento y en todos los nutrientes, se produjo una mayor cantidad de lengüeteos por infusión. Sin embargo, solo se encontraron diferencias significativas sostenidas a lo largo de la sesión para glucosa y lípidos (Figura 9I y 9J, respectivamente); mientras que, en el caso de la mezcla, únicamente los dos primeros puntos del tiempo (minutos 6 y 12) fueron diferentes (Figura 9K). Por último, se compararon los cursos temporales de los lengüeteos efectuados por infusión para cada uno de los nutrientes en función del protocolo de ingesta empleado. Este análisis encontró que, durante las sesiones de regulación de la ingesta calórica (cuando la clave orogustativa fue siempre la misma), ocurrió un ajuste a lo largo de la sesión en este parámetro, sin que hubiera diferencias entre los nutrientes en la cantidad de lengüeteos por infusión (Figura 9L). En contraste, durante las sesiones de condicionamiento sabor-nutriente (cuando a cada nutriente le correspondía una clave orogustativa), no se encontraron cambios en este parámetro a lo largo de la sesión. Sin embargo, sí hubo diferencias significativas durante la sesión en la cantidad de lengüeteos por infusión relacionadas con la identidad del nutriente, siendo glucosa la que presentó el mayor número de lengüeteos por infusión (Figura 9M). Es importante notar que dichas diferencias no pueden ser atribuibles a un sabor particular, debido a que en todos los nutrientes se encuentran igualmente representados los 3 sabores.

En su conjunto, estos resultados recalcan la forma en que la identidad nutrimental (y sus efectos post-ingestivos) utiliza a las claves orogustativas para modular la ingesta calórica.

Figura 9. Comparación entre los protocolos de regulación de la ingesta y condicionamiento sabor-nutriente (n=9). **A**, para el consumo de calorías, hubo efectos del nutriente e interacción protocolo x nutriente, pero no del protocolo (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, protocolo: $F(1, 8) = 0.11, p=0.74$, nutriente: $F(2, 16) = 13.33, ***p=0.0004$ e interacción: $F(2, 16) = 8.01, **p=0.003$). Una prueba de Sidak para comparaciones múltiples indicó que solamente las ingestas calóricas para lípidos entre ambos protocolos fueron significativamente distintas (G: $p=0.99$, L: $*p=0.01$ y M: $p=0.063$). **B**, la comparación de los lengüeteos producidos durante los dos protocolos encontró efectos del nutriente, pero no del protocolo, ni interacción protocolo x nutriente (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, protocolo: $F(1, 8) = 1.78, p=0.21$, nutriente: $F(2, 16) = 10.41, **p=0.001$ e interacción: $F(2, 16) = 3.30, p=0.063$). Una prueba de Sidak para comparaciones múltiples indicó que solamente el número de lengüeteos para la mezcla fue significativamente distinto entre ambos protocolos (G: $p=0.83$, L: $p=0.75$ y M: $*p=0.045$). **C**, en la ingesta calórica para glucosa, hubo efectos del tiempo, pero no del protocolo o interacción tiempo x protocolo (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 38.48, ****p<0.0001$, protocolo: $F(1, 8) = 0.57, p=0.46$ e interacción: $F(9, 72) = 1.05, p=0.06$). Una prueba de Sidak para comparaciones múltiples indicó que la ingesta calórica de glucosa fue la misma para ambas sesiones ($p>0.99$). **D**, en la ingesta calórica de lípidos, no hubo efectos del protocolo, pero sí del tiempo e interacción tiempo x protocolo (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 50.61, ****p<0.0001$, protocolo: $F(1, 8) = 2.08, p=0.18$ e interacción: $F(9, 72) = 8.06, ****p<0.0001$). Una prueba de Sidak para comparaciones múltiples indicó que, a partir de los 36 minutos la ingesta de lípidos entre ambos protocolos fue significativamente diferente ($***p=0.0001$), manteniendo esta diferencia durante toda la sesión ($****p<0.0001$). **E**, en la ingesta para la mezcla, no hubo efectos del tiempo, pero sí del tiempo e interacción tiempo x protocolo (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 79.33, ****p<0.0001$, protocolo: $F(1, 8) = 2.63, p=0.14$ e interacción: $F(9, 72) = 3.33, **p=0.001$). Una prueba de Sidak para comparaciones múltiples indicó que, a partir de los 24 minutos la ingesta de mezcla entre los protocolos fue significativamente diferente ($*p=0.04$), manteniendo dichas diferencias hasta el final de la sesión ($****p<0.0001$). **F**, en los cursos temporales del lengüeteo para infusiones de glucosa, hubo efectos del tiempo, pero no del protocolo o interacción tiempo x protocolo (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 38.48, ****p<0.0001$, protocolo: $F(1, 8) = 0.57, p=0.46$ e interacción: $F(9, 72) = 1.05, p=0.06$). Una prueba de Sidak para comparaciones múltiples indicó que no hubo



