



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
Instituto de Fisiología Celular

Facultad de Medicina



**Manipulación optogenética de la corteza
insular anterior en la atenuación de la
neofobia a sacarina**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NEUROCIENCIAS

PRESENTA:
OSCAR APOLINAR CRUZ SANCHEZ

DIRECTOR: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

CD. MX. 2023



Instituto de
Fisiología
Celular



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.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mis padres Concepción y Alejandro, por haberme permitido priorizar mi educación por sobre todas las cosas y al mismo tiempo por haber podido ser libre de elegir mi camino que me llevó hasta donde estoy ahora. También a mis hermanas Belem y Alejandra, por apoyarme todos los días de forma constante y sin pedirme nada a cambio.

A mis amigos que tanto me han acompañado. No hubiera sido sin su apoyo, sus palabras y su cariño que hubiera podido lograr aprender todo lo que he aprendido, desde lo más básico hasta lo más complejo, cada uno fue una pieza importante para poder terminar la licenciatura. Andy, Aris, Ale, Alex, Allan, Gaby, Habs, Regina, Xarennny, Vale, Joseca, Monse, Luz, Karla, Silvas. También a Alejandra, Juan Carlos, Jeriel, Lizandro, Ari, Addi, Ani, Yami, Joselen, Víctor, Gabriel. Los amo a todos ustedes.

A Andrés Agoitia por haberme enseñado todo y de alguna manera enseñarme a creer en mí. Este trabajo no podría haberse realizado si no hubiera sido por tú interés en que yo creciera como persona y es algo que no podré terminar de agradecerte nunca.

A mis compañeros y amigos del laboratorio que me hicieron sentir acogido y de los que aprendí, sigo aprendiendo constantemente y siempre llevaré en mi corazón: Arturo, Gaby, Karla.

Al laboratorio del Dr. Oscar Prospéro y a todos sus miembros por abrirme sus puertas y me mostraron por primera vez lo que significaba la investigación y me invitaron a formar parte de esta comunidad.

Al Dr. Federico Bermúdez por dejarme ser parte de este grupo de investigación y permitirme estudiar algo tan interesante para mi y aprender tantas técnicas tan interesantes que me impulsarán en mi posterior vida profesional.

Y a los ratones por su esfuerzo, su aprendizaje y su vida.

“Dije en *Dorian Gray* que los grandes pecados del mundo tienen lugar en el cerebro, pero es en el cerebro donde todo tiene lugar. Ahora sabemos que no vemos con los ojos ni oímos con los oídos. Ellos no son sino causas de transmisión, adecuada o inadecuada de las impresiones sensoriales. Es en el cerebro donde la amapola es roja, donde la manzana es aromática, donde canta la alondra.”

De profundis. Oscar Wilde.

Índice	
1. Introducción.....	6
1.1 El aprendizaje.....	6
1.2 Neurobiología de la identificación de sabores.....	7
1.3 La neofobia y sus componentes.....	9
2. Antecedentes	14
3. Planteamiento del problema.....	22
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivos	22
5.1 Objetivos específicos	23
6. Metodología.....	23
6.1 Experimento 1: Identificación de un protocolo de AN en ratones C57BL/6..	23
6.1.1 Sujetos.....	23
6.1.2 Neofobia y atenuación de la neofobia.....	23
6.1.3 Análisis de los resultados	24
6.2 Experimento 2: Manipulación optogenética de Cla en la neofobia a sacarina	
.....	25
6.2.1 Sujetos.....	25
6.2.2 Transfección de los proteínas fotosensibles	25
6.2.3 Inhibición y activación de la Cla durante la neofobia	25
6.2.4 Análisis de los resultados	26
6.2.5 Confirmación histológica de la transfección.....	27
7. Resultados	28
7.1 Experimento 1: Identificación de un protocolo de AN en ratones C57BL/6..	28
7.1.1 Protocolo de un bebedero.....	28
7.1.2 Protocolo de dos bebederos	30
7.2 Experimento 2: Manipulación optogenética de Cla en la neofobia a sacarina	
.....	33
7.2.1 Confirmación histológica de la transfección.....	33
7.2.2 Inhibición de la Cla durante la neofobia a sacarina	33
7.2.3 Activación de la Cla durante la neofobia a sacarina	33
8. Discusión.....	36
8.1 Inhibición de la Cla durante la neofobia a sacarina.....	38

8.2 Activación de la Cla durante la neofobia a sacarina.	40
9. Conclusiones.....	42
10. Referencias	43

Resumen

La neofobia es una respuesta conductual de cautela que se expresa ante la presencia de un alimento novedoso. Si este alimento no es asociado con una consecuencia negativa, el consumo de este alimento aumentará conforme aumenten las presentaciones, este proceso se conoce como atenuación de la neofobia (AN). La corteza insular anterior (Cla) es una región que participa en el reconocimiento de sabores dulces y en la formación de memorias gustativas, entre las cuales se encuentra la AN. Si esta región sufre un daño o si se bloquea la actividad colinérgica, tanto la neofobia como la AN se ven afectadas, por lo que la Cla destaca como una región sumamente importante para la formación de esta memoria. La manipulación optogenética es una técnica que nos permite manipular la actividad de un grupo neuronal en tiempo real y así explorar el papel funcional de una región cerebral específica o de sus proyecciones sobre otra región. Esta herramienta nos permite explorar con mayor detalle la participación de la Cla en la AN en un modelo animal como lo son los ratones C57BL/6.

Utilizando ratones C57BL/6 identificamos un modelo de AN a sacarina con una respuesta neofóbica robusta y una atenuación rápida, el cual fue utilizado para evaluar la participación de la Cla mediante estimulación optogenética durante la presentación de sacarina novedosa, donde se observó que ni la inhibición o activación de la Cla modificaron la expresión de neofobia a sacarina. Mientras que la inhibición generó un retraso de la AN, haciendo que la respuesta neofóbica se expresara de nuevo en la segunda presentación de sacarina; la activación aceleró la AN. Este trabajo señala que la neofobia no es dependiente de la Cla, mientras que la AN si depende de esta estructura, puede ser resultado de la interferencia en el proceso de formación de la memoria de reconocimiento a la sacarina, como la expresión alguna proteína relacionada con la consolidación de la memoria como la proteína ARC.

1. Introducción.

1.1 El aprendizaje.

A lo largo de la vida de un animal el medio ambiente se va modificando de forma constante, estos cambios deben ser identificados y recordados de manera eficiente con el fin de procurar su supervivencia modificando su comportamiento de forma temporal o permanente, a estos cambios en la conducta los conocemos como aprendizaje. El aprendizaje es la capacidad de un organismo para poder adquirir información del ambiente, mantener esa información a lo largo del tiempo y poder recuperarla para generar una respuesta adecuada (Kandel, 2001). La información adquirida del medio ambiente se representa en la memoria, concepto que refiere a los cambios físicos en el sistema nervioso donde la información es codificada y almacenada (Bear, 2020; Kandel, 2001).

El proceso de formación de memoria a largo plazo consta de cuatro fases secuenciales que son: adquisición, consolidación, evocación y reconsolidación (Bermúdez-Rattoni, 2004). Durante la adquisición, la información cuyo origen puede ser externa o interna es codificada por los diversos sistemas sensoriales, durante este proceso la información es lábil y puede alterarse o perderse con facilidad (Bermúdez-Rattoni et al., 2004).

En la consolidación, la representación de la información se vuelve estable en el tiempo al generarse un trazo de memoria, a través de diversos procesos celulares, entre los cuales se encuentran la expresión de genes, la síntesis de proteínas y el aumento de la liberación de neurotransmisores, procesos que ayudan al fortalecimiento de la conectividad sináptica (Bermúdez-Rattoni, 2004).

Durante la evocación la información es recuperada para utilizarse en el presente y modificar la conducta del organismo en respuesta de las condiciones existentes. En consecuencia, el trazo de memoria se vuelve lábil y vuelve a pasar por un proceso de consolidación donde la memoria puede modificarse de nuevo o mantenerse estable en un proceso que se conoce como reconsolidación (Rodríguez-Ortiz et al., 2005).

Por otro lado, la memoria puede ser clasificada dependiendo de sus características, su contenido o duración. Se ha propuesto la clasificación dependiendo del contenido de la memoria en declarativa o explícita y en no declarativa o implícita (Kandel, 2001) y dependiendo de su duración en memoria de corto plazo (MCP) y memoria de largo plazo (MLP) (Bear, 2020; Kandel, 2001).

La memoria declarativa o explícita corresponde a los hechos factuales que incluyen experiencias personales y eventos complejos situados en el tiempo (Bear, 2020; Tulving & Markowitsch, 1998). Al mismo tiempo, esta memoria se puede dividir en memoria episódica, que se refiere a los hechos experimentados por el sujeto en un momento temporal específico y en memoria semántica, que se refiere a la información sobre el medio ambiente abstraída de situaciones particulares (Bear, 2020; Tulving & Markowitsch, 1998).

La memoria no declarativa o implícita corresponde al conocimiento y recuerdos inconscientes como los patrones motores, habilidades y hábitos aprendidos, así como otras formas de aprendizaje no asociativo como lo es la habituación y la sensibilización (Bear, 2020; Kandel, 2001).

La memoria a corto plazo (MCP), corresponde a un trazo de memoria lábil con un tiempo de almacenamiento que dura un pequeño periodo de tiempo que va de los minutos a unas pocas horas. Mientras que la memoria a largo plazo (MLP) se forma gracias a la consolidación del trazo de memoria cuya duración puede durar de días a años e incluso perdurar a lo largo de toda la vida del organismo (Bear, 2020).

1.2 Neurobiología de la identificación de sabores

Uno de los cambios en el ambiente más relevantes para la supervivencia de un organismo corresponde a la disponibilidad de alimentos. Cada vez que un alimento nuevo es presentado a un animal este debe ser identificado correctamente ya que de no ocurrir esto puede llegar a consumir grandes cantidades de un alimento potencialmente dañino (Bermúdez-Rattoni, 2004; Gutierrez Mendoza, 2004).

La primer fuente de información que llega a un animal sobre un alimento esa través de la estimulación sensorial, donde el gusto y el olfato son los sistemas sensoriales

que tienen la mayor relevancia sobre las características nutricionales que puede ofrecer. Mientras que los alimentos con sabor dulce y umami están relacionados con la presencia de azúcares y proteínas, los sabores amargo y ácido están mayormente relacionados con sustancias tóxicas o con un pH bajo. Ya que los azúcares como la glucosa y las proteínas son elementos esenciales de una dieta balanceada, la detección de estos componentes tiene como consecuencia el aumento del consumo del alimento que los contenga, mientras que la detección de sustancias amargas y tóxicas como la estricnina y la picrotoxina, generan una reducción en el consumo como estrategia para garantizar la supervivencia (Behrens et al., 2004; Yarmolinsky et al., 2009).

Esta información sensorial es inicialmente codificada en las papilas gustativas distribuidas dentro de la cavidad bucal principalmente en la lengua, las cuales contienen cientos de células que expresan un tipo de receptor distinto para cada sabor (dulce, amargo, salado, ácido y umami), esta información viaja a través de los nervios faciales glossofaríngeo y facial, con una menor participación del nervio vago

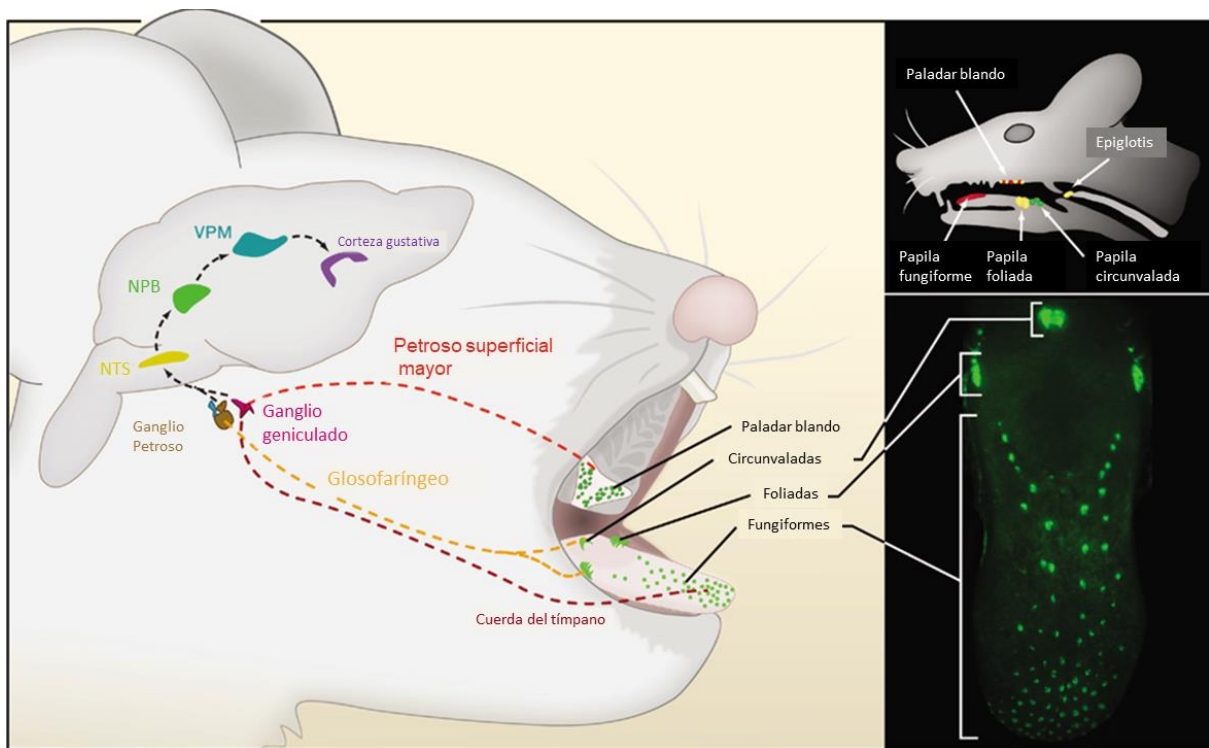


Figura 1. Representación esquemática de la vía gustativa del roedor. Modificado de Yarmolinsky et al., 2009).

hacia el núcleo del tracto solitario (NTS) en el tronco encefálico. Posteriormente esta información se transmite hacia el núcleo parabraquial (NPB) en el mesencéfalo donde la información se bifurca hacia el hipotálamo lateral, la sustancia innominada, la amígdala en su porción central y basolateral, el núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM) que a su vez envía proyecciones a la corteza gustativa primaria y la corteza insular (CI) (Bermúdez-Rattoni, 2004; Bermúdez-Rattoni et al., 2004; Yarmolinsky et al., 2009) (Figura 1).

