



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA



EFFECTO DE LA ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA EN LOS SOMAS VERSUS LAS
TERMINALES DE LA PROYECCIÓN DEL ÁREA VENTRAL TEGMENTAL A LA
CORTEZA INSULAR ANTERIOR SOBRE LA NEOFOBIA Y LA MEMORIA DE
RECONOCIMIENTO AL SABOR

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA

GABRIELA HERRERA XITHE

DIRECTOR: DR. LUIS FRANCISCO RODRÍGUEZ DURÁN

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este proyecto fue realizado en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y Memoria a cargo del Dr. Federico Bermúdez Rattóni en el departamento de Neurociencia Cognitiva de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Este proyecto fue posible gracias a los financiamientos otorgados por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología del programa *Fronteras CONAHCYT CF-2023-I-189* y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) otorgado por la UNAM (*DGAPA-PAPIIT-UNAM IN213123*).

Agradecimientos académicos

Al Dr. Luis Francisco Rodríguez Durán por la tutoría en el proyecto, por su confianza, paciencia y ánimos del día a día.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni por abrirme las puertas en el laboratorio y brindar los recursos necesarios para la realización de mi proyecto.

A mi revisor, Dr. Hugo Sánchez Castillo y a mis sinodales la Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez, Dr. Óscar Prospero García y Dr. José Fernando Peña Ortega por sus valiosas aportaciones al proyecto.

la M. V. Z. Claudia V. Rivera Cerecedo, responsable de la Unidad de Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, por su apoyo en el cuidado de los animales utilizados en este proyecto; y a la Unidad de Microscopia, particularmente a la Dra. Ruth Rincón Heredia y al Dr. Abraham Rosas Arellano por el apoyo en la captura de imágenes en el microscopio confocal.

Agradecimientos personales

A las personas más importantes en mi vida, **mi papá y mi mamá**. Berny sin tu amor, tu paciencia conmigo y tus palabras de apoyo, no estaría donde estoy ahorita. No conozco una persona tan valiente y fuerte como tú, me siento tan orgullosa de ser tu hija. Alfredo, por tu inmenso amor, porque me has demostrado una y otra vez que no importa cómo y cuándo cuento contigo. Gracias ambos por dar lo mejor de ustedes y ser los mejores padres que alguien puede desear. También quiero agradecer a **mi hermano**, Rubén. Sin las risas y los buenos momentos que pasamos juntos hace mucho habría perdido la cabeza, te quiero gordis.

A mi persona favorita, **Eduardo**. Gracias por acompañarme en la última etapa de este proyecto. Gracias por brindarme el cariño, la paciencia y el apoyo que necesitaba. Por darme mi espacio, pero sin soltarme la mano. Por más proyectos juntos.

Al mejor amigo del mundo, **Carlos**. Gracias por estar siempre para mí, no sé qué sería de mi vida sin tu apoyo incondicional. No hay palabras de agradecimiento por estar a mi lado (a la distancia) en estos últimos años. A **Mauricio**, llegaste casi de manera accidental a mi vida y desde ese entonces no has soltado mi mano, gracias por ser el amigo que eres.

A mis compañeros del laboratorio: **Karla, Apolinar, Arturo y Diana**. Que han estado para mí en cada experimento exitoso y fallido, en cada frustración y en cada celebración, en cada comida y cada chismecito. La ciencia necesita más personas como ustedes, inteligentes, empáticos, solidarios. Científicos que sepan que el trabajo en equipo nos hace brillar a todos, que no tienen miedo de compartir su conocimiento y brindar su tiempo a quien lo necesite. Sin ustedes no estaría donde estoy. Son mi ejemplo a seguir.

Al **Dr. Daniel Osorio Gómez** por tus comentarios en el trabajo, pero también por los consejos de la vida en la academia, por el compañerismo en el laboratorio.

Finalmente, a los ratoncitos que dieron su vida por el quehacer científico.