diferencias entre los protocolos a lo largo de la sesión ($p=0.33$). **G**, en los cursos temporales del lengüeteo para lípidos, no hubo efectos del protocolo, pero sí del tiempo e interacción tiempo x protocolo (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 50.05$, **** $p < 0.0001$, protocolo: $F(1, 8) = 0.70$, $p=0.79$ e interacción: $F(9, 72) = 3.52$, ** $p=0.002$). Una prueba de Sidak para comparaciones múltiples indicó que el número de lengüeteos para lípidos nunca fue significativamente diferente entre ambas sesiones ($p=0.13$). **H**, en los cursos temporales del lengüeteo para mezcla, hubo efectos del tiempo e interacción tiempo x protocolo, pero no efectos del protocolo (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 50.94$, **** $p < 0.0001$, protocolo: $F(1, 8) = 4.19$, $p=0.057$ e interacción: $F(9, 72) = 2.42$, * $p=0.01$). Una prueba de Sidak para comparaciones múltiples indicó que, desde los 6 minutos, el número de lengüeteos para la mezcla fue significativamente diferente entre los protocolos (* $p=0.03$), diferencia que se mantuvo durante el resto de la sesión (**** $p < 0.0001$). **I**, en el número de lengüeteos efectuados por infusión de glucosa, no hubo efectos del tiempo, pero sí del protocolo e interacción tiempo protocolo (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 0.81$, $p=0.60$, protocolo: $F(1, 8) = 9.89$, * $p=0.01$ e interacción: $F(9, 72) = 2.85$, ** $p=0.006$). Una prueba de Sidak para comparaciones múltiples indicó que, desde los 6 minutos y durante toda la sesión, el número de lengüeteos efectuados por infusión de glucosa entre ambos protocolos fue significativamente diferente (**** $p < 0.0001$). **J**, en el número de lengüeteos efectuados por infusión de lípidos, hubo efectos del tiempo e interacción tiempo x protocolo, pero no efectos del protocolo (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 2.37$, * $p=0.02$, protocolo: $F(1, 8) = 5.00$, $p=0.055$ e interacción: $F(9, 72) = 3.01$, ** $p=0.004$). Una prueba de Sidak para comparaciones múltiples indicó que, con excepción del minuto 30 ($p=0.2$), hubo diferencias significativas entre ambos protocolos desde el minuto 6 (**** $p < 0.0001$), que se mantuvieron a lo largo de la sesión (** $p=0.001$), **K**, en el número de lengüeteos por infusión de mezcla, no hubo efectos de ninguno de los factores o interacción entre ellos (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 1.54$, $p=0.15$, protocolo: $F(1, 8) = 1.48$, $p=0.25$ e interacción: $F(9, 72) = 0.54$, $p=0.84$). Una prueba de Sidak para comparaciones múltiples indicó que, únicamente en los 6 y 12 minutos, el número de lengüeteos por infusión fue significativamente diferente entre los protocolos (** $p=0.006$ y * $p=0.007$, respectivamente). **L**, la comparación entre nutrientes durante las sesiones de regulación de la ingesta calórica para los lengüeteos efectuados por infusión, no encontró efectos del nutriente o interacción tiempo x nutriente, pero sí efectos del tiempo (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 2.08$, * $p=0.04$, nutriente: $F(2, 16) = 0.11$, $p=0.84$ e interacción: $F(18, 144) = 0.83$, $p=0.65$). Una prueba Tukey para comparaciones múltiples indicó que únicamente a los 6 minutos hubo diferencias significativas entre glucosa y lípidos (* $p=0.01$). **M**, la comparación entre nutrientes durante las sesiones de condicionamiento sabor-nutriente para los lengüeteos por infusión, no encontró efectos del tiempo o los nutrientes, pero sí interacción tiempo x nutriente (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(9, 72) = 0.51$, $p=0.86$, nutriente: $F(2, 16) = 1.52$, $p=0.24$ e interacción: $F(18, 144) = 2.59$, *** $p=0.0009$). Una prueba Tukey para comparaciones múltiples indicó que los lengüeteos por infusión entre glucosa y lípidos fueron significativamente diferentes de los 6 (**** $p < 0.0001$) a los 36 minutos (** $p=0.006$) de la sesión; mientras que entre lípidos y la mezcla, de los 24 (* $p=0.02$) a los 42 minutos (* $p=0.03$). Los lengüeteos por infusión entre glucosa y mezcla únicamente fueron diferentes durante los primeros 6 minutos de la sesión (**** $p < 0.0001$). A partir de los 48 minutos, dejaron de haber diferencias significativas entre los nutrientes (G vs. L: $p=0.055$, G vs. M: $p=0.99$ y L vs. M: $p=0.54$). Todos los datos muestran la media y su error estándar. Los colores de los símbolos representan los sabores utilizados: rojo (arándano), amarillo (piña), y anaranjado (naranja).

8.5 Saciedad inducida por los nutrientes y efectos aditivos de la mezcla sobre la ingesta

Con la finalidad de evaluar posibles diferencias en la saciedad relacionadas con la identidad nutrimental, se realizaron sesiones en animales hambrientos en las que la disponibilidad de alimento (chow) fue precedida por infusiones pasivas de los nutrientes (pre-carga, 1.2kcal/sesión). Previo a dichas sesiones, los animales fueron restringidos y habituados a tener acceso al alimento durante 2 horas (línea base de ingesta). Los resultados obtenidos muestran que las infusiones de glucosa produjeron una reducción mayor en la ingesta en comparación con los demás nutrientes, enfatizando sus propiedades saciantes, lo que explica que sea el nutriente con una menor ingesta durante

los protocolos de regulación de ingesta calórica, programa de reforzamiento progresivo y condicionamiento sabor-nutriente.

Para explorar la posibilidad de que –además de incidir sobre la preferencia– la combinación de glucosa y lípidos pudiera incrementar la ingesta calórica, se contrastó el consumo de estos nutrientes usando como referencia para la ingesta la concentración relativa de glucosa o lípidos, y no la densidad calórica de las soluciones (Figura 10B-E). Por ello, con el objetivo de hacer comparable la concentración de los nutrientes con la mezcla a 1 kcal/mL [12.5% glucosa + 5% Intralipid], se realizaron sesiones de regulación de la ingesta a una densidad de 0.5 kcal/mL para glucosa [12.5% glucosa] y lípidos [5% Intralipid]. Adicionalmente, para las comparaciones con la mezcla a 2 kcal/mL [25% glucosa + 10% Intralipid] se incluyeron las sesiones de condicionamiento sabor-nutriente.