En la corteza insular, se establece una representación topológicamente distinta para cada sabor, teniendo una mayor activación en la porción frontal de la corteza insular (C_{la}) en presencia de sabores dulces, una mayor activación en la porción posterior de la corteza insular (C_{lp}) por los sabores amargos y dos regiones intermedias que responden diferencialmente a los sabores umami y salado (Chen et al., 2011).

Esta representación topológicamente distinta puede jugar un papel muy importante en la regulación del consumo de un alimento ya que se ha descrito mediante la manipulación de estas regiones de la CI a través de activación optogenética, que al activar la C_{la} ante la presencia de un estímulo neutro como lo es el agua, su consumo aumenta equiparando al que se presenta cuando se da una solución dulce y al activar la C_{lp} el consumo disminuye equiparando al consumo de una solución amarga (Peng et al., 2015).

1.3 La neofobia y sus componentes

Una vez que el organismo identifica un alimento como novedoso, en algunas ocasiones este presenta una respuesta que se ha denominado neofobia, la cual está caracterizada por el consumo moderado y cauteloso del alimento en comparación al de uno familiar. Si este alimento no es asociado con una consecuencia negativa, aumentará el consumo de este alimento conforme aumenten las presentaciones, este proceso se le conoce como atenuación de la neofobia (AN). Por otro lado, si este alimento es asociado con alguna consecuencia negativa posterior al consumo, como lo puede ser la presentación de malestar gástrico, el consumo de este alimento se verá disminuido en las presentaciones

posteriores, lo que se conoce como condicionamiento de aversión al sabor (CAS) (Bermúdez-Rattoni, 2004; Domjan, 2018; Osorio-Gómez et al., 2018) (Figura 2).

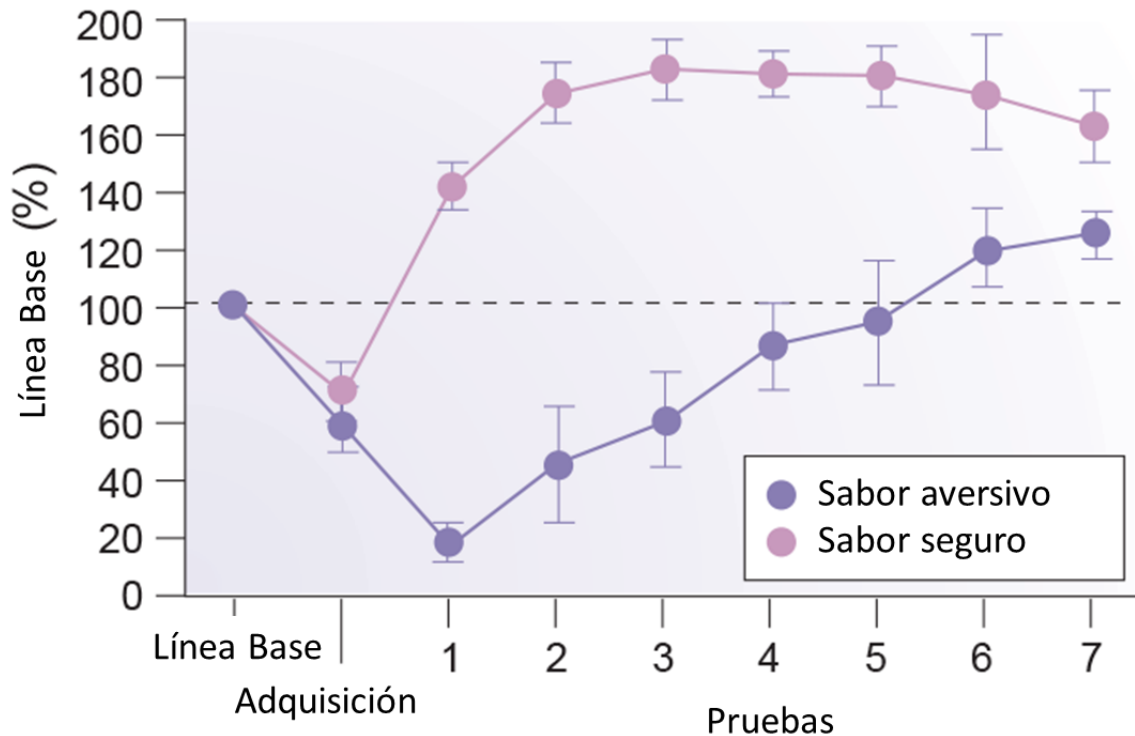


Figura 2. Atenuación de la neofobia y condicionamiento de aversión al sabor. En el trazo de color rosa se puede apreciar el patrón de consumo generado por la atenuación de la neofobia mientras que en el trazo violeta se representa el patrón de consumo generado por la asociación aversiva al sabor presentado (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

Las características que componen a la neofobia, es decir, que modifican su expresión y la intensidad de esta son: la valencia y saliencia del alimento, la motivación para consumir el alimento, la disponibilidad y el entorno en el que se encuentra el organismo durante la presentación del alimento (Domjan, 2018). Estas características han sido exploradas y descritas mediante el uso de modelos animales como la rata y el ratón de laboratorio. Con estos modelos para explorar la neofobia se ha utilizado la presentación de sabores dulces, utilizando soluciones de sacarina, la cual es un edulcorante no calórico por lo que carece de las consecuencias postingestivas de la sacarosa que tiene un aporte calórico significativo. Esta estrategia es muy efectiva ya que al tener la sacarina una valencia

positiva, es decir, el valor hedónico percibido por el animal es agradable, el aumento del consumo de la solución en las presentaciones posteriores es rápido y sobrepasa el consumo de una solución sin valor hedónico como lo es el agua en pocas sesiones (Bermúdez-Rattoni, 2004; Domjan, 2018).

Al mismo tiempo, la saliencia de la solución también juega un papel importante en la expresión de la neofobia. Mientras mayor sea la saliencia de la solución, la respuesta neofóbica será mayor y la atenuación modificará su velocidad (Gutiérrez Mendoza, 2004). Para las soluciones de sacarina, la saliencia corresponde a la concentración de la solución, sin embargo, la sacarina tiene un rango de preferencia que, si es sobrepasado, la valencia de la solución se convierte negativa generando aversión. El rango de preferencia es distinto entre las diferentes especies animales, para las ratas Wistar y Sprague-Dawley, ese rango varía entre los 0.1% y los 0.5% de concentración (Mook, 1974; Sclafani et al., 2010), mientras que para los ratones C57BL/6 este rango es mayor, al encontrarse entre los 0.1% y el 1% (Bachmanov et al., 2001; Fuller, 1974; Sclafani, 2007; Sclafani et al., 2010). Esto sugiere que, aunque ambas especies pueden generar preferencia por sacarina, la misma concentración es percibida de forma distinta generando una respuesta de neofobia y una atenuación diferente (Figura 3).

Es importante señalar que para que un animal consuma una solución novedosa de forma voluntaria, debe tener un estado motivacional interno suficiente para querer beber. Este efecto se ha logrado utilizando un protocolo de privación de agua durante varias horas previo a la presentación de la solución novedosa y presentando únicamente esta (Domjan, 2018). En consecuencia, al tener sed el animal, beberá de la solución presentada sin mucha dificultad, sin embargo, este protocolo puede enmascarar la respuesta neofóbica ya que el animal puede tener un consumo elevado de la solución novedosa para satisfacer la necesidad de agua independientemente del reconocimiento de la solución como novedosa.

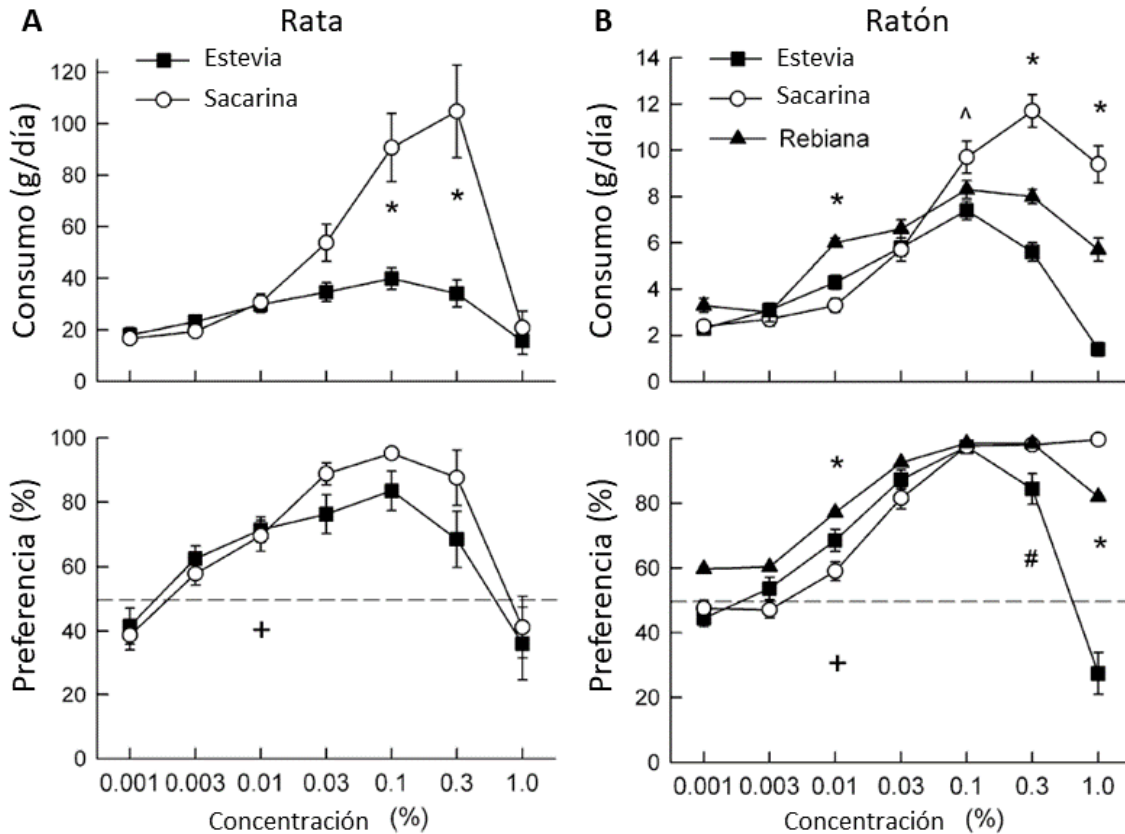


Figura 3. Curva de preferencia a diferentes edulcorantes en rata y ratón. A: Curva de preferencia a estevia y sacarina en ratas Sprague-Dawley. B: Curva de preferencia a estevia, sacarina y rebiana en ratones C57BL/6 (Modificado de Sclafani et al., 2010).

Este problema se puede abordar utilizando un protocolo de elección simple, que consiste en presentar dos bebederos, dónde uno de ellos contenga el sabor novedoso y el otro agua simple, de esta forma, al poder decidir el animal que opción consumir podrá saciar su sed al mismo tiempo que consume la solución novedosa.

No obstante, esta estrategia no es del todo efectiva en los ratones, ya que el consumo de agua promedio en un estado de abstinencia forzada de agua de 24 horas, es de aproximadamente 1 mL mientras que, en el mismo periodo de abstinencia, el consumo de agua de la rata Wistar es de aproximadamente 14 mL (Yiannakas & Rosenblum, 2017).

La familiaridad con un sabor también modifica la respuesta neofóbica que se puede presentar dónde una presentación previa de un mismo sabor a una concentración

baja es capaz de reducir la neofobia de el mismo sabor con una concentración más alta en una sesión posterior (Domjan, 2018). La familiaridad al mismo tiempo también modifica la fortaleza de la asociación de un alimento con un alimento novedoso en la formación de CAS en un proceso que se conoce como inhibición latente (Roman & Reilly, 2007).

La disminución de la respuesta neofóbica a consecuencia del aumento en el número de las presentaciones ha sido catalogada como un tipo de aprendizaje no asociativo, específicamente al que se refiere a la habituación (Domjan, 2018), sin embargo, como se mencionó anteriormente, para que una respuesta neofóbica y su posterior atenuación se presenten correctamente hay una gran influencia de diversos factores. Para que un animal consuma un alimento novedoso, existen bastantes pasos previos como la detección visual y olfativa de la fuente de alimento, la ubicación en el espacio físico donde se encuentra, el acercamiento a este, además, la ingesta misma del alimento y las consecuencias postingestivas que este genere también juegan un rol importante. Si bien no siempre las consecuencias postingestivas de un alimento responden a un aporte nutrimental, la saciedad de la sed o el hambre está presente en cada ocasión que un alimento es consumido, esta sensación de saciedad puede entonces tener un papel reforzador asociado al sabor del alimento presentado, volviendo al sabor mismo en un reforzador condicionado (Domjan, 2018).

La AN se puede entender entonces como la expresión de una memoria a largo plazo sobre un alimento que tuvo una respuesta postingestiva positiva, dicha memoria solamente requiere de una sesión de adquisición para consolidarse y que puede mantenerse en el organismo durante más de 40 días (Best et al., 1978). Esta memoria también se le ha conocido como memoria gustativa apetitiva, memoria gustativa incidental, memoria gustativa de reconocimiento y memoria gustativa segura, los cuales serán tomados como sinónimos del fenómeno conocido como AN.

2. Antecedentes

Para la formación de una memoria gustativa, ya sea apetitiva o aversiva, existe una amplia participación de diferentes estructuras cerebrales como lo es el NTS, NPB, el Núcleo Basalis Magnocelularis (NBM), la amígdala y la CI entre otras. Estas estructuras han sido estudiadas ampliamente en los dos tipos de memoria gustativa más relevantes que son el CAS y la AN usando diferentes estrategias experimentales que van desde las lesiones permanentes de ciertas regiones hasta la manipulación optogenética (Gil-Lievana et al., 2022; Gutiérrez, Rodríguez-Ortiz, et al., 2003; Gutiérrez, Téllez, et al., 2003; Koh et al., 2003; Peng et al., 2015; Rodríguez-García & Miranda, 2016; Rodríguez-Ortiz et al., 2005; Wang et al., 2018).

Una estrategia que se utilizó para identificar las estructuras cerebrales que participan en la neofobia fue cuantificar la expresión de la proteína c-Fos, la cual pertenece a la familia de genes de expresión temprana y que en neuronas se ha asociado a la generación de potenciales de acción, lo que en otras palabras se puede entender como un indicador de activación neuronal reciente (Herrera & Robertson-F, 1996). Sabiendo esto, se evaluó el número de núcleos positivos a c-Fos ante la presentación de una solución de sacarina novedosa y una familiar, donde se observó que en la CI y en la porción central de la amígdala (CeA) hubo un aumento significativo de cuerpos neuronales positivos a c-Fos cuando la sacarina fue novedosa comparado cuando la sacarina fue familiar. Este aumento no se encontró en la porción basolateral de la amígdala (BLA) ni en el NTS o el NPB (Koh et al., 2003). Esto indica que, durante el reconocimiento de un sabor novedoso, la CI y la CeA participan en la identificación de un sabor como novedoso que es distinta cuando este ya es familiar al presentar un aumento en la actividad de estas regiones.