Contenido

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES.....	4
Memoria de reconocimiento al sabor	4
Vía gustativa.....	6
Corteza Insular	9
Localización	9
Funciones de la corteza insular	10
El VTA y el sistema dopaminérgico	12
Corteza insular, memoria de reconocimiento al sabor e interocepción	14
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVOS	15
Generales.....	15
Particulares	15
HIPÓTESIS.....	16
MÉTODO.....	16
Animales	16
Genotipificación.....	17
Procedimientos de infección	17
Grupos.....	18
Pruebas conductuales	19
Prueba de concentración de quinina.....	19
Prueba preferencia de sabor	19
Inmunohistoquímica.....	21
Análisis estadístico.....	21
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	27
Concentración mínima de quinina que permite el reconocimiento de un sabor aversivo	27
Conectividad entre el VTA y la CIa a través de neuronas con actividad catecolaminérgica.....	28
La estimulación del VTA y de la vía VTA-CI acentúa la neofobia y retrasa la atenuación a la neofobia gustativa	28

La estimulación de las terminales catecolaminérgicas en la CIa provenientes del VTA promueve la memoria de reconocimiento al sabor.....	31
La estimulación de la CI generaliza la aversión, mientras que la estimulación del VTA solo aumenta saliencia	32
PERSPECTIVAS.....	32
CONCLUSIONES	33
REFERENCIAS.....	33

ABREVIATURAS

4',6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI)

Ácido N-metil-D-aspartico (NMDA)

Adenosín monofosfato cíclico (AMPC)

Atenuación de la neofobia (AN)

Área ventral tegmental (VTA)

Channel rodopsin 2 (ChR2)

Condicionamiento de aversión al sabor (CAS)

Corteza insular (CI)

Corteza insular anterior (CIa)

Corteza prefrontal (CPF)

Dopamina (DA)

Glutamato (Glu)

Fosfolipasa C (PLC)

Noradrenalina (NA)

Núcleo accumbens (NAc)

Núcleo amigdalino basolateral (BLA)

Núcleo amigdalino central (CeA)

Proteína calcio calmodulina cinasa II (CaMKII)

Proteínas cinasas tipo A (PKA)

Proteínas cinasas tipo C (PKC)

Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Sistema nervioso central (SNC)

Tirosina hidroxilasa (TH)

RESUMEN

El aprendizaje y la memoria son unas de las funciones más complejas del cerebro, ya que son esenciales para la supervivencia de los animales. Un tipo de memoria es la memoria de reconocimiento al sabor. Este tipo de memoria se define como la capacidad de evaluar la novedad o familiaridad de un estímulo y se considera una forma de memoria declarativa. Ante la presentación de un nuevo sabor los organismos limitan la ingesta de este, lo que permite al organismo evaluar los efectos gastrointestinales del estímulo novedoso, cuando el nuevo sabor no tiene consecuencias negativas se reconoce como una señal segura lo que lleva a un aumento en su consumo, es decir, se da el fenómeno de atenuación de la neofobia (AN). Pero si el nuevo sabor es asociado con malestar, los sujetos lo rechazan en la siguiente presentación, desarrollando una memoria de aversión al sabor de largo plazo. La memoria de reconocimiento al sabor implica el almacenamiento de información a través de cambios de plasticidad en la red neuronal del gusto, incluida la corteza insular anterior (CIa) y el área ventral tegmental (VTA), un área crítica en la liberación de dopamina. Nuestro objetivo fue investigar las diferencias entre la fotoestimulación de los somas catecolaminérgicos del VTA y las terminales catecolaminérgicas de la vía VTA-CIa en la neofobia y atenuación de la neofobia gustativa como parte de la formación de la memoria de reconocimiento al sabor, particularmente sobre estímulos gustativos aversivos. En este trabajo encontramos que la fotoestimulación de los somas catecolaminérgicos en el VTA o de las terminales catecolaminérgicas en la vía VTA-CIa de ratones TH-Cre induce un aumento de la neofobia gustativa a un sabor amargo de baja concentración comparado con los grupos controles. Así mismo, dicha fotoestimulación de los somas catecolaminérgicos del VTA o de las terminales en la vía VTA-CIa retrasa e inhibe, respectivamente, la atenuación de la neofobia. Estos datos podrían indicar que la fotoestimulación catecolaminérgica, específicamente de la vía VTA-CIa aumenta la saliencia de los estímulos, lo que en consecuencia podría estar afectando las características gustativas e interoceptivas de un estímulo gustativo de baja concentración, lo que conductualmente se expresa como un aumento en la neofobia gustativa. Finalmente, la estimulación optogenética de las terminales catecolaminérgicas de la CIa provenientes del VTA asociado a un estímulo gustativo de baja concentración es capaz de producir una memoria de reconocimiento al sabor. Estos resultados podrían señalar nos permiten conocer el papel del VTA y de la vía VTA-CIa en la neofobia, la atenuación de la neofobia y las consecuencias en la memoria de reconocimiento al sabor de un estímulo gustativo aversivo, relacionado los cambios en la saliencia sensorial con los cambios interoceptivos. El estudio de la saliencia de estímulos, particularmente de estímulos gustativos, es importante para entender el fenómeno de las adicciones pues, se ha propuesto al aprendizaje de cambios interoceptivos dados por las sustancias de abuso como fundamento de las adicciones.