Al utilizar a la glucosa como nutriente de referencia, se encontró que la combinación de glucosa y lípidos aumentó significativamente las calorías ingeridas para ambas concentraciones de glucosa (12.5% y 25%; Figura 10 B y C, respectivamente); incremento observado tanto en las sesiones de regulación de la ingesta, como en las de condicionamiento sabor-nutriente (Figura 10 C). Estos resultados sugieren que la combinación de lípidos y glucosa podría tener efectos aditivos sobre el consumo; además de descartar la posibilidad de que los bajos niveles de ingesta observados para glucosa estén determinados por la osmolaridad, ya que soluciones de la mezcla con osmolaridades comparables o incluso mayores (comparar glucosa 0.5 kcal/mL vs G+L 2 kcal/mL; Figura 10B) presentaron niveles más altos de ingesta.

En contraste, al utilizar la concentración de lípidos como referente, no se encontraron diferencias con la mezcla a 1 kcal/mL [5% Intralipid + 12.5% glucosa] o a 2kcal/mL [10% Intralipid + 25% glucosa] a una densidad de 0.5kcal/mL [5% Intralipid] (Figura 10D). La ingesta de lípidos a 1 kcal/mL [10% Intralipid] fue significativamente mayor a la de la mezcla a 2 kcal/mL [10% Intralipid + 25% glucosa] durante las sesiones de regulación de la ingesta; sin embargo, dichas diferencias desaparecieron durante las sesiones de condicionamiento sabor-nutriente (Figura 10D). Por una parte, estos resultados evidencian el papel de los lípidos sobre el consumo de la mezcla, señalando

a su adición como el posible responsable de incrementar el umbral calórico de ingesta para glucosa y confirman la influencia que ejercen las claves orogustativas sobre la modulación de la conducta de ingesta.