Durante el siglo XX la investigación sobre diferentes procesos cognitivos utilizando lesiones en diferentes regiones del encéfalo generó una gran cantidad de información sobre la participación de diferentes áreas en gran cantidad de procesos, este modelo sigue siendo importante en la actualidad ya que una lesión permanente brinda información a largo plazo que no puede ofrecer una manipulación transitoria

como lo es la manipulación farmacológica (Vaidya et al., 2019). Bajo este paradigma, en 2014 se exploró la participación de la CI durante la neofobia y su atenuación a través de lesiones con ácido iboténico previo a la primera presentación de sacarina. Lo que se pudo observar fue que esta manipulación redujo la respuesta neofóbica sin alterar la curva de atenuación que se genera en las siguientes presentaciones. En el mismo trabajo cuando se realizó una inactivación transitoria utilizando bupivacaina, un bloqueador de los canales de sodio previo a la presentación de la sacarina novedosa, ni la neofobia o su atenuación no se vieron modificadas por lo que se sugiere que la IC no es totalmente necesaria para la neofobia o su atenuación, al menos no la información que genera activación por los canales de sodio (Moraga-Amaro et al., 2014).

Anteriormente se evaluó la participación de la actividad glutamatérgica y colinérgica en la CI realizando bloqueos de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) con ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico (AP5) y de los receptores muscarínicos con escopolamina antes de la presentación de sacarina novedosa. Ninguna de estas dos manipulaciones tuvo un efecto en la expresión de la neofobia, sin embargo, la respuesta neofóbica se volvió a presentar en la segunda presentación de sacarina en el grupo que fue tratado con escopolamina mas no así en el grupo que fue manipulado con AP5. En un segundo experimento la escopolamina fue infundida en la CI inmediatamente después de la primera presentación de sacarina lo que resultó nuevamente en la presentación de la respuesta neofóbica en la segunda presentación de sacarina. Esto resaltó que la acetilcolina (ACh) tiene un papel relevante en la consolidación de la memoria gustativa de reconocimiento en la IC, lo que en su ausencia retrasa la AN (Gutiérrez, Téllez, et al., 2003).

Dentro del mismo trabajo se analizó la ventana temporal que la escopolamina necesita para interrumpir la consolidación de la memoria gustativa, dónde se observó que el límite temporal para producir este efecto se encuentra hasta los 120 minutos. Además, cuando se realizó una nueva infusión de escopolamina en la segunda presentación de sacarina, se observó que al igual que en la primera presentación de sacarina, la escopolamina interrumpe la consolidación de la

memoria gustativa de reconocimiento demostrando que, aunque la sacarina ya había sido consumida varias veces esta aún seguía siendo reconocida como novedosa (Gutiérrez, Téllez, et al., 2003).

Posteriormente se analizó la actividad tanto de la CI como del NBM que es el origen de la inervación colinérgica de la CI, a través de la activación e inactivación de los receptores para ácido gamma-aminobutírico (GABA) el neurotransmisor inhibitor por excelencia del sistema nervioso central, utilizando muscimol, un agonista de los

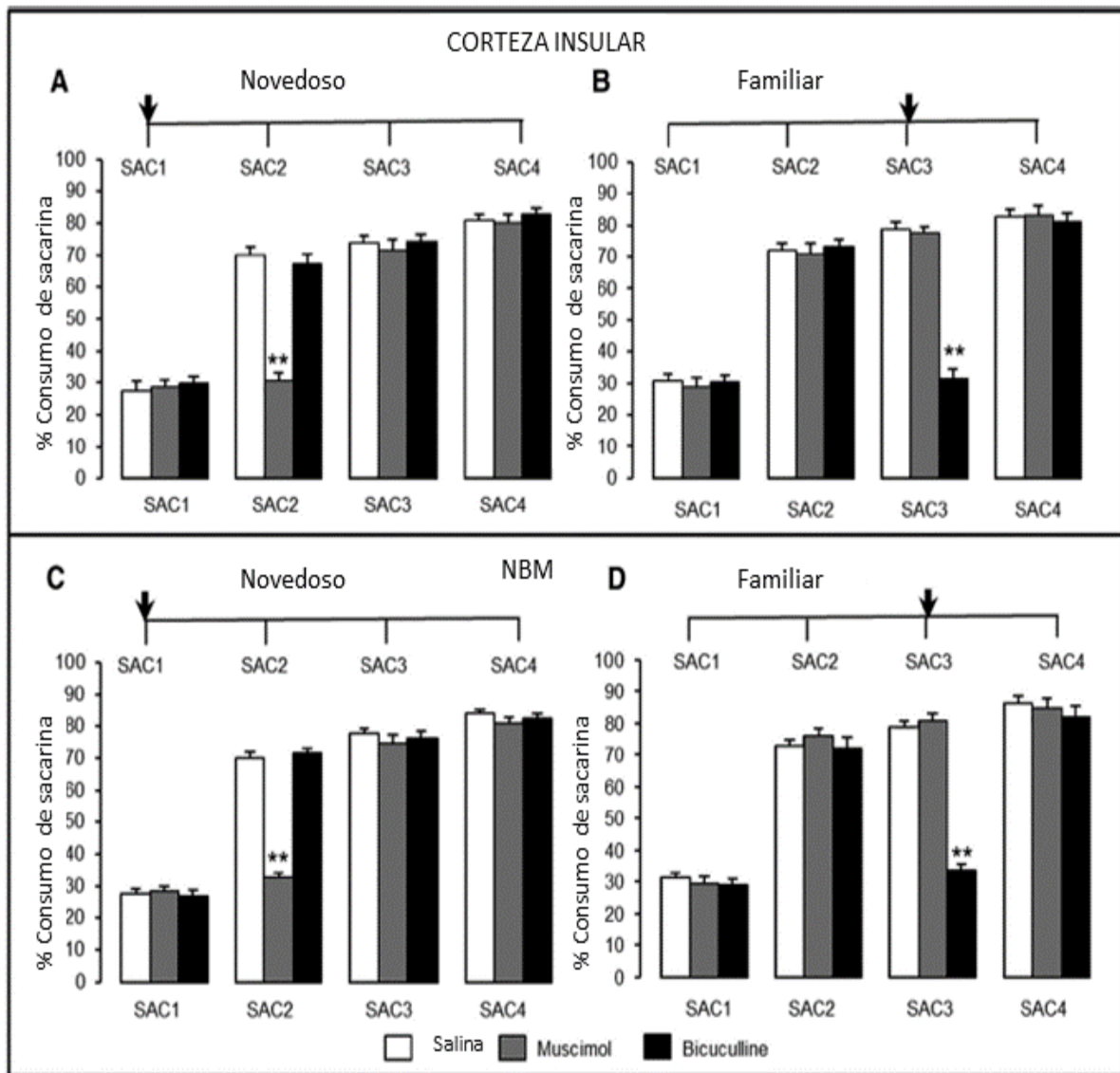


Figura 4. Efecto de la inhibición y activación de la CI y NBM mediante la infusión de muscimol o bicuculina en la atenuación de la neofobia a sacarina. (Modificado de Rodríguez-García, 2016).

receptores GABA_A y bicuculina un antagonista de los receptores GABA_A. Estos fármacos fueron infundidos en ambas regiones previo a la sacarina novedosa y posteriormente cuando ya era familiar, observando que cuando se inhibió la actividad de ambas regiones durante la primera presentación de sacarina, en ninguno de los casos se formó la memoria gustativa de reconocimiento o se alteró la expresión de neofobia. Sorpresivamente, cuando se activaron ambas regiones y la sacarina ya era familiar, se emitió una respuesta neofóbica robusta equiparable a la presentada en la primera presentación (Rodríguez-García & Miranda, 2016) (Figura 4).

Este resultado comprobó que la formación de la memoria gustativa de reconocimiento depende de ACh proveniente del NBM, además, que la respuesta neofóbica también depende de la presencia de ACh en la CI ya que se analizaron mediante microdiálisis los niveles de ACh en la CI en todas las condiciones del protocolo. Adicionalmente se cuantificaron los niveles de GABA en la CI cuando la sacarina es novedosa y también familiar observando que al momento de ser novedosa existe una reducción de GABA y cuando esta es familiar aumentan los niveles de GABA en la CI, lo que podría indicar que la actividad de ACh depende de una regulación a través del sistema GABAérgico (Rodríguez-García & Miranda, 2016).

Bajo este mismo discurso se realizaron inactivaciones de la CI y BLA utilizando una mezcla de muscimol y baclofen, el baclofen al igual que el muscimol es un antagonista de los receptores GABA, pero de su variante GABA_B lo que en consecuencia de la administración de este compuesto genera el bloqueo total de la señal GABAérgica en la región de interés. En este trabajo se pudo identificar que al inactivar tanto la CI como BLA previo a la primera presentación de sacarina, la respuesta neofóbica no se presentaba, sin embargo, si lo hacía en la segunda presentación para el grupo que fue manipulado en la CI, mientras que en el grupo que fue manipulado en BLA en la segunda presentación se presentó una respuesta atenuada equiparable con la del grupo control. Este efecto diferencial a los trabajos anteriores puede deberse a que la inactivación completa de la CI evita el

reconocimiento del sabor de la sacarina como novedoso que en consecuencia no permite que se genere una memoria gustativa de reconocimiento a este sabor (Lin et al., 2018).

Adicionalmente, con el objetivo de analizar la capacidad de la CI en la formación de la memoria al comparar dos concentraciones distintas de sacarosa donde la más baja señala la presentación de la más concentrada, se lesionó la CI con ácido quinolínico. Lo que se observó fue que las ratas no lesionados fueron capaces de modificar su conducta a lo largo de 10 sesiones, reduciendo el consumo de la sacarina menos dulce para poder beber una mayor cantidad de la más dulce, sin embargo, las ratas lesionados mantuvieron siempre un consumo de la sacarosa menos dulce. Para demostrar que la lesión no hubiera generado que las ratas fueran incapaces de discriminar entre ambas concentraciones estas fueron colocadas al mismo tiempo donde se observó que ambos grupos de ratas preferían la solución más dulce sobre la otra cuando fueron presentadas simultáneamente (Kesner & Gilbert, 2007). Este trabajo nos muestra que la CI no solo participa en la formación de la memoria de reconocimiento, sino que también en la formación de otros tipos de memoria que involucran estímulos gustativos y sus consecuencias como es esta memoria discriminativa.

Como se mencionó anteriormente la CI tiene una representación topológicamente distinta para cada cualidad de sabores teniendo una mayor representación del sabor dulce en la CIa y los sabores amargos en la CIp (Chen et al., 2011). Utilizando como punto de referencia esta distribución en la CI, se propuso que la activación de estas zonas tendría como consecuencia la expresión de conductas relacionadas con los componentes apetitivos de los sabores dulces o las conductas aversivas de los sabores amargos. Para esto utilizaron optogenética, una herramienta que permite manipular la actividad celular a través de la expresión de proteínas fotosensibles en neuronas, esta tecnología permite activar o inhibir cierto grupo neuronal completo dependiendo del vector viral utilizado para la expresión de dichas proteínas (Engelhard et al., 2018; Fernandez-Ruiz et al., 2022; Mohammad et al., 2017; Sparta et al., 2013).

Bajo este paradigma se transfectaron canales de Channelrodopsina (ChR2), un canal iónico que permite la entrada de iones positivos ante la presencia de luz azul (~470 nm) (Jiang et al., 2017) en Cla o Clp de ratones C57BL/6 con los cuales se realizó la activación de esta región bajo un protocolo de preferencia de lugar en tiempo real dentro de una arena de dos compartimentos dónde solamente se activó la Cla o Clp en uno de ellos. En consecuencia, observaron que los ratones a los que se activó optogenéticamente la Cla generaron una preferencia por este compartimento mientras que a los que se activó a Clp generaron evitación. Adicionalmente se realizó activación de estas cortezas ante la presentación de una solución de agua simple y midieron el número de lengüeteos mientras se les presentaba el bebedero, observando que cuando se activa Cla aumenta el número de lengüeteos y cuando se activa la Clp estos disminuyen, aunque sean el mismo estímulo (Peng et al., 2015). Estos resultados confirman la hipótesis de que la Cla por sí misma genera una respuesta apetitiva y que la Clp genera una respuesta aversiva.

Posteriormente exploraron las proyecciones de estas cortezas hacia la amígdala, donde observaron que la Cla tiene una mayor proyección hacia BLA y por otro lado la Clp tiene mayores proyecciones hacia CeA (Wang et al., 2018). En esta ocasión realizaron la transfección de los canales de ChR2 en la Cla o Clp y colocaron las fibras de estimulación sobre BLA o CeA con el objetivo de controlar la actividad de estas proyecciones sobre el núcleo de la amígdala correspondiente. Utilizaron la misma estrategia dónde manipularon la actividad de las proyecciones ante la presencia de agua simple donde observaron un efecto similar que en el trabajo de 2015 cuando activaron los somas neuronales. Como siguiente paso presentaron dos soluciones distintas, una amarga (quinina) y otra dulce (acesulfame potásico (AceK)), cuando estas soluciones fueron presentadas los ratones exhibían muy pocos lengüeteos a la quinina y bastantes más al AceK, lo que se relaciona con las características intrínsecas de cada sabor. Sin embargo, cuando presentaron AceK mientras activaban las proyecciones de Clp en CeA los ratones exhibieron un número de lengüeteos equiparables cuando se presentó quinina y de la misma forma cuando se presentó quinina mientras se activaban las proyecciones de la Cla en BLA, el número de lengüeteos aumentó significativamente (Wang et al., 2018).

Con estos trabajos queda claro que la CI anterior y posterior no solamente responden de forma distinta a la cualidad dulce o amarga de los sabores, sino que también participan en la expresión de una respuesta conductual distinta dependiente de la cualidad del sabor.