INTRODUCCIÓN

El aprendizaje se define como la adquisición de nueva información, mientras que la memoria es el proceso mediante el cual la información es codificada, almacenada y recuperada (Bermúdez-Rattoni, 2004; Mansvelder et al., 2019). Para el estudio de la memoria es útil dividir el fenómeno en tres etapas: la adquisición, consolidación y evocación (Voss & Paller, 2008). Durante la adquisición el organismo obtiene información de las experiencias sensoriales y las almacena como una memoria de corto plazo. Dicha información entra en un proceso de consolidación para formar una memoria de largo plazo y poder ser evocada posteriormente (Mansvelder et al., 2019; Voss & Paller, 2008). De acuerdo con su duración, la memoria se puede dividir en memoria de corto plazo y de largo plazo. En la memoria de corto plazo, la información sólo se mantiene por un periodo de segundos a minutos, mientras que la memoria de largo plazo se puede mantener incluso por años (Sweatt, 2010). El proceso por el cual la memoria de corto plazo se convierte en memoria de largo plazo se denomina consolidación (Mansvelder et al., 2019). La consolidación de la memoria implica la interacción de redes neuronales, modificaciones morfológicas en las neuronas, la actividad de diversos neurotransmisores y la síntesis de proteínas de novo, entre otros procesos (Bisaz et al., 2014; Duszkiwicz et al., 2019; Guzmán-Ramos et al., 2018). Todos estos mecanismos celulares ocurren en los minutos y horas posteriores a la codificación de la información (Redondo & Morris, 2011). La consolidación de la memoria es una característica general de la formación de la memoria que se encuentra en diferentes especies (Bisaz et al., 2014).

Por el contenido, la memoria se puede dividir en dos: memoria declarativa y no declarativa (Squire & Zola, 1996; Voss & Paller, 2008). La memoria declarativa, o también llamada explícita, es aquella memoria de hechos autobiográficos y datos semánticos, se ha asociado a la actividad del lóbulo temporal medio y el diencefalo. La memoria no declarativa, o también llamada implícita, refiere a memorias procedimentales, al priming, a las memorias asociativas y las no asociativas. La memoria no declarativa se ha asociado a la actividad del estriado, cerebelo y amígdala (Squire & Zola, 1996; Voss & Paller, 2008). Esta división establece que los diferentes tipos de memoria son dependientes de diferentes áreas anatómicas en el sistema nervioso central (SNC), a este modelo se le denomina Sistema de Memorias Múltiples (Sweatt, 2010).

Entre los tipos de memoria encontramos a la memoria de reconocimiento. La memoria de reconocimiento se define como la capacidad de evaluar la novedad o familiaridad de un estímulo, se considera una forma de memoria declarativa (Bermúdez-Rattoni, 2004; Manns, 2017). La memoria de reconocimiento contiene por lo menos dos elementos: el primero es el juicio que se define como la capacidad de determinar si el estímulo es novedoso o familiar; el segundo elemento es la recolección de información contextual asociada al estímulo familiar o novedoso (Bermúdez-Rattoni, 2014; Eichenbaum, 2010; Manns, 2017). La memoria de reconocimiento se ha asociado a actividad en el lóbulo temporal medial y la corteza prefrontal (Manns, 2017). Específicamente, en este trabajo nos enfocamos en la memoria de reconocimiento al sabor, un tipo de memoria de reconocimiento, la cual se define como la capacidad de un organismo para recordar las posibles consecuencias tóxicas o benéficas de ingerir un alimento (Bermúdez-Rattoni, 2004). Varios estudios han reportado la