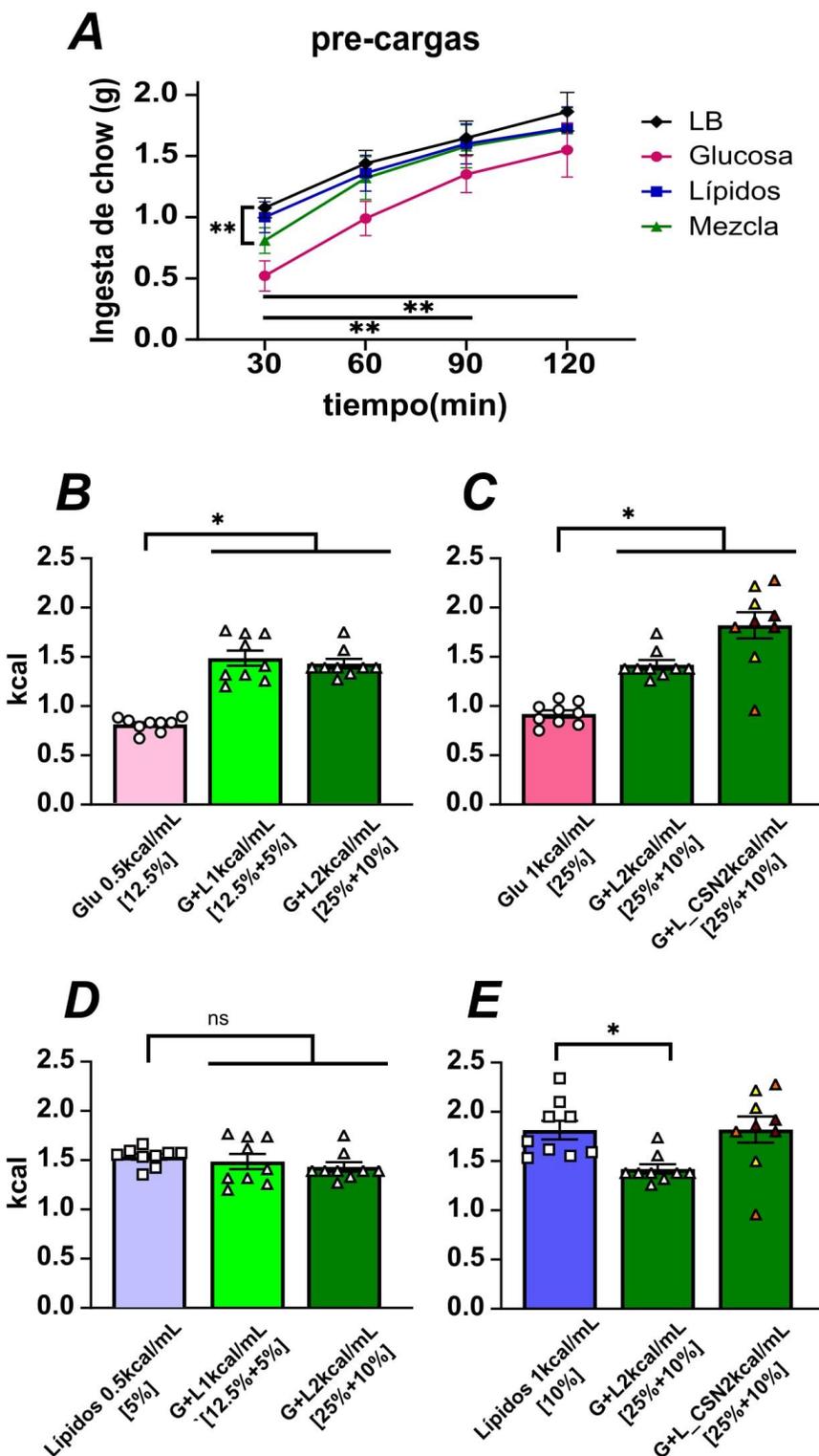


Figura 10. Comparación entre las ingestas calóricas de glucosa y lípidos con la mezcla en relación a su concentración individual (n=10). **A**, después de infusiones pasivas de los distintos nutrientes se encontraron efectos del tiempo y del nutriente sobre la ingesta de chow, sin que hubiera interacción tiempo x nutriente (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(3, 27) = 71.29$, **** $p < 0.0001$, nutriente: $F(3, 27) = 3.92$, * $p = 0.01$ e interacción: $F(9, 81) = 1.50$, $p = 0.16$). Una prueba Tukey para comparaciones múltiples indicó diferencias significativas entre las infusiones de glucosa y los demás nutrientes desde el inicio y hasta los 90 minutos de la sesión (G vs. L: ** $p = 0.008$, G vs. M: * $p = 0.01$), sólo en el minuto 30 se presentaron diferencias significativas entre la mezcla y línea base (M vs. LB: ** $p = 0.004$). Únicamente glucosa mantuvo diferencias significancia con la línea base durante toda la sesión (*** $p = 0.0006$). **B**, usando como referencia a la glucosa, a una densidad de 0.5 kcal/mL [12.5% glucosa], se encontró que la ingesta de los animales (n=9) fue significativamente diferente de la observada para la mezcla a 1 kcal/mL [12.5% glucosa + 5% Intralipid] y a 2 kcal/mL [25% glucosa + 10% Intralipid] durante las sesiones de regulación de la ingesta (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 14.11$, *** $p = 0.0002$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples ** $p = 0.001$ y ** $p = 0.006$, respectivamente). **C**, asimismo, la ingesta glucosa a 1 kcal/mL [12.5% glucosa] fue significativamente distinta de presentada para la mezcla a 2 kcal/mL [25% glucosa + 10% Intralipid] tanto las sesiones de

regulación de la ingesta como en las de condicionamiento sabor-nutriente (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 16.22$, **** $p < 0.0001$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples * $p = 0.03$ y **** $p < 0.0001$, respectivamente). **D**, usando como referencia a los lípidos, a una densidad de 0.5 kcal/mL [5% Intralipid], no se encontraron diferencias significativas en su ingesta con respecto a la mezcla en ninguna de las densidades calóricas empleadas durante las sesiones de regulación de la ingesta (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 1.20$, $p = 0.58$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples $p > 0.99$ y $p = 0.57$, respectivamente). **E**, no obstante, la ingesta presentada para lípidos a 1 kcal/mL [10% Intralipid] fue significativamente distinta de la ingesta para la mezcla a 2 kcal/mL [25% glucosa + 10% Intralipid] durante las sesiones de regulación de la ingesta, pero en comparación a la observada para el condicionamiento sabor-nutriente (Prueba de Friedman para medidas repetidas, $\chi^2(3) = 10.89$, ** $p = 0.002$; prueba de Dunn para comparaciones múltiples * $p = 0.01$ y $p > 0.99$, respectivamente). Todos los datos muestran la media y su error estándar.

8.6 Liberación dopaminérgica en el estriado dorsal y ventral

Finalmente, para explorar los correlatos neurobiológicos que puedan explicar los patrones de ingesta y de preferencias observados, analizamos las respuestas del sistema dopaminérgico resultantes de los efectos post-ingestivos de las distintas identidades nutrimentales. Para ello, mediante microdiálisis se cuantificaron los cambios en los niveles extracelulares de dopamina (DA) en las porciones dorsal y ventral del estriado en respuesta a infusiones pasivas de estos nutrientes, fijando el criterio de ingesta a 1.2 kcal/sesión y utilizando el promedio de los ritmos de infusión observados durante las sesiones de regulación de la ingesta calórica.

Para el estriado dorsal, se observaron cambios en los perfiles de liberación de DA relacionados con la identidad del nutriente (Figura 10A). Presentando un marcado incremento en respuesta al inicio de la infusión de la mezcla (minuto 6), que fue significativamente distinto a los cambios inducidos tanto por la infusión de glucosa como la de lípidos. Otras diferencias se encontraron entre la mezcla y glucosa al minuto 24 de la sesión, entre glucosa y lípidos en los minutos 30 y 60, y entre la mezcla y lípidos hacia el final de la sesión (minuto 60). Es de notar que, en todos los nutrientes ocurrió un incremento inicial en los niveles de DA en respuesta a su infusión, seguido de una disminución durante la segunda mitad de la sesión, siendo los lípidos los que mostraron el descenso más pronunciado.

Respecto al estriado ventral, no se encontraron cambios en los perfiles de liberación de DA atribuibles a la identidad del nutriente (Figura 10B). No obstante, se observó que las infusiones de glucosa produjeron niveles extracelulares de DA que se mantuvieron más tiempo por encima de los niveles basales y fueron ligeramente mayores

que los inducidos por a las infusiones de lípidos y de la mezcla; mostrando diferencias significativas entre glucosa y la mezcla en los minutos 18, 48 y 54, y con lípidos a los 54 minutos de la sesión.