Más recientemente, se analizó la participación de la CI en la toma de decisiones utilizando como herramienta la ejecución de una respuesta motora ante la presentación de un sabor. De esta forma se desarrolló una tarea donde ante la presencia de uno de cuatro sabores distintos, dos dulces y dos amargos, los ratones exhibían una respuesta de lengüeteo en uno de dos bebederos sin agua, de tal forma que tras una sesión de entrenamiento los ratones asociaron un sabor amargo y uno dulce a un bebedero, así como el otro sabor dulce y amargo al otro bebedero. Mediante registro electrofisiológico se observó que las neuronas de la CI respondieron de forma diferencial cuando la respuesta conductual es distinta en el periodo posterior a la presentación del sabor, es decir, la actividad neuronal en la CI fue similar para un sabor dulce y uno amargo siempre y cuando tuviera que responder al mismo bebedero. Con el fin de identificar qué tipo de información codificada por esta actividad diferencial en la CI se procedió a activar optogenéticamente interneuronas GABAérgicas de la CI mientras los sabores eran presentados o en el periodo entre la identificación del sabor y la emisión de la respuesta conductual. En consecuencia, se observó que la inhibición de la CI mientras los sabores fueron presentados no alteró su desempeño conductual, mientras que la inhibición de la CI en el periodo entre la identificación del sabor y la emisión de la respuesta evitó que la respuesta fuera expresada correctamente (Vincis et al., 2020). Estos resultados señalan que la CI participa en el mantenimiento de la información relacionada a la consecuencia de cada sabor presentado, más allá de su identidad, sino también de las consecuencias asociadas a este sabor.

Adicionalmente, se ha observado que la actividad dopaminérgica que llega a la CI que proviene del área ventral tegmental (VTA) está directamente relacionada con la saliencia percibida de los estímulos gustativos. Esto fue demostrado utilizando la

estimulación optogenética tanto en VTA como de las proyecciones dopaminérgicas en la CI de esta región a través de ChR2. Al activar este canal fotosensible aumentaba la respuesta neofóbica durante la primera presentación de sacarina y de quinina, al día siguiente cuando estas soluciones eran presentadas al mismo tiempo que una alternativa que solo contenía agua, los ratones presentaron una mayor preferencia por la sacarina, que los ratones cuya estimulación no activó los canales de ChR2 y que bebieron la misma concentración de sacarina. Por otro lado, se mostró una mayor aversión por la quinina del grupo estimulado de la misma forma que se vio con sacarina (Gil-Lievana et al., 2022). Gracias a este trabajo podemos señalar que la señal dopaminérgica proveniente del VTA en la CI modula la saliencia de un estímulo gustativo modificando la memoria de reconocimiento asociada a este.

El uso de herramientas de manipulación de la actividad neuronal como lo es la optogenética permite aumentar la especificidad espacial al solo tener inferencia sobre el grupo neuronal o sus proyecciones que expresen las proteínas fotosensibles y que sean alcanzadas por el haz de luz adecuado. También posee una mayor resolución temporal al tener efecto solamente mientras la luz se encuentra presente, lo que puede ocurrir en la escala de milisegundos (Sparta et al., 2013 Jiang, 2017). Con esta herramienta podemos identificar con una mayor precisión la participación de la CI en la formación de la memoria gustativa de reconocimiento al interferir en la actividad de esta región solamente durante la presentación de un estímulo novedoso como es la sacarina, sin embargo, los ratones del laboratorio que son el modelo ideal para trabajar con esta técnica carecen de un protocolo de AN que presente una respuesta neofóbica robusta y una curva de atenuación clara por lo cual, es necesario primero identificar un modelo de AN que se ajuste a las características de consumo y preferencia de los ratones C57BL/6.

3. Planteamiento del problema

La neofobia es una respuesta conductual vital para la supervivencia de un organismo, que en conjunto con la AN le permiten aprender a reconocer los alimentos óptimos para su vida. Pese a que ya se ha identificado anteriormente que la Cla es una región que es necesaria para la expresión de neofobia y AN, aún es necesario identificar con mayor precisión cual es el papel que juega esta región en ambos procesos. La optogenética es una herramienta que nos brinda de una especificidad temporal y espacial ideal para investigar con mayor detalle el papel de la Cla, sin embargo la mayoría de los trabajos que se han dedicado a investigar el papel de esta región se han realizado en ratas, y ya que esta herramienta es más difícil de trabajar en ratas, en este trabajo fue necesario en primer lugar identificar un protocolo de AN en ratones C57BL/6 que presente una respuesta neofóbica robusta y una atenuación rápida, para posteriormente examinar mediante optogenética el papel de la Cla en la AN, por lo cual se realizaron dos experimentos. El primero donde se evaluó la AN en ratones C57BL/6 a dos concentraciones altas de sacarina en dos formas de presentación distintas. En el segundo seleccionando el mejor protocolo, se inhibió o activó la Cla mientras la sacarina fue presentada por primera ocasión para analizar su efecto en la AN.

4. Hipótesis

H1: La inactivación optogenética de la corteza insular anterior retrasará la AN a sacarina en ratones C57BL/6.

H2: La activación optogenética de la corteza insular anterior acelerará la AN a sacarina en ratones C57BL/6.

5. Objetivos

Evaluar el efecto de la manipulación optogenética de la corteza insular anterior durante la neofobia a sacarina y su atenuación en ratones C57BL/6.

5.1 Objetivos específicos

O1: Identificar un protocolo de AN a sacarina en ratones C57BL/6 utilizando dos concentraciones altas de sacarina y dos formas de presentación.

O2: Evaluar el efecto de la inactivación optogenética de la corteza insular anterior durante la neofobia a sacarina y su atenuación en ratones C57BL/6.

O3: Evaluar el efecto de la activación optogenética de la corteza insular anterior durante la neofobia a sacarina y su atenuación en ratones C57BL/6.

6. Metodología

6.1 Experimento 1: Identificación de un protocolo de AN en ratones C57BL/6

6.1.1 Sujetos

Se utilizaron 27 ratones C57BL/6 mayores de 4 semanas de edad (S0.5-1B n=6, S0.5-2B n=6, S1-1B n=10, S1-2B n=5), los cuales se mantuvieron hospedados de forma individual en un ciclo de luz oscuridad de doce horas con acceso a agua y comida *ad libitum* hasta el momento antes de la intervención.

6.1.2 Neofobia y atenuación de la neofobia

Los ratones fueron sometidos a un protocolo de privación de agua por 16 horas. En la primera presentación de agua del día, los ratones fueron colocados en un tazón de acrílico de 36 cm de altura por 40 cm de diámetro en donde se colocó uno o dos bebederos con 10 mL agua durante 20 minutos, la cantidad de agua consumida fue medida utilizando como referencia el peso del bebedero. Esto se repitió hasta que por 4 días consecutivos el consumo fuera estable, lo que fue considerado como la línea base (LB).

Al día siguiente, para el protocolo de un bebedero, el agua fue sustituida por una solución de sacarina al 0.5% o 1%, la cual fue presentada por los siguientes tres días. Para el protocolo de dos bebederos, sólo uno de los bebederos fue sustituido por una solución de sacarina al 0.5% o 1% la cual fue presentada por los siguientes cuatro días (Figura 5).

La segunda presentación de agua del día se realizó ocho horas después en su caja hogar donde fue colocado un bebedero con agua por 20 minutos todos los días que se realizó el protocolo para todos los grupos.

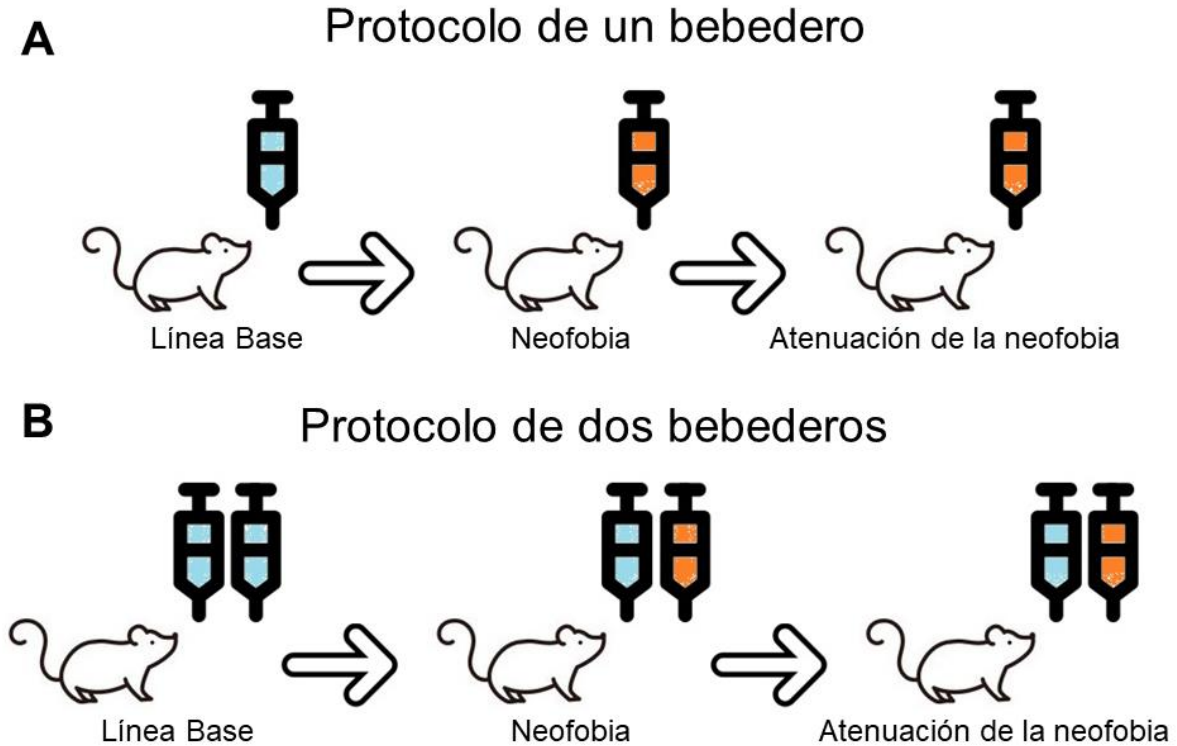


Figura 5. Representación esquemática de la presentación de soluciones en ambos protocolos. A: Protocolo de un bebedero. B: Protocolo de dos bebederos.

6.1.3 Análisis de los resultados

El valor correspondiente a la LB se obtuvo promediando el consumo de las últimas cuatro sesiones. Posteriormente los datos fueron normalizados, para el protocolo de un bebedero el consumo fue normalizado en porcentaje, donde el consumo promedio durante la LB corresponde al 100 por ciento y el consumo de las sesiones sacarina 1 (S1) a sacarina 4 (S4) se convirtió con base en el consumo promedio de la LB, posteriormente se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía para medidas repetidas. Para el protocolo de dos bebederos el consumo se reporta en índice de preferencia que se calcula dividiendo el volumen de cada bebedero sobre el volumen de consumo total de la sesión, posteriormente se realizó una prueba ANOVA de dos vías para medidas repetidas.

6.2 Experimento 2: Manipulación optogenética de Cl_a en la neofobia a sacarina

6.2.1 Sujetos

Se utilizaron 27 ratones C57BL/6 de ocho semanas de edad (eNpH3.0+: n=8, eNpH3.0-: n=7, ChR2+: n=5, ChR2-: n=7), los cuales se mantuvieron hospedados de forma individual en un ciclo de luz/oscuridad de doce horas con acceso a agua y comida *ad libitum* hasta el momento antes de la intervención.

6.2.2 Transfección de los proteínas fotosensibles

Se realizó una cirugía estereotáxica para transfectar un adenovirus que permite la expresión de una proteína de halorodopsina (AAV5/CaMKII α -eNpH3.0-eYFP) (Grupo eNpH3.0+), un proteína de chanelrodopsina (AAV5/CaMKII α -hChR2(H134R)-eYFP) (Grupo ChR2+) o de un adenovirus que no expresa una proteína fotosensible (AAV5/CaMKII α -eYFP) (Grupos eNpH3.0- y ChR2-) en neuronas piramidales de la corteza insular anterior (AP: +1.9; ML: \pm 2.8; DV: -2.4 de acuerdo con Paxinos, 2004 (Figura 6). Durante la misma cirugía se implantaron fibras ópticas de estimulación (0.22 NA, diámetro 62,5 μ m, Thorlabs, USA) 0.2 mm sobre el área de transfección, las cuales fueron fijadas al cráneo utilizando cemento dental. Los ratones tuvieron un periodo de recuperación de 5 semanas para la correcta expresión de las proteínas fotosensibles tras las cuales fueron sometidos a la intervención conductual.

6.2.3 Inhibición y activación de la Cl_a durante la neofobia

Se utilizó el mismo protocolo descrito anteriormente utilizando el protocolo de un bebedero a la concentración de 0.5% de sacarina.

En los grupos eNpH3.0+ y eNpH3.0-, durante la primera sesión de sacarina (neofobia) se fotoinhibió la Cl_a durante toda la sesión utilizando un pulso continuo de luz continuo de 532 nm de 10-12 mW utilizando un láser de 150 mW de OEM Laser Systems, USA. Estos parámetros fueron usados en el trabajo de Gálvez-Márquez et al., (2022). (Figura 7A).

En los grupos ChR2+ y ChR2-, durante la primera sesión de sacarina (neofobia) se fotoactivó la Cla durante toda la sesión utilizando un pulso de 10 Hz (5ms, 1s on/2s off) de luz de 473 nm de 10-12 mW utilizando un láser de 150 mW de OEM Laser Systems, USA. Parámetros modificados de Gehrlach et al., (2019) (Figura 7B).