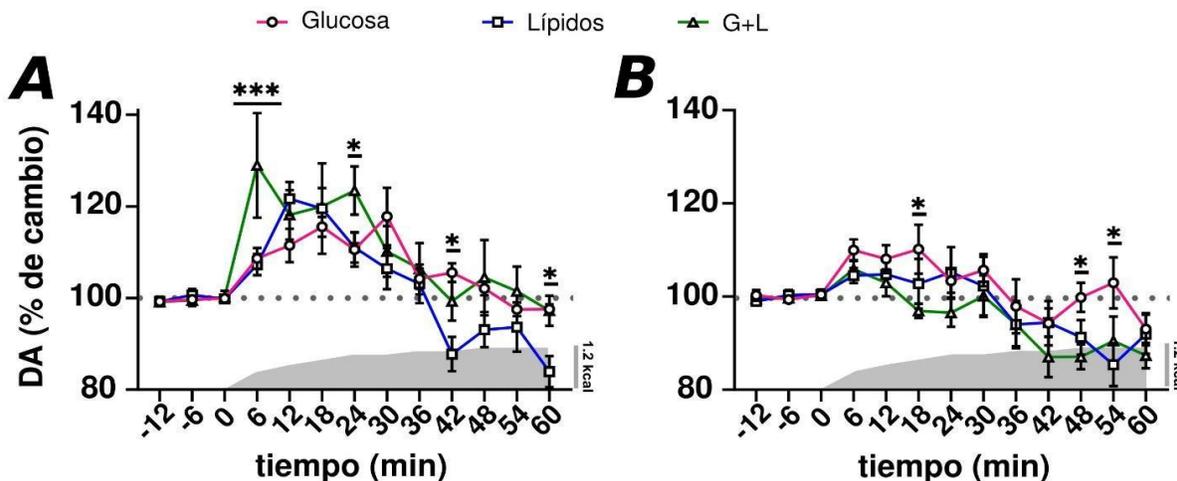


Figura 10. Cambios en los niveles de dopamina (DA) extracelular las porciones dorsal y ventral del estriado en respuesta a infusiones pasivas de los nutrientes (n=6). **A**, en los niveles extracelulares de DA en el estriado dorsal, no se encontraron efectos significativos del nutriente; sin embargo, sí hubo efectos del tiempo e interacción tiempo x nutriente (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(12, 60) = 11.51$, $****p < 0.0001$, nutriente: $F(2, 10) = 3.56$, $p = 0.068$ e interacción: $F(24, 120) = 1.93$, $*p = 0.01$). Una prueba Tukey para comparaciones múltiples reveló diferencias significativas: al inicio de las infusiones (minuto 6) entre la mezcla y los otros nutrientes (G vs. L: $p = 0.96$, G vs. M: $***p = 0.0007$ y L vs. M: $***p = 0.0003$); entre glucosa y la mezcla al minuto 24 (G vs. L: $p = 0.99$, G vs. M: $*p = 0.04$ y L vs. M: $p = 0.057$); entre glucosa y lípidos a los 42 minutos (G vs. L: $**p = 0.003$, G vs. M: $p = 0.47$ y L vs. M: $p = 0.08$); y entre lípidos con los otros nutrientes hacia el final de la sesión (G vs. L: $*p = 0.03$, G vs. M: $p = 0.99$ y L vs. M: $*p = 0.03$). **B**, en el estriado ventral solo se encontraron efectos del tiempo, pero no del nutriente o interacción tiempo x nutriente sobre los niveles extracelulares de DA (ANOVA de dos vías para medidas repetidas, tiempo: $F(12, 60) = 10.38$, $****p < 0.0001$, nutriente: $F(2, 10) = 3.21$, $p = 0.08$ e interacción: $F(24, 120) = 0.93$, $p = 0.55$). Una prueba Tukey para comparaciones múltiples indicó las siguientes diferencias significativas: entre mezcla y glucosa al minuto 18 (G vs. L: $p = 0.26$, G vs. M: $*p = 0.01$ y L vs. M: $p = 0.43$); entre glucosa y mezcla a los 48 minutos (G vs. L: $p = 0.16$, G vs. M: $*p = 0.02$ y L vs. M: $p = 0.65$); y a los 54 minutos, entre glucosa con los otros nutrientes (G vs. L: $***p = 0.0009$, G vs. M: $*p = 0.02$ y L vs. M: $p = 0.53$), que se desvanecieron para el final de la sesión (G vs. L: $p = 0.97$, G vs. M: $p = 0.45$ y L vs. M: $p = 0.59$). Todos los datos muestran la media y su error estándar. La línea punteada representa los niveles basales de DA antes del inicio de las infusiones. La sombra en gris representa la manera en la que se administraron las infusiones (kcal acumuladas). Todos los datos muestran la media y su error estándar.

9. Discusión y conclusiones

Nuestros resultados sugieren la existencia de una ingesta calórica diferencial que depende de la identidad nutrimental. Tales resultados contrastan abiertamente con la propuesta derivada del modelo de la “regulación energética”, en donde se estipula que los animales se alimentan primordialmente para cubrir sus demandas energéticas, irrespectivamente de su fuente (para una breve esquematización de los modelos, ver Hu et al., 2018). Los animales tienden a consumir una mayor cantidad de calorías de

infusiones de lípidos que de glucosa. Dicho efecto puede estar relacionado con los inicios relativos de los efectos postingestivos de ambos nutrientes (Myers, 2018), de los cuales se conoce que los efectos derivados de infusiones de azúcar tienden a presentarse de manera más rápida en comparación con aquellos derivados de grasas (Myers & Whitney, 2010; Myers, Taddeo & Richards, 2013). En este sentido, la relativa inmediatez de los efectos de las infusiones de glucosa genera una ingesta más estable, sin la imposición de un mayor requerimiento en ésta a causa de una mayor latencia en la “apetitividad” (Sclafani, 2013). En cambio, la ingesta elevada de lípidos observada, podría ser una consecuencia del lento establecimiento de sus efectos “recompensantes” post-ingestivos. Por otro lado, la ingesta de la mezcla de ambos nutrientes no fue diferente de lípidos, y sus diferencias con la glucosa dependieron de la densidad calórica, indicando que la concentración de los nutrientes tiene influencia sobre su consumo. En este sentido, al tomar como referencia la concentración de glucosa, se encontró que su combinación con lípidos incrementa su ingesta calórica.