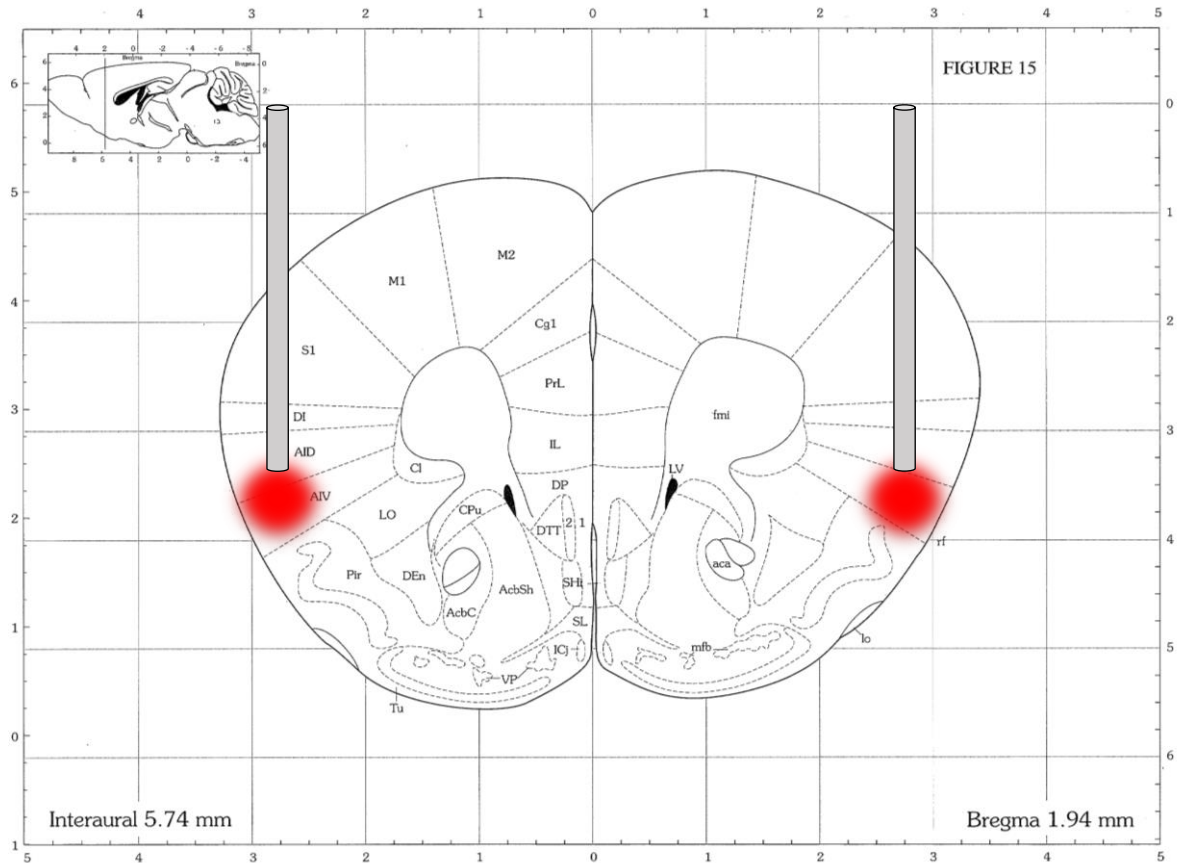


Figura 6. Representación visual de la zona de transfección de las proteínas fotosensibles y de la implantación de las fibras ópticas (Modificado de Paxinos & Franklin, 2019).

6.2.4 Análisis de los resultados

El valor correspondiente a LB se obtuvo promediando el consumo de las últimas 4 sesiones. Posteriormente los datos fueron normalizados en porcentaje, donde el consumo promedio durante la LB corresponde al 100 por ciento y el consumo de las sesiones de sacarina 1 (S1) a sacarina 4 (S4) se convirtió con base en el consumo

promedio de la LB, posteriormente se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para medidas repetidas.

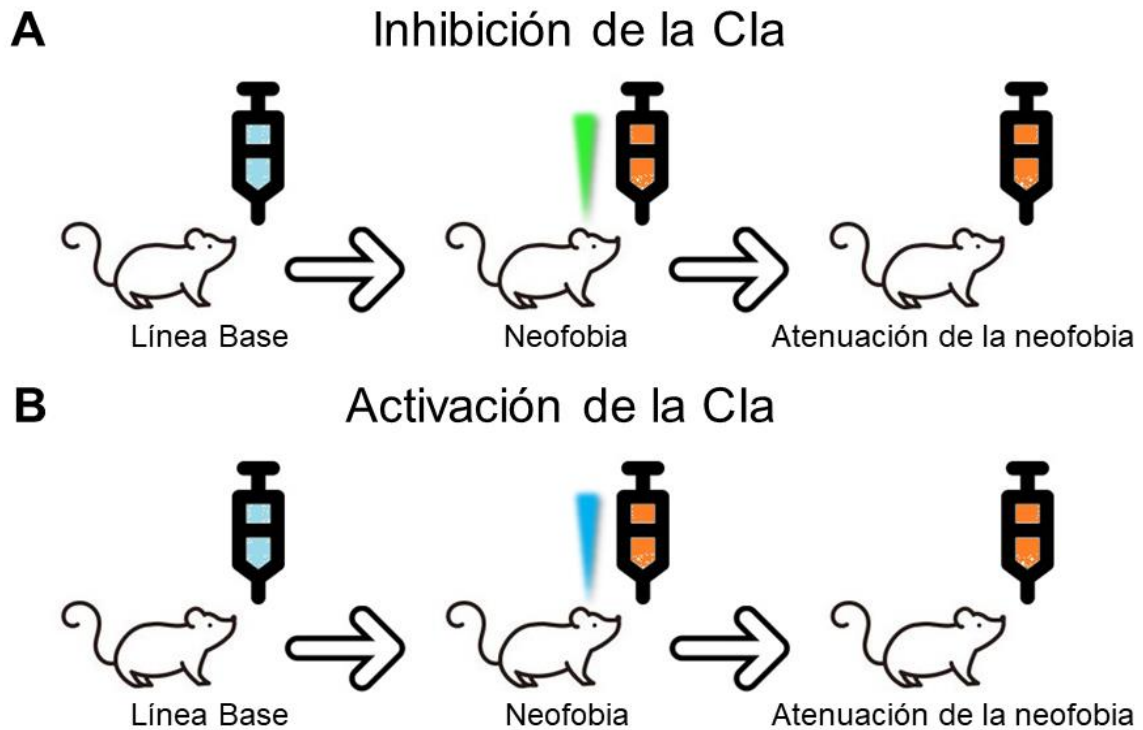


Figura 7. Representación esquemática del momento de la manipulación optogénica de la Cla. A: Inhibición de la Cla durante la neofobia a sacarina. B: Activación de la Cla durante la neofobia a sacarina.

6.2.5 Confirmación histológica de la transfección

Al término del protocolo se administró una dosis letal de pentobarbital sódico, una vez que ya no se exhibieron reflejos se realizó una perfusión transcardiaca con 10 mL de solución salina al 0.9% seguida de 10 mL de paraformaldehído al 4% en un buffer de fosfatos 0.1M para extraer el cerebro. Los cerebros se mantuvieron por 24 horas en paraformaldehído al 4% para que se fijaran correctamente, después fueron cambiados a una solución de sacarosa al 30% durante cuatro días para crioprotección. Se obtuvieron cortes coronales de 40 μm en un criostato a -20°C que se mantuvieron en flotación en un buffer de tris base 0.1M (TBS). Los cortes fueron seleccionados y posteriormente fueron sometidos a un baño con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 0.1M para marcar los núcleos. Finalmente se capturaron

imágenes de la zona de infección y la fibra óptica utilizando el microscopio confocal invertido ZEISS LSM 800.

7. Resultados

7.1 Experimento 1: Identificación de un protocolo de AN en ratones C57BL/6

7.1.1 Protocolo de un bebedero

Se comparó el porcentaje de consumo de la LB con el consumo en las sesiones posteriores de sacarina al 0.5% (S1-S4) utilizando una prueba ANOVA de una vía de medidas repetidas ($F_{(4,20)} = 15.81, P < 0.0001$), se encontraron diferencias estadísticamente significativas a lo largo de las sesiones. El análisis *post hoc* de Bonferroni mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las sesiones S1 vs. S2-

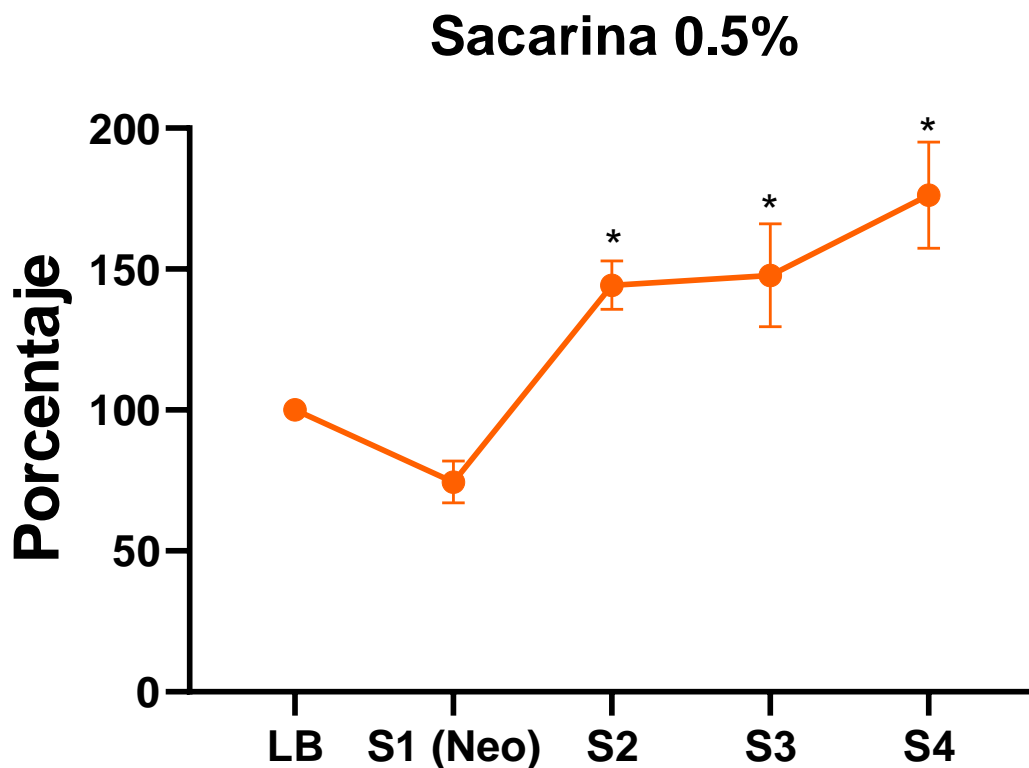


Figura 8. Consumo de sacarina al 0.5% en un bebedero. Consumo de sacarina representado en porcentaje dónde el 100% corresponde al promedio de consumo en la línea base (LB). Se observa una respuesta neofóbica leve en S1 que atenúa velozmente a partir de S2. El ANOVA de una vía de medidas repetidas mostró diferencias a través de las sesiones, el análisis *post hoc* de Bonferroni señaló entre las sesiones S1 vs. S2-S4 (* = $p < 0.05$).

Sacarina 1%

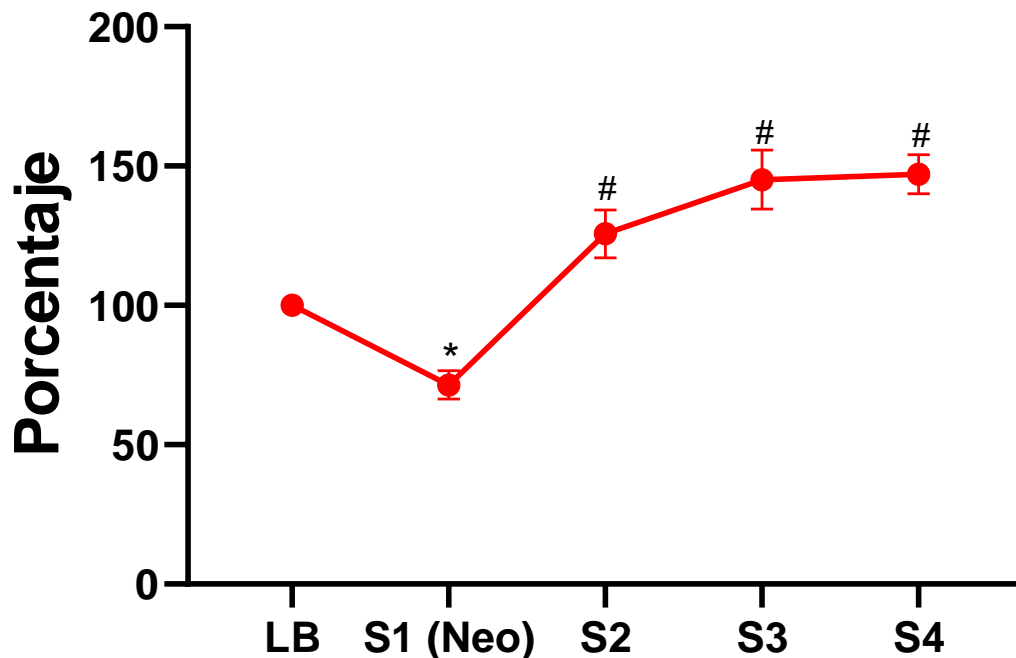


Figura 9. Consumo de sacarina al 1% en un bebedero. Consumo de sacarina representado en porcentaje, dónde el 100% corresponde al promedio de consumo en la línea base (LB). Se observa una respuesta neofóbica fuerte ($P=0.0003$) en S1 con una atenuación rápida a partir de S2. El ANOVA de una vía de medidas repetidas mostró diferencias a través de las sesiones, el análisis *post hoc* de Bonferroni señaló entre las sesiones LB vs S1 ($*= P < 0.05$) y entre las sesiones S1 vs. S2- S4 ($\# = P < 0.05$).

S4, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre las sesiones LB vs. S1. Esto indica que pese a que se observa una tendencia a disminuir el consumo de sacarina durante la primera presentación que corresponde a la neofobia esta no resultó significativa estadísticamente. Sin embargo, posterior a esta sesión el consumo de sacarina aumenta más del 40% de la LB, lo que se puede interpretar como AN a sacarina (Figura 8).

Se comparó el porcentaje de consumo de la LB con el consumo en las sesiones posteriores de sacarina al 1% (S1-S4) utilizando una prueba ANOVA de una vía de medidas repetidas ($F_{(4,36)} = 27.50, P < 0.0001$), se encontraron diferencias estadísticamente significativas a lo largo de las sesiones. El análisis *post hoc* de

Bonferroni mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las sesiones LB vs. S1 y S1 vs. S2-S4. Esto reveló que la solución de sacarina al 1% presentó en S1 una respuesta neofóbica fuerte que se atenuó velozmente en las sesiones posteriores (Figura 9).

7.1.2 Protocolo de dos bebederos

Al comparar el consumo cuando se presentan dos opciones simultáneas a través de un índice de preferencia de consumo, cuando se presentó en una de ellas sacarina al 0.5%, la prueba ANOVA de dos vías ($F_{(5, 50)} = 18.54$, $P < 0.0001$) mostró diferencias estadísticas a lo largo de las sesiones. El análisis de Bonferroni *post hoc* posterior mostró una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la sesiones S1, S3, S4 y S5. Este resultado indica que, durante la LB, la preferencia de ambos bebederos es equivalente mientras que en S1 se muestra una fuerte preferencia por la opción de agua que se revierte a partir de S3 (Figura 10).