En términos del “valor específico” de reforzamiento, aunque es plausible asumir que las diferencias encontradas durante el programa de reforzamiento progresivo se relacionan directamente con la saliencia de los nutrientes, es importante considerar que existe una ingesta calórica diferencial que depende de la identidad nutrimental. Al comparar los porcentajes de ingesta entre este protocolo y el anterior, la ingesta de glucosa fue la única que estuvo por encima de las demás. Esto sugiere que, más allá de una menor motivación derivada de los efectos postingestivos de la glucosa, los animales posiblemente están comportándose en función de su ingesta moderada. Dicha posibilidad es respaldada por las diferencias encontradas en la saciedad inducida por los distintos nutrientes, siendo la glucosa quien produjo la mayor reducción en el consumo de chow en animales hambrientos.

En cuanto a la formación de preferencias, nuestros resultados demuestran que los animales prefieren consistentemente los sabores asociados con la mezcla, y en menor medida aquellos asociados con lípidos. Ambos efectos se replicaron a través de las distintas rondas de condicionamiento, independientemente de si la ingesta calórica

estuviese fija o “libre”; confirmando el efecto sinérgico de sus efectos postingestivos (Difeliceantonio et al., 2018). Más aún, durante las sesiones de condicionamiento, al “saber” la identidad de las infusiones por medio de su asociación con sabores arbitrarios, los animales redujeron la ingesta de lípidos, y aumentaron tanto la ingesta como los lengüeteos efectuados para infusiones de la mezcla, en correspondencia con lo observado para sus preferencias.

Respecto a la señalización dopaminérgica, pese a que en el DS todos los nutrientes aumentaron los niveles de dopamina extracelular, la infusión de lípidos fue menos eficiente en sostener este aumento en el tiempo en comparación con las otras identidades nutrimentales. Asimismo, el cambio en los niveles dopaminérgicos en respuesta a infusiones de glucosa y mezcla fueron muy similares, excepto al inicio de las infusiones, donde la respuesta para la mezcla tuvo un fuerte incremento transitorio. Dichos resultados podrían corresponder con lo observado en la conducta, donde la elevada ingesta de lípidos sería interpretada como una respuesta para contrarrestar el declive en la liberación de dopamina en el DS (Reinholz et al. 2008), mientras que el súbito incremento inicial ante infusiones de la mezcla se relaciona con la predilección de los estímulos asociados con esta identidad nutrimental. Finalmente, en el VS, si bien no se encontraron diferencias en la liberación dopaminérgica atribuibles a la identidad nutrimental, se observó que su respuesta a infusiones de glucosa tendió a ser mayor y sostenida en el tiempo. En este sentido, se sabe que neuronas que expresan la hormona concentradora de melanina (MCH) en el hipotálamo lateral tienen fuertes proyecciones con el VS (Chometton et al., 2014) y son despolarizadas directamente por la administración de glucosa (Burdakov et al., 2005); además, la activación optogenética de estas neuronas genera un incremento en los niveles de DA extracelular (Zhang, Han, Lin, Li & de Araujo, 2018). Esta estrecha comunicación entre el hipotálamo lateral con el VS puede ser un mecanismo que explique la dinámica de la liberación dopaminérgica ante infusiones de glucosa.

En conjunto, estos resultados demuestran que los efectos post-ingestivos de las tres identidades nutrimentales empleadas influyen de manera diferencial tanto en la conducta alimentaria como en el sistema dopaminérgico de recompensa (Figura 11).

Para ampliar el conocimiento sobre los procesos conductuales que subyacen en la alimentación, queda pendiente la replicación de estos efectos bajo distintos parámetros conductuales, así como con otras identidades nutrimentales. Por otro lado, es necesario realizar manipulaciones a diferentes niveles del eje intestino-cerebro para tener un mejor entendimiento de la naturaleza de los sensores periféricos por los cuales la presencia de distintos nutrientes es comunicada e integrada durante la conducta de ingesta en respuesta a las demandas nutricionales.



Figura 11. Esquema integrativo de los resultados principales del presente estudio.

Referencias

- Adolph, E. F. (1947). Urges to eat and drink in rats. *American Journal of Physiology*, *151*(1), 110–125. doi: 10.1152/ajplegacy.1947.151.1.110
- Araujo, I. E., Oliveira-Maia, A. J., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., Nicolelis, M. A., & Simon, S. A. (2008). Food Reward in the Absence of Taste Receptor Signaling. *Neuron*, *57*(6), 930-941. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.032
- Araujo, I. E. D., Ferreira, J. G., Tellez, L. A., Ren, X., & Yeckel, C. W. (2012). The gut–brain dopamine axis: A regulatory system for caloric intake. *Physiology & Behavior*, *106*(3), 394–399. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.02.026
- Araujo, I. E. D., Schatzker, M., & Small, D. M. (2019). Rethinking Food Reward. *Annual Review of Psychology*, *71*(1). doi: 10.1146/annurev-psych-122216-011643
- Batis, C., Rivera, J. A., Popkin, B. M., & Taillie, L. S. (2016). First-Year Evaluation of Mexico's Tax on Nonessential Energy-Dense Foods: An Observational Study. *PLOS Medicine*, *13*(7). doi: 10.1371/journal.pmed.1002057
- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, *15*(5), 288–298. doi: 10.1038/s41574-019-0176-8
- Bortolin, R. C., Vargas, A. R., Gasparotto, J., Chaves, P. R., Schnorr, C. E., Martinello, K. B., ... Moreira, J. C. F. (2017). A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in terms of metabolic and gut microbiota disruption. *International Journal of Obesity*, *42*(3), 525–534. doi: 10.1038/ijo.2017.225
- Burdakov, D., Gerasimenko, O., & Verkhatsky, A. (2005). Physiological Changes in Glucose Differentially Modulate the Excitability of Hypothalamic Melanin-Concentrating Hormone and Orexin Neurons In Situ. *Journal of Neuroscience*, *25*(9), 2429-2433. doi:10.1523/jneurosci.4925-04.2005
- Caballero, B., Vorkoper, S., Anand, N., & Rivera, J. A. (2017). Preventing childhood obesity in Latin America: an agenda for regional research and strategic partnerships. *Obesity Reviews*, *18*, 3–6. doi: 10.1111/obr.12573
- Chometton, S., Cvetkovic-Lopes, V., Houdayer, C., Franchi, G., Mariot, A., Poncet, F., . . . Risold, P. (2014). Anatomical organization of MCH connections with the pallidum and dorsal striatum in the rat. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *8*. doi:10.3389/fnsys.2014.00185
- Cordain, L., Eaton, S. B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B. A., ... Brand-Miller, J. (2005). Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *81*(2), 341–354. doi: 10.1093/ajcn.81.2.341
- Denbow, D. M. (1999). Food intake regulation in birds. *Journal of Experimental Zoology*, *283*(4-5), 333–338.

- Difeliceantonio, A. G., Coppin, G., Rigoux, L., Thanarajah, S. E., Dagher, A., Tittgemeyer, M., & Small, D. M. (2018). Supra-Additive Effects of Combining Fat and Carbohydrate on Food Reward. *Cell Metabolism*, 28(1). doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.018
- Ferreira, J. G., Tellez, L. A., Ren, X., Yeckel, C. W., & Araujo, I. E. D. (2012). Regulation of fat intake in the absence of flavour signalling. *The Journal of Physiology*, 590(4), 953–972. doi: 10.1113/jphysiol.2011.218289
- Han, W., Tellez, L. A., Perkins, M. H., Perez, I. O., Qu, T., Ferreira, J., ... Araujo, I. E. D. (2018). A Neural Circuit for Gut-Induced Reward. *Cell*, 175(3), 887–888. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.018
- Hankir, M., Seyfried, F., Hintschich, C., Diep, T., Kleberg, K., & Kranz, M. et al. (2017). Gastric Bypass Surgery Recruits a Gut PPAR- α -Striatal D1R Pathway to Reduce Fat Appetite in Obese Rats. *Cell Metabolism*, 25(2), 335-344. doi: 10.1016/j.cmet.2016.12.006
- Holman, G. (1969). Intra-gastric reinforcement effect. *Journal Of Comparative And Physiological Psychology*, 69(3), 432-441. doi: 10.1037/h0028233
- Hu, S., Wang, L., Yang, D., Li, L., Togo, J., & Wu, Y. et al. (2018). Dietary Fat, but Not Protein or Carbohydrate, Regulates Energy Intake and Causes Adiposity in Mice. *Cell Metabolism*, 28(3), 415-431.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.06.010
- Jaacks, L. J., Vandevijvere, S. J., Pan, A. J., McGowan, C. J., Wallace, C. J., Mamura, F. J., ... Ezzati, M. J. (2019). The obesity transition: stages of the global epidemic. *Yearbook of Paediatric Endocrinology*. doi: 10.1530/ey.16.13.15
- Kleberg, K., Jacobsen, A. K., Ferreira, J. G., Windeløv, J. A., Rehfeld, J. F., Holst, J. J., ... Hansen, H. S. (2015). Sensing of triacylglycerol in the gut: different mechanisms for fatty acids and 2-monoacylglycerol. *The Journal of Physiology*, 593(8), 2097–2109. doi: 10.1113/jphysiol.2014.285635
- Loria, E., & Salas, E. (2014). Sobrepeso e integración económica en México. *Economía Informa*, 389. doi: 10.1016/S0185-0849(14)72171-1
- Mchugh, P. R., & Moran, T. H. (1978). Accuracy of the regulation of caloric ingestion in the rhesus monkey. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 235(1). doi: 10.1152/ajpregu.1978.235.1.r29
- Mitchell, N. S., Catenacci, V. A., Wyatt, H. R., & Hill, J. O. (2011). Obesity: Overview of an Epidemic. *Psychiatric Clinics of North America*, 34(4), 717–732. doi: 10.1016/j.psc.2011.08.005
- Myers, K., & Whitney, M. (2011). Rats' learned preferences for flavors encountered early or late in a meal paired with the post-ingestive effects of glucose. *Physiology & Behavior*, 102(5), 466-474. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.12.016
- Myers, K. (2013). Rats acquire stronger preference for flavors consumed towards the end of a high-fat meal. *Physiology & Behavior*, 110-111, 179-189. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.01.004