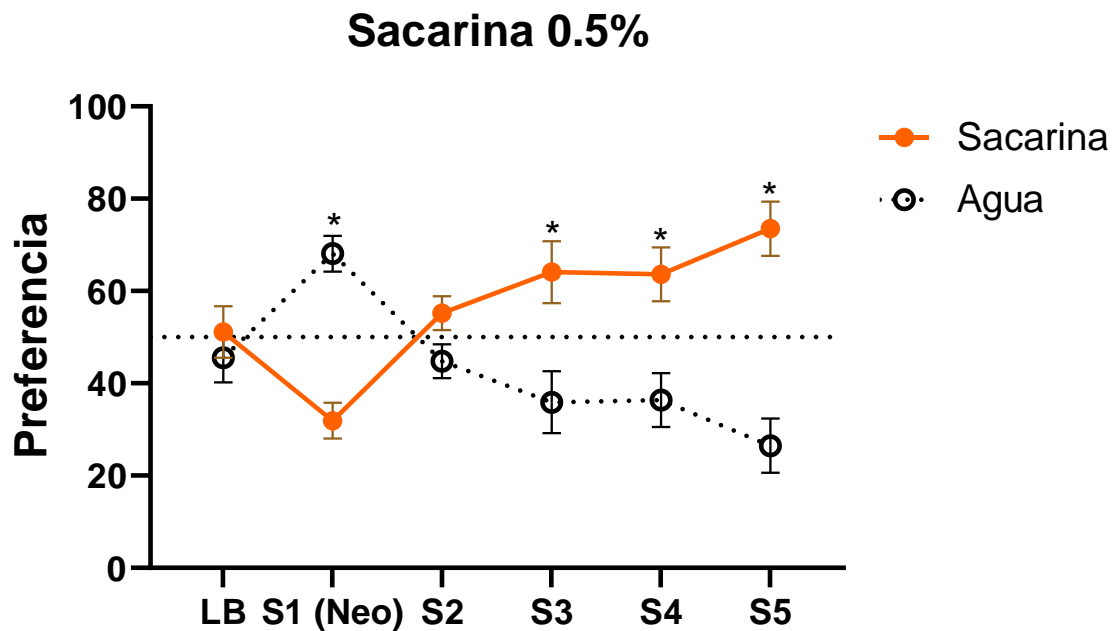


Figura 10. Consumo por cada bebedero, la línea punteada representa el 50% de preferencia. Se observa que no hay preferencia cuando ambas opciones son iguales ($P > 0.9999$). Posteriormente durante la presentación se sacarina novedosa en S1 se presenta una fuerte preferencia por la opción que contiene agua ($P < 0.0001$) que se revierte a partir de S3. El ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró diferencias significativas en las sesiones, el análisis *post hoc* de Bonferroni señaló en las sesiones S1, S3, S4 y S5 ($* = P < 0.05$)

Al comparar el consumo cuando se presentan dos opciones simultaneas a través de un índice de preferencia de consumo, cuando se presentó en una de ellas sacarina al 1%, la prueba ANOVA de dos vías ($F_{(5, 40)} = 19.40, P < 0.0001$) mostró diferencias estadísticas a lo largo de las sesiones. El análisis *post hoc* de Bonferroni mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en las sesiones S1 y S5. Esto indica que durante la LB la referencia por ambas opciones es equivalente mientras que en S1 se muestra una fuerte preferencia por la opción de agua ($P < 0.0001$), que se empieza a revertir a partir de S3, pero no se vuelve significativo hasta S5 ($P < 0.0001$) (Figura 11).

Tanto la sacarina a concentración media como alta lograron generar una respuesta neofóbica robusta en ambos protocolos, mostrando una mayor respuesta neofóbica cuando se utilizó la concentración de 1% de sacarina. Sin embargo, la AN tiene una

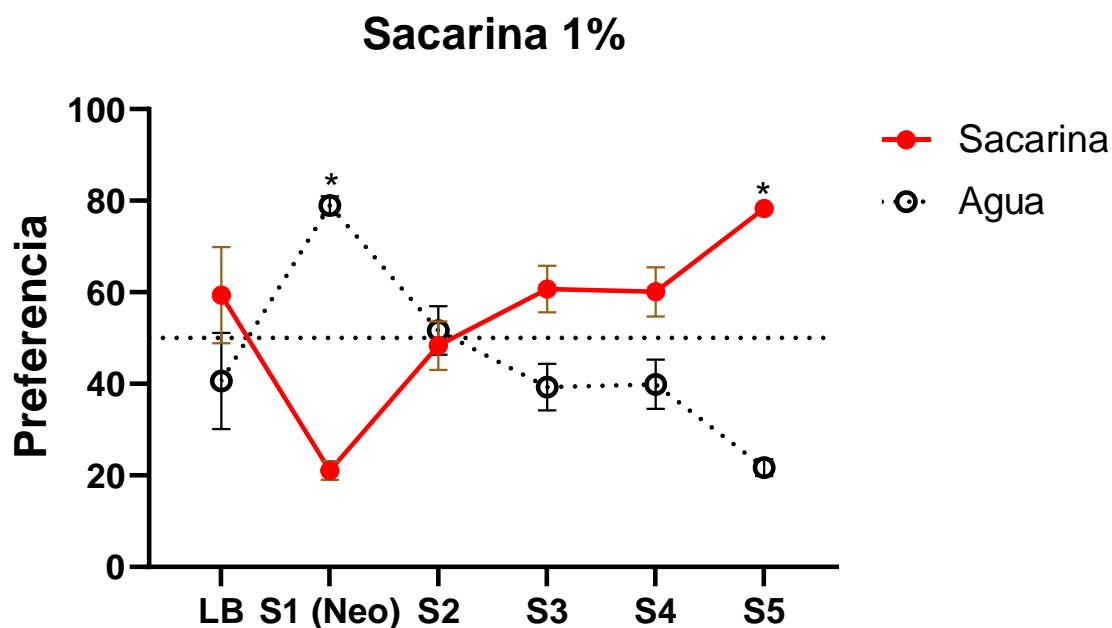


Figura 11. Consumo por cada bebedero, la línea punteada representa el 50% de preferencia. Se observa que no hay preferencia por ningún bebedero cuando ambas opciones son iguales ($P = 0.1597$). Posteriormente durante la presentación se sacarina novedosa en S1 se presenta una fuerte preferencia por la opción que contiene agua ($P < 0.0001$) que se revierte en S3 y se vuelve significativa hasta S5. El ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró diferencias significativas en las sesiones que el análisis *post hoc* de Bonferroni señaló en las sesiones S1 y S5 (*= $P < 0.05$)

curva de aprendizaje más rápida y con un valor máximo más alto cuando se utilizó la concentración de 0.5% en ambos protocolos con una mayor relevancia con un bebedero. Ya que ambos protocolos en ambas concentraciones lograron representar correctamente el fenómeno deseado se tuvo en consideración otros factores para considerar a una de estas cuatro versiones como el modelo a utilizar como lo fue el volumen de agua consumida total por cada sesión. Los ratones C57BL/6 al ser animales de una talla pequeña, con un periodo de privación de agua de 18 horas consumieron una cantidad total de agua de 0.9 mL en promedio por sesión.

Tomando esto en consideración cuando se analiza el protocolo de dos bebederos el volumen promedio de consumo por cada bebedero es de 0.45 mL y ya que una sola gota de agua puede albergar hasta 0.25 mL de agua, el error que se puede producir cuando una sola se derrame puede ser bastante significativo. Por este motivo, pese a que la interpretación que ofrece el protocolo de un bebedero es más clara ya que al amortiguar la variable producida por la sed de los animales, resulta más adecuado el protocolo de un bebedero dónde el efecto de la pérdida de volumen puede verse mejor amortiguado y el efecto de la sed producida por la privación de agua no muestra un efecto relevante.

Cuando se analiza la neofobia y la atenuación producida en el protocolo de un bebedero entre ambas concentraciones podemos observar que, aunque la respuesta neofóbica producida por la sacarina al 0.5% es menor, la atenuación que produce es mayor que la que genera la concentración al 1%. Esto puede ser consecuencia a que la concentración de 1% se encuentra cerca del límite de preferencia por sacarina ya que al ser un estímulo más saliente genera una repuesta neofóbica mayor la concentración al 0.5%, que al estar en el centro de la curva de preferencia genera una preferencia más fuerte teniendo una atenuación a la neofobia más rápida y alta. Con esto en consideración se decidió utilizar en adelante el protocolo de un solo bebedero a la concentración de 0.5%.

7.2 Experimento 2: Manipulación optogenética de Cla en la neofobia a sacarina

7.2.1 Confirmación histológica de la transfección

La imagen representativa obtenida muestra que la expresión de las proteínas fotosensibles se encuentra en la Cla, así mismo, la fibra óptica de estimulación se encuentra sobre la zona de expresión lo que permitió que el haz de luz incidiera correctamente sobre la Cla (Figura 12).

7.2.2 Inhibición de la Cla durante la neofobia a sacarina

Al comparar el consumo entre el grupo eNpH3.0+ y eNpH3.0- cuando se inhibió la Cla durante la presentación de sacarina al 0.5% utilizando una prueba ANOVA de dos vías ($F_{(3, 39)} = 20.57$, $P < 0.0001$) se encontraron diferencias estadísticas a lo largo de las sesiones, que el análisis *post hoc* de Bonferroni reveló una diferencia significativa ($P < 0.05$) durante la sesión S2. Este resultado indica que la respuesta neofóbica se presentó de nuevo durante la segunda presentación de sacarina en el grupo eNpH3.0+ mientras que esta respuesta ya se había atenuado en el grupo eNpH3.0- (Figura 13).

7.2.3 Activación de la Cla durante la neofobia a sacarina

Al comparar el consumo entre el grupo ChR2+ y ChR2- cuando se activó la Cla durante la presentación de sacarina al 0.5% utilizando una prueba ANOVA de dos vías ($F_{(3, 30)} = 40.00$, $P < 0.0001$) se mostraron diferencias estadísticas a lo largo de las sesiones, que el análisis *post hoc* de Bonferroni reveló una diferencia significativa ($P < 0.05$) durante la sesión S2. Este resultado indica que la AN se vio acelerada durante la sesión S2 (Figura 14).

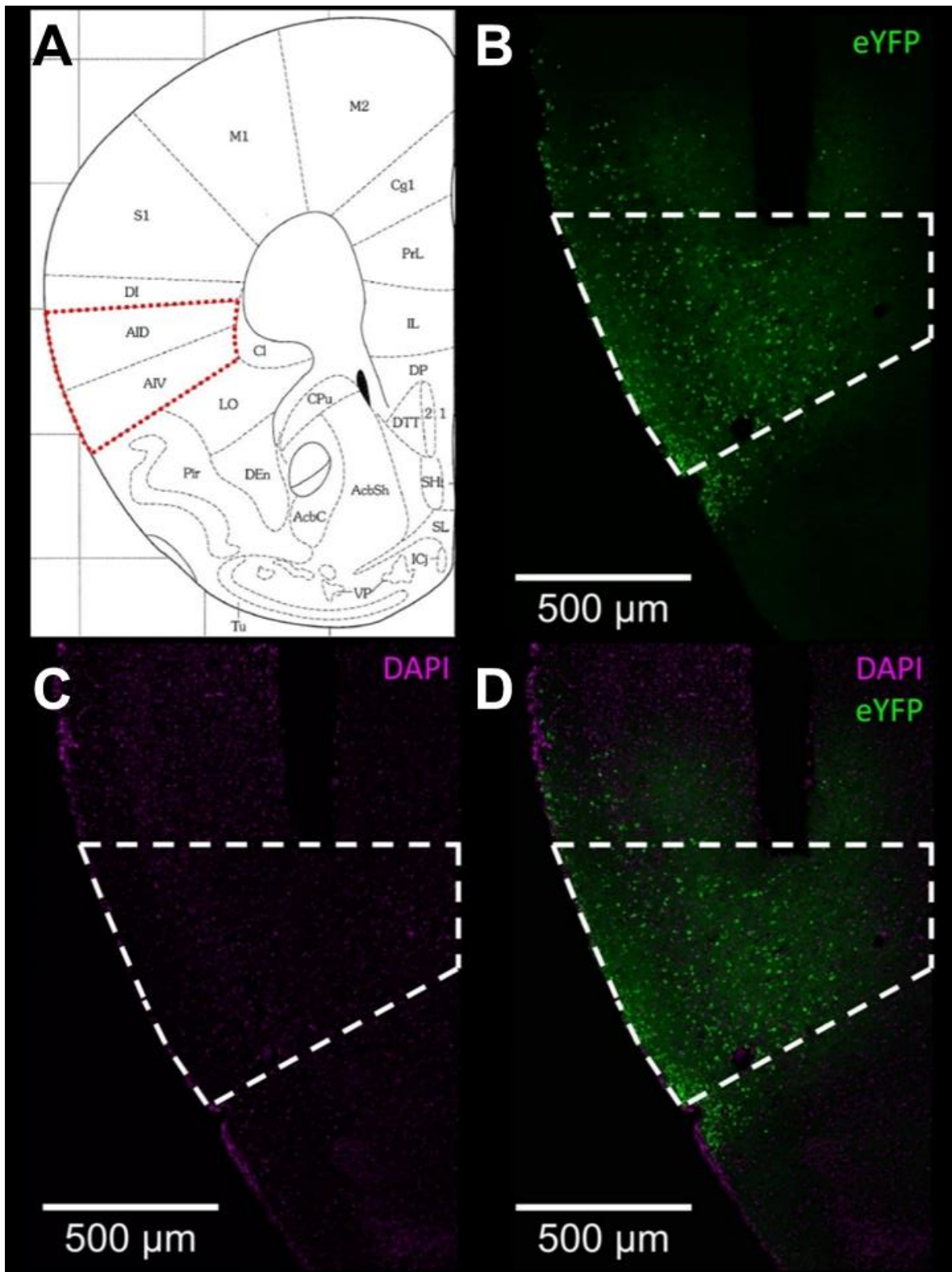


Figura 12. Imagen representativa de la expresión de las proteínas fotosensibles. A: Lámina coronal del cerebro de ratón donde se marca en la línea punteada de color rojo la CIa. B: Expresión de los canales fotosensibles a través de la proteína reportera eYFP en color verde, donde además se observa la fibra óptica de estimulación sobre la zona de transfección. C: Marcaje fluorescente de los núcleos celulares a través de la tinción DAPI. D: Unión de los canales eYFP y DAPI donde se observa la expresión de los canales fotosensibles en la CIa marcada con la línea punteada y la fibra óptica de estimulación.

Inhibición de Cla en la neofobia

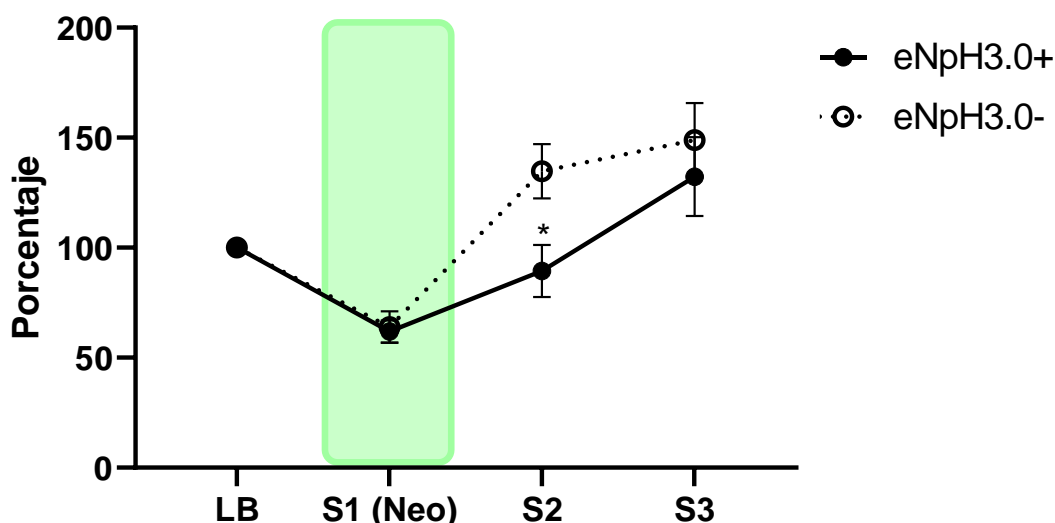


Figura 13. Efecto de la inhibición de la Cla en la atenuación de la neofobia a sacarina. Se puede observar la curva de atenuación a la neofobia a sacarina dónde el grupo eNpH3.0- presenta atenuación de la neofobia desde la sesión S2 mientras que el grupo eNpH3.0+ cuya Cla fue inhibida durante S1, presenta un retraso en la atenuación de la neofobia en S2. El ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró diferencias entre los grupos que el análisis *post hoc* de Bonferroni señaló en la sesión S2 (*= $p < 0.05$).

Activación de Cla en la neofobia

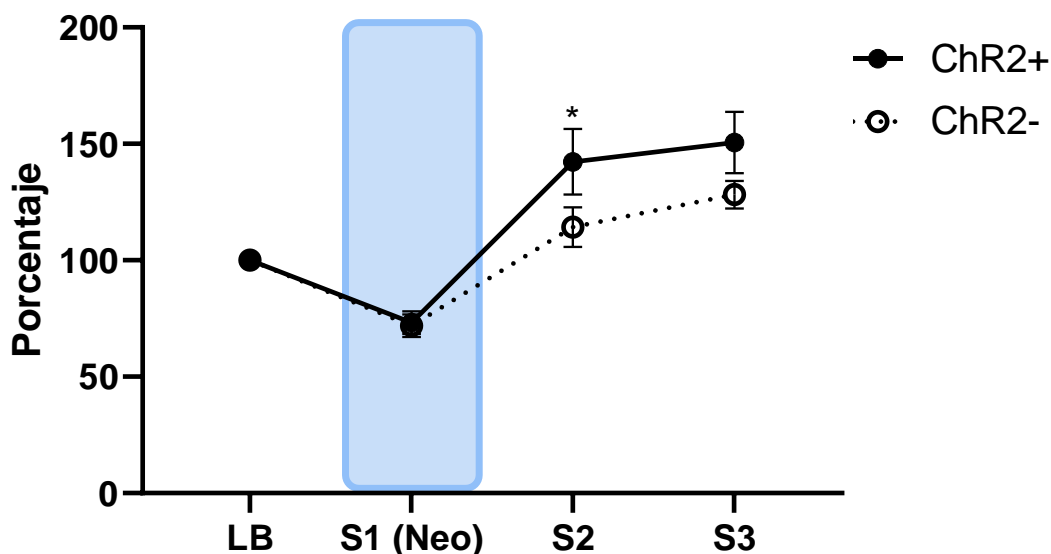


Figura 14. Efecto de la activación de la Cla en la atenuación de la neofobia a sacarina. Se puede observar la curva de atenuación a la neofobia a sacarina dónde el grupo ChR2+ presenta una aceleración en la atenuación de la neofobia desde la sesión S2. El ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró diferencias entre los grupos que el análisis *post hoc* de Bonferroni señaló en la sesión S2 (* = $P < 0.05$).

8. Discusión

Un efecto que se observó durante el desarrollo de los experimentos fue que el consumo se relacionaba directamente con el tamaño de los animales, siendo así que los ratones más grandes (~28 gramos) presentaron un consumo más elevado que los ratones más pequeños (~21 gramos) (Figura 15), por lo cual se propuso utilizar una normalización distinta donde sea considerado el peso individual de los ratones relacionado con el consumo de cada sesión. Este valor se obtuvo con el peso de los ratones, los cuales fueron pesados diariamente previo al inicio de cada sesión y el volumen en mL de consumo de cada sesión. Donde el volumen fue dividido por el peso del ratón en esa sesión.

Como consecuencia de esta nueva forma de representación de los datos, se observó que en ambos casos a pesar de que se separa ligeramente el valor de la LB, no presentaron diferencias estadísticamente significativas (eNpH3.0+ vs. eNpH3.0-: ANOVA de dos vías, $F_{(3, 39)} = 3.272$, $P > 0.9999$; ChR2+ vs. ChR2-: ANOVA de dos vías, $F_{(3, 30)} = 3.102$, $P > 0.9999$). De la misma forma se observó que hubo una ligera separación durante S1 entre los grupos eNpH3.0+ y eNpH3.0- que no resultó significativa (ANOVA de dos vías, $F_{(3, 39)} = 3.272$, $P > 0.9999$).

En el caso de la inhibición de la Cla se observó que en S2 se mantiene el efecto de retraso de la AN ($P = 0.0045$), mientras que en el caso de la activación de la Cla en S2 se mantuvo el efecto de aceleración de la AN ($P = 0.0208$) (Figura 16).

Este tipo de normalización permite tomar en consideración la modificación en el consumo producido por la diferencia de peso entre los ratones a lo largo de las sesiones, sin modificar la forma de los resultados considerablemente, esto nos permite visualizar y analizar los datos obtenidos, eliminando el factor que pudiera tener esta variable y que podría pasar desapercibida fácilmente. Otro componente de la conducta que fue observado durante la realización de los experimentos es que, durante la sesión de neofobia, la velocidad y el número de lengüeteos exhibidos por los ratones era diferente al de otras sesiones, sin embargo, ya que no contamos con una herramienta que nos permita evaluar este fenómeno

proponemos que en trabajos posteriores esta característica se evalúe con el fin de explorar el efecto de esta conducta observada.

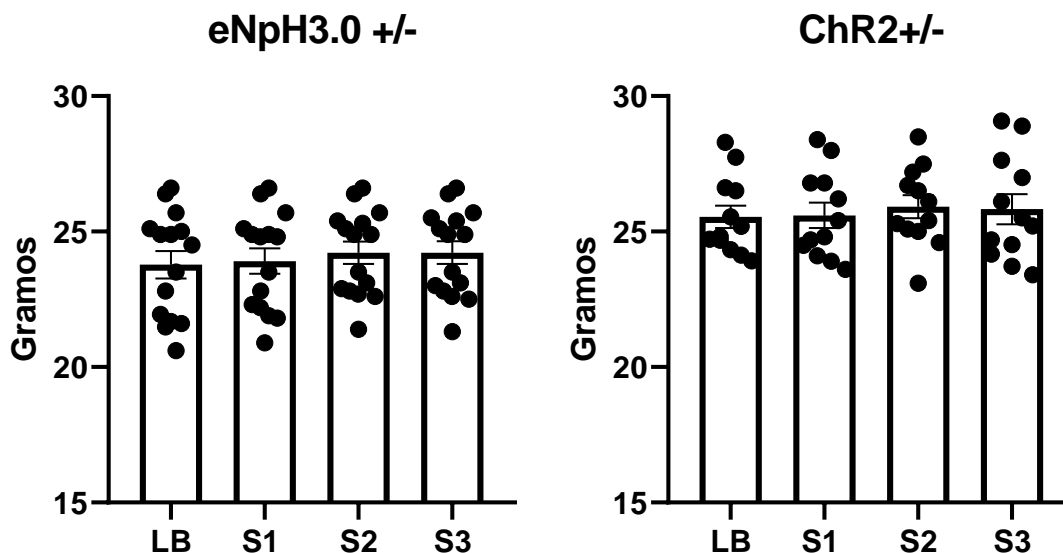


Figura 15. Peso de los ratones C57BL/6 a largo del protocolo experimental. A la izquierda se presentan los pesos de los animales de los grupos eNpH3.0+ y eNpH3.0-, a la derecha se presentan los pesos de los animales de los grupos ChR2+ y ChR2-. Se puede observar en ambos casos que existe una gran heterogeneidad en el peso de los animales entre los 20 y los 28 gramos.

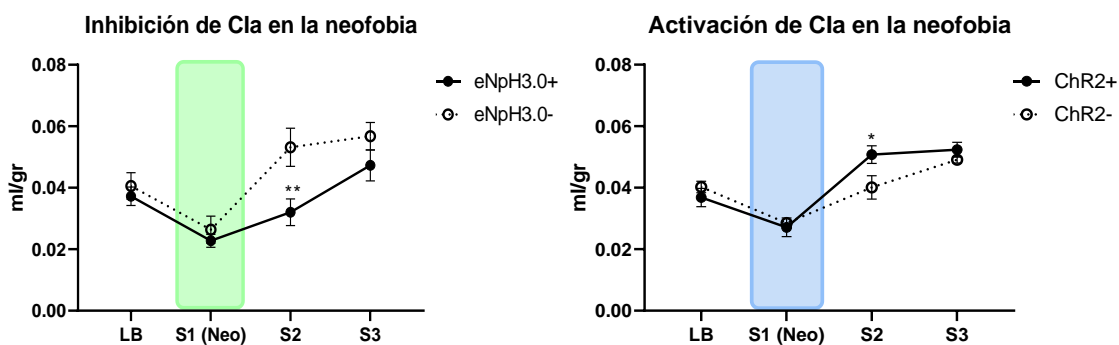


Figura 16. Inhibición y activación de la Cla considerando el peso. Se puede observar el efecto del peso de los ratones durante el consumo de sacarina donde se puede ver que la dinámica obtenida se mantiene (* = $P < 0.05$).

8.1 Inhibición de la CIa durante la neofobia a sacarina.

Como se puede observar en la Figura 13, la inhibición optogenética de la CIa durante la sesión de neofobia no tuvo un efecto en la expresión de la respuesta neofóbica, sin embargo, en la sesión posterior cuando la sacarina fue presentada por segunda ocasión el grupo eNpH3.0+ volvió a expresar la respuesta neofóbica mientras que el grupo eNpH3.0- atenuó esta respuesta. Al día siguiente durante la tercera presentación de sacarina, ambos grupos expresaron una respuesta neofóbica atenuada. Eso sugiere que la inhibición de la CIa no tuvo un efecto en el reconocimiento de la sacarina como un sabor novedoso ya que ambos grupos presentan una respuesta neofóbica equivalente, sin embargo, si tiene un efecto en la formación de la memoria de reconocimiento a la sacarina puesto que al no estar presente la inhibición en la segunda presentación se forma la memoria de reconocimiento que es expresada en la tercera sesión.

Al igual que lo observado por Rodríguez-García (2016), una inhibición transitoria de la CI a través del agonismo de los receptores GABA_A evita la formación de la memoria de reconocimiento de sabor, no obstante, nosotros realizamos la inhibición utilizando la activación de la proteína fotosensible halorodopsina, la cual es una bomba de iones cloruro que en consecuencia, hiperpolariza la neurona evitando la formación de potenciales de acción únicamente durante la presencia de un haz de luz de 532 nm (Jiang et al., 2017), a diferencia de las manipulaciones farmacológicas donde el efecto producido por la presencia del fármaco se mantiene hasta que este es metabolizado, la presencia de luz ocurrió únicamente durante los 20 minutos de la sesión de neofobia haciendo que la CIa estuviera inhibida únicamente durante el periodo de tiempo correspondiente al reconocimiento de la sacarina y no al de la formación de la memoria de reconocimiento.

Sin embargo, al hacer incidir el haz de luz de forma continua durante un tiempo tan prolongado se pudo haber generado una lesión a consecuencia del aumento en la temperatura del tejido y de un efecto tóxico producido por la hiperpolarización prolongada (Engelhard et al., 2018; Mohammad et al., 2017). Puesto que una lesión en la CI se ha visto que evita la expresión de neofobia a un sabor novedoso y el

consumo de este sabor novedoso se mantiene elevado a lo largo del tiempo (Lin et al., 2018; Moraga-Amaro et al., 2014), podemos inferir que a pesar de utilizar una estimulación de forma tan prolongada no se generó un daño en la CI ya que durante la presentación de la sacarina novedosa se presentó una respuesta neofóbica robusta y en la siguiente sesión esta respuesta se volvió a presentar.

Una posible explicación al retraso en la AN que observamos es que el efecto hiperpolarizante de la activación de la halorodopsina que bloqueó el efecto de algún neurotransmisor en la CI como puede ser la ACh, ya que se ha observado que el bloqueo de la actividad colinérgica en la CI bloquea la formación de memoria de reconocimiento a un sabor novedoso (Gutiérrez, Téllez, et al., 2003; Rodríguez-García & Miranda, 2016). Esta hipótesis puede ser explorada en futuros trabajos analizando algún producto de la cascada de activación de los receptores muscarínicos, nosotros proponemos a la proteína ARC como un producto que podría estar siendo afectado a consecuencia de la inhibición optogenética, pues se ha visto que existe un aumento en la expresión de esta proteína en la CI cuando un sabor es familiar a comparación de cuando es novedoso (Morin et al., 2011), además de que la expresión de esta proteína puede ser inducida por la activación de los receptores muscarínicos de tal forma que nosotros hipotetizamos que nuestra manipulación podría afectar la participación de esta proteína en la formación de memoria de reconocimiento. Otro candidato molecular que explorar es la sinaptofisina, que es una proteína que se ha visto que está implicada en procesos de formación de memoria y que además aumenta su expresión en la CI a consecuencia de la formación de una memoria de reconocimiento al sabor (Grijalva et al., 2021).

Otro neurotransmisor que también se ha visto que está relacionado con la formación de memoria gustativa es la dopamina (Gil-Lievana et al., 2022; Osorio-Gómez et al., 2021) que tiene un papel fundamental en la formación de una memoria gustativa. Al mismo tiempo se ha visto que la participación dopaminérgica es necesaria para la formación de memoria de reconocimiento tanto gustativa como visual, la cual parece que está ayudando a aumentar la saliencia de un estímulo novedoso que le permite

reconocerlo en las posteriores presentaciones (Gil-Lievana et al., 2022; Ramirez-Mejia et al., 2023). En esta situación particular el posible bloqueo de la actividad dopaminérgica en la CI durante neofobia por la halorodopsina pudo haber evitado la formación de la memoria de reconocimiento, lo que podría ser evaluado posteriormente analizando algún producto de la actividad dopaminérgica en la CI.