- Myers, K., Taddeo, M., & Richards, E. (2013). Sensory-specific appetite: Postingestive detection of glucose rapidly promotes continued consumption of a recently encountered flavor. *Physiology & Behavior*, *121*, 125-133. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.03.021
- Myers, K. (2018). The convergence of psychology and neurobiology in flavor-nutrient learning. *Appetite*, *122*, 36-43. doi: 10.1016/j.appet.2017.03.048
- OECD. (2016). *Oecd reviews of health systems Mexico, 2016*. Paris.
- Qu, T., Han, W., Niu, J., Tong, J., & Araujo, I. E. D. (2019). On the roles of the Duodenum and the Vagus nerve in learned nutrient preferences. *Appetite*, *139*, 145–151. doi: 10.1016/j.appet.2019.04.014
- Reinholz, J., Skopp, O., Breitenstein, C., Bohr, I., Winterhoff, H., & Knecht, S. (2008). Compensatory weight gain due to dopaminergic hypofunction: New evidence and own incidental observations. *Nutrition & Metabolism*, *5*(1), 35. doi:10.1186/1743-7075-5-35
- Rossi, M. A., & Stuber, G. D. (2018). Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. *Cell Metabolism*, *27*(1), 42–56. doi: 10.1016/j.cmet.2017.09.021
- Rozin, P., & Mayer, J. (1961). Regulation of food intake in the goldfish. *American Journal of Physiology*, *201*(5), 968–974. doi: 10.1152/ajplegacy.1961.201.5.968
- Russek, M. (1963). Participation of hepatic Glucoreceptors in the control of intake of food. *Nature*, *197*(4862), 79-80. <https://doi.org/10.1038/197079b0>
- Saper, C. B., Chou, T. C., & Elmquist, J. K. (2002). The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron*, *36*(2), 199–211. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00969-8
- Sclafani, A. (2001). Post-ingestive positive controls of ingestive behavior. *Appetite*, *36*(1), 79–83. doi: 10.1006/appe.2000.0370
- Sclafani, A. (2013). Gut–brain nutrient signaling. Appetition vs. satiation. *Appetite*, *71*, 454-458. doi: 10.1016/j.appet.2012.05.024
- Sclafani, A., & Ackroff, K. (2016). Operant licking for intragastric sugar infusions: Differential reinforcing actions of glucose, sucrose and fructose in mice. *Physiology & Behavior*, *153*, 115–124. doi: 10.1016/j.physbeh
- Sclafani, A., & Lucas, F. (1996). Abdominal Vagotomy Does Not Block Carbohydrate-Conditioned Flavor Preferences in Rats. *Physiology & Behavior*, *60*(2), 455–462. doi: 10.1016/0031-9384(96)00040-6
- Small, D. M., & Difeliceantonio, A. G. (2019). Processed foods and food reward. *Science*, *363*(6425), 346-347. doi:10.1126/science.aav0556
- Smith, D. G. (2005). Mesolimbic Dopamine Super-Sensitivity in Melanin-Concentrating Hormone-1 Receptor-Deficient Mice. *Journal of Neuroscience*, *25*(4), 914-922. doi:10.1523/jneurosci.4079-04.2005

- Spiegel, T. A. (1974). Caloric regulation of food intake in man. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *84*(1), 24–37. doi: 10.1037/h0035006
- Tellez, L. A., Ferreira, J. G., Medina, S., Land, B. B., Dileone, R. J., & Araujo, I. E. D. (2013a). Flavor-Independent Maintenance, Extinction, and Reinstatement of Fat Self-Administration in Mice. *Biological Psychiatry*, *73*(9), 851–859. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.02.028
- Tellez, L., Medina, S., Han, W., Ferreira, J., Licona-Limón, P., & Ren, X. et al. (2013b). A Gut Lipid Messenger Links Excess Dietary Fat to Dopamine Deficiency. *Science*, *341*(6147), 800-802. doi: 10.1126/science.1239275
- Tellez, L. A., Han, W., Zhang, X., Ferreira, T. L., Perez, I. O., Shammah-Lagnado, S. J., ... Araujo, I. E. D. (2016). Separate circuitries encode the hedonic and nutritional values of sugar. *Nature Neuroscience*, *19*(3), 465–470. doi: 10.1038/nn.4224
- Thomas, D. W., & Mayer, J. (1968). Meal taking and regulation of food intake by normal and hypothalamic hyperphagic rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *66*(3), 642–653. doi: 10.1037/h0026520
- Tulloch, A. J., Murray, S., Vaicekonyte, R., & Avena, N. M. (2015). Neural Responses to Macronutrients: Hedonic and Homeostatic Mechanisms. *Gastroenterology*, *148*(6), 1205–1218. doi: 10.1053/j.gastro.2014.12.058
- Turner, N., Leslie, S. J., Hallahan, N. L., & Cooney, G. J. (2012). Metabolic defects induced by high-fat feeding in mice are rapidly reversed by a low-fat diet. *BMC Proceedings*, *6*(S3). doi: 10.1186/1753-6561-6-s3-p49
- Villa, A. R. R., Escobedo, M. H., & Méndez-Sánchez, N. (2004). Estimación y proyección de la prevalencia de obesidad en México a través de la mortalidad por enfermedades asociadas. *Gac Méd Méx*, *140*(2), s21–s25.
- World Health Organization (WHO). (2016). HEALTH SITUATION: Mexico. Recuperado 14 de noviembre de 2019, de: <http://apps.who.int/gho/data/node.cco>.
- Zhang, L., Han, W., Lin, C., Li, F., & Araujo, I. E. D. (2018). Sugar Metabolism Regulates Flavor Preferences and Portal Glucose Sensing. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, *12*. doi: 10.3389/fnint.2018.00057