8.2 Activación de la CI durante la neofobia a sacarina.

Como se puede observar en la Figura 14, la activación optogenética de la corteza insular no tuvo ningún efecto en la respuesta neofóbica presentada durante la primer presentación de sacarina, pero si en la segunda presentación donde el consumo del grupo ChR2+ se ve aumentado a comparación del grupo ChR2-, esto podría indicar que la activación de la CI facilita la formación de la memoria de reconocimiento al sabor acelerando la AN ya que durante la tercera presentación de sacarina se mantiene el porcentaje de consumo y es igualado por el del grupo ChR2-. Una posible explicación a este fenómeno podría ser que al activación optogenética de la CI genere un aumento en la saliencia del estímulo modificando la velocidad de AN puesto que ya se ha reportado que el aumento de la neurotransmisión dopaminérgica proveniente del VTA en la CI aumenta la saliencia de un estímulo gustativo y modifica la memoria relacionada a este (Gil-Lievana et al., 2022), sin embargo, lo que nosotros observamos es que la estimulación no modifica la saliencia del estímulo al no aumentar ni disminuir la respuesta neofóbica cuando la sacarina fue novedosa, sin embargo si podría estar modificando la saliencia percibida de la sacarina, ayudando a la formación de la memoria de reconocimiento a la sacarina. No obstante, no podemos inferir que este efecto acelerador esté siendo mediado por la actividad de otro neurotransmisor como la ACh.

Adicionalmente, se observó que la activación de la CI mediante el antagonismo de los receptores GABAA previo a la presentación de una solución familiar de sacarina generó que las ratas exhibieran la respuesta neofóbica nuevamente (Rodríguez-García & Miranda, 2016). Por lo cual, utilizando a este mismo grupo de animales se realizó la activación optogenética cuando la sacarina ya era familiar en S4. Diferencialmente a lo observado anteriormente, la activación de la CI no generó un

Consumo de sacarina en S4

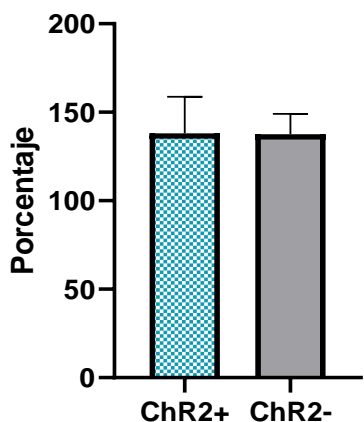


Figura 17. Activación de la Cla en S4. Se puede observar que la activación de la Cla en S4 no modificó el consumo de la sacarina familiar. T de Student no significativa ($P = 0.3488$).

efecto en el consumo de sacarina manteniendo un consumo elevado (Figura 17). Este resultado nos señala que la activación de la Cla no es suficiente para generar una respuesta neofóbica ante un estímulo familiar, esto puede deberse a que la activación farmacológica de Rodríguez-García (2016) tanto en la CI como en el NBM genera un aumento en los niveles extracelulares de ACh de la CI, con lo cual se puede inferir que es necesaria la presencia en la CI de ACh para producir la respuesta neofóbica por lo que la manipulación optogenética no puede generarla si esta no está presente.

9. Conclusiones

Pese a que el consumo de agua de los ratones C57BL/6 es pequeño después de un periodo de privación de 16 horas, es posible generar un modelo de AN a sacarina, con una respuesta neofóbica robusta utilizando un protocolo de consumo forzado con una concentración de sacarina al 0.5%. Este modelo nos permitió explorar el papel de la manipulación optogenética de las neuronas piramidales glutamatérgicas de la Cla en la AN, la cual reveló que ni la inhibición o activación optogenética modificaron la expresión de neofobia ante la presentación de la sacarina novedosa, señalado que no es necesaria la participación de la Cla en la expresión de neofobia. En el caso de la inhibición optogenética se observó que esta interrumpió la formación de memoria de reconocimiento, lo que genera que se vuelva a exhibir la respuesta neofóbica en la segunda presentación de sacarina, sin embargo, es necesario buscar algún tipo de marcador molecular para identificar sobre qué sistema está generando alteraciones la estimulación optogenética como podría ser la cascada de señalización colinérgica. La activación de la Cla generó el aceleramiento de la AN, el cual pudo haber sido resultado de la potenciación de la acción de algún neurotransmisor que está presente durante la neofobia en la Cla fortaleciendo el trazo de memoria de reconocimiento, pero aún es necesario realizar más trabajos para dilucidar cual es el mecanismo por el que ocurrió este fenómeno.

10. Referencias

- Bachmanov, A. A., Tordoff, M. G., & Beauchamp, G. K. (2001). Sweetener Preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J Mice.
- Bear, Mark. C. Barry. P. M. A. (2020). Neuroscience: Exploring the brain (fourth edition).
- Behrens, M., Brockhoff, A., Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M., & Meyerhof, W. (2004). The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(2), 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.019>
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 5, Issue 3, pp. 209–217). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn1344>
- Bermúdez-Rattoni, F., Ramírez-Lugo, L., Gutiérrez, R., & Miranda, M. I. (2004). Molecular Signals into the Insular Cortex and Amygdala During Aversive Gustatory Memory Formation. In *Cellular and Molecular Neurobiology* (Vol. 24, Issue 1).
- Best, M. R., Domjan, M., & Haskins, W. L. (1978). BRIEF REPORT Long-Term Retention of Flavor Familiarization: Effects of Number and Amount of Prior Exposures I. In *BEHAVIORAL BIOLOGY* (Vol. 23).
- Chen, X., Gabitto, M., Peng, Y., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2011). A Gustotopic Map of Taste Qualities in the Mammalian Brain. *Science*, 333(6047), 1262-1266. 1262-1266.
- Domjan, M. (2018). Introduction to food neophobia: Historical and conceptual foundations. In *Food neophobia: Behavioral and biological influences* (pp. xv–xxx).
- Engelhard, C., Chizhov, I., Siebert, F., & Engelhard, M. (2018). Microbial Halorhodopsins: Light-Driven Chloride Pumps. In *Chemical Reviews* (Vol.

118, Issue 21, pp. 10629–10645). American Chemical Society.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00715>

Fernandez-Ruiz, A., Oliva, A., & Chang, H. (2022). High-resolution optogenetics in space and time. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 45, Issue 11, pp. 854–864). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.09.002>

Fuller, J. L. (1974). Single-Locus Control of Saccharin Preference in Mice. In *The Journal of Heredity* (Vol. 65).

Gálvez-Márquez, D. K., Salgado-Méñez, M., Moreno-Castilla, P., Rodríguez-Durán, L., Escobar, M. L., Tecuapetla, F., & Bermudez-Rattoni, F. (2022). Spatial contextual recognition memory updating is modulated by dopamine release in the dorsal hippocampus from the locus coeruleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(49). <https://doi.org/10.1073/pnas.2208254119>

Gehrlach, D. A., Dolensek, N., Klein, A. S., Roy Chowdhury, R., Matthys, A., Junghänel, M., Gaitanos, T. N., Podgornik, A., Black, T. D., Reddy Vaka, N., Conzelmann, K. K., & Gogolla, N. (2019). Aversive state processing in the posterior insular cortex. *Nature Neuroscience*, 22(9), 1424–1437. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0469-1>

Gil-Lievana, E., Ramírez-Mejía, G., Urrego-Morales, O., Luis-Islas, J., Gutierrez, R., & Bermúdez-Rattoni, F. (2022). Photostimulation of Ventral Tegmental Area-Insular Cortex Dopaminergic Inputs Enhances the Salience to Consolidate Aversive Taste Recognition Memory via D1-Like Receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.823220>

Grijalva, L. E., Miranda, M. I., & Paredes, R. G. (2021). Differential changes in GAP-43 or synaptophysin during appetitive and aversive taste memory formation. *Behavioural Brain Research*, 397. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112937>

- Gutierrez Mendoza, R. (2004). Formación de la memoria gustativa: Papel de la corteza insular. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gutiérrez, R., Rodríguez-Ortiz, C. J., de La Cruz, V., Núñez-Jaramillo, L., & Bermudez-Rattoni, F. (2003). Cholinergic dependence of taste memory formation: Evidence of two distinct processes. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80(3), 323–331. [https://doi.org/10.1016/S1074-7427\(03\)00066-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7427(03)00066-2)
- Gutiérrez, R., Téllez, L. A., & Bermúdez-Rattoni, F. (2003). Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *European Journal of Neuroscience*, 17(8), 1556–1562. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02608.x>
- Herrera, D. G., & Robertson-F, H. A. (1996). ACTIVATION OF c-fos IN THE BRAIN. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 50).
- Jiang, J., Cui, H., & Rahmouni, K. (2017). Optogenetics and pharmacogenetics: principles and applications. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 313, 633–645. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00091.2017.-Remote>
- Kandel, E. R. (2001). The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialog Between Genes and Synapses. In *Bioscience Reports* (Vol. 21, Issue 5).
- Kesner, R. P., & Gilbert, P. E. (2007). The role of the agranular insular cortex in anticipation of reward contrast. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88(1), 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.02.002>
- Koh, M. T., Wilkins, E. E., & Bernstein, I. L. (2003). Novel Tastes Elevate c-fos Expression in the Central Amygdala and Insular Cortex: Implication for Taste Aversion Learning. *Behavioral Neuroscience*, 117(6), 1416–1422. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.6.1416>
- Lin, J. Y., Arthurs, J., & Reilly, S. (2018). The effects of amygdala and cortical inactivation on taste neophobia. *Neurobiology of Learning and Memory*, 155, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.08.021>

- Mohammad, F., Stewart, J. C., Ott, S., Chlebikova, K., Chua, J. Y., Koh, T. W., Ho, J., & Claridge-Chang, A. (2017). Optogenetic inhibition of behavior with anion channelrhodopsins. *Nature Methods*, 14(3), 271–274.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4148>
- Mook, D. G. (1974). PSYCHOLOGICAL REVIEW SACCHARIN PREFERENCE IN THE RAT: SOME UNPALATABLE FINDINGS x.
- Moraga-Amaro, R., Cortés-Rojas, A., Simon, F., & Stehberg, J. (2014). Role of the insular cortex in taste familiarity. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.11.012>
- Morin, J. P., Quiroz, C., Mendoza-Viveros, L., Ramirez-Amaya, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (2011). Familiar taste induces higher dendritic levels of activity-regulated cytoskeleton-associated protein in the insular cortex than a novel one. *Learning and Memory*, 18(10), 610–616.
<https://doi.org/10.1101/lm.2323411>
- Osorio-Gómez, D., Bermúdez-Rattoni, F., & Guzmán-Ramos, K. R. (2021). Cortical neurochemical signaling of gustatory stimuli and their visceral consequences during the acquisition and consolidation of taste aversion memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 181.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107437>
- Osorio-Gómez, D., Guzmán-Ramos, K., & Bermúdez-Rattoni, F. (2018). Neurobiology of neophobia and its attenuation. In *Food Neophobia: Behavioral and Biological Influences* (pp. 111–128). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101931-3.00006-9>
- Paxinos, G. , F. K. B. (2004). Paxinos The mouse brain in stereotaxic coordinates.
- Peng, Y., Gillis-Smith, S., Jin, H., Tränkner, D., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2015). Sweet and bitter taste in the brain of awake behaving animals. *Nature*, 527(7579), 512–515. <https://doi.org/10.1038/nature15763>

- Ramirez-Mejia, G., Gil-Lievana, E., Urrego-Morales, O., Galvez-Marquez, D., Hernández-Ortiz, E., Carrillo-Lorenzo, J. A., & Bermúdez-Rattoni, F. (2023). Salience to remember: VTA-IC dopaminergic pathway activity is necessary for object recognition memory formation. *Neuropharmacology*, 228. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109464>
- Rodríguez-García, G., & Miranda, M. I. (2016). Opposing roles of cholinergic and GABAergic activity in the insular cortex and nucleus basalis magnocellularis during novel recognition and familiar taste memory retrieval. *Journal of Neuroscience*, 36(6), 1879–1889. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2340-15.2016>
- Rodriguez-Ortiz, C. J., de La Cruz, V., Gutiérrez, R., & Bermudez-Rattoni, F. (2005). Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learning and Memory*, 12(5), 533–537. <https://doi.org/10.1101/lm.94505>
- Roman, C., & Reilly, S. (2007). Effects of insular cortex lesions on conditioned taste aversion and latent inhibition in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 26(9), 2627–2632. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05872.x>
- Sclafani, A. (2007). Fat and sugar flavor preference and acceptance in C57BL/6J and 129 mice: Experience attenuates strain differences. *Physiology and Behavior*, 90(4), 602–611. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.11.012>
- Sclafani, A., Bahrani, M., Zukerman, S., & Ackroff, K. (2010). Stevia and saccharin preferences in rats and mice. *Chemical Senses*, 35(5), 433–443. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq033>
- Sparta, D. R., Jennings, J. H., Ung, R. L., & Stuber, G. D. (2013). Optogenetic strategies to investigate neural circuitry engaged by stress. In *Behavioural Brain Research* (Vol. 255, pp. 19–25). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.007>

- Tulving, E., & Markowitsch, H. J. (1998). Episodic and declarative memory: Role of the hippocampus. In *Hippocampus* (Vol. 8, Issue 3, pp. 198–204).
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:3<198::AID-HIPO2>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:3<198::AID-HIPO2>3.0.CO;2-G)
- Vaidya, A. R., Pujara, M. S., Petrides, M., Murray, E. A., & Fellows, L. K. (2019). Lesion Studies in Contemporary Neuroscience. In *Trends in Cognitive Sciences* (Vol. 23, Issue 8, pp. 653–671). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2019.05.009>
- Vincis, R., Chen, K., Czarnecki, L., Chen, J., & Fontanini, A. (2020). Dynamic Representation of Taste-Related Decisions in the Gustatory Insular Cortex of Mice. *Current Biology*, 30(10), 1834-1844.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.012>
- Wang, L., Gillis-Smith, S., Peng, Y., Zhang, J., Chen, X., Salzman, C. D., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2018). The coding of valence and identity in the mammalian taste system. *Nature*, 558(7708), 127–131.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0165-4>
- Yarmolinsky, D. A., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. P. (2009). Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. In *Cell* (Vol. 139, Issue 2, pp. 234–244). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.001>
- Yiannakas, A., & Rosenblum, K. (2017). The insula and taste learning. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 10). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00335>