importancia de la corteza insular (CI) en la adquisición y almacenamiento a largo plazo de la memoria de reconocimiento al sabor (Bermúdez-Rattoni, 2004; Guzmán-Ramos et al., 2010; Lin et al., 2012, p. 2; Moraga-Amaro et al., 2014; Stehberg et al., 2011). En este sentido, se ha demostrado que la estimulación optogenética de la CI anterior puede alterar la valencia de un sabor intrínsecamente aversivo (Peng et al., 2015), así como alterar el consumo de sustancias recompensantes como el alcohol o la sacarosa, no así del consumo de agua (Haaranen et al., 2020), lo que sugiere que la manipulación de esta área modula los estímulos de tipo recompensante, pero no los neutros.

Por otra parte, la actividad del área ventral tegmental (VTA) a través de neuronas dopaminérgicas se ha asociado a las conductas dirigidas a la búsqueda de la recompensa y a la saliencia de estímulos asociados a ellos (Salamone & Correa, 2012). Estudios de nuestro grupo de investigación muestran que la estimulación optogenética de los cuerpos celulares catecolaminérgicos en el VTA modula las respuestas neuronales de la CI anterior (Gil-Lievana et al., 2020, 2022) y que dicha estimulación incrementa la saliencia de los estímulos para consolidar un nuevo estímulo gustativo sub-umbral independientemente de su valor hedónico (Gil-Lievana et al., 2022). En este trabajo nos enfocamos en investigar la diferencia entre la fotoestimulación de los somas catecolaminérgicos del VTA y las terminales catecolaminérgicas de la vía VTA-CI en la formación de la memoria de reconocimiento al sabor a través del estudio de la neofobia y la atenuación de la neofobia (AN), particularmente en estímulos gustativos aversivos.

ANTECEDENTES

Memoria de reconocimiento al sabor

El aprendizaje y la memoria son unas de las funciones más complejas del cerebro, ya que son esenciales para la supervivencia de los animales. Un tipo de memoria es la memoria de reconocimiento. Este tipo de memoria se define como la capacidad de evaluar la novedad o familiaridad de un estímulo y se considera una forma de memoria declarativa (Bermúdez-Rattoni, 2004). La memoria de reconocimiento involucra por lo menos dos procesos diferentes. Uno de ellos es la discriminación, es decir, la capacidad de determinar si el estímulo es novedoso o familiar y el segundo es la recolección de información contextual (Eichenbaum, 2010). Evidencias muestran que la corteza perirrinal está asociada a los procesos de discriminación de estímulos individuales, mientras que la actividad del hipocampo se relacionaría con los procesos de recolección contextual y aspectos espaciales (Balderas et al., 2015; Brown & Banks, 2015). La actividad de la CI también ha mostrado ser necesaria para la consolidación de la memoria de reconocimiento (Balderas et al., 2015; Bermúdez-Rattoni, 2004; Rodríguez-Ortiz et al., 2005). Un ejemplo de memoria de reconocimiento es la memoria de reconocimiento al sabor, la cual permite al organismo reconocer qué alimentos son seguros o peligrosos de consumir basado en sus experiencias previas, lo que aumenta su probabilidad de supervivencia (Bermúdez-Rattoni, 2004; Ruetti et al., 2014).

En este sentido, se ha reportado la participación de diversos sistemas de neurotransmisión en la adquisición y consolidación de la memoria de reconocimiento

(Balderas et al., 2015; De Lima et al., 2011; Guzmán-Ramos et al., 2012; Rossato et al., 2013; Rueti et al., 2014). Se ha propuesto la participación de los receptores muscarínicos en la corteza perirrinal, el hipocampo y la CI durante la formación y consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos (Balderas et al., 2015). Por otra parte, se ha reportado que la administración intraperitoneal de la hormona corticosterona y del propanolol, agentes moduladores de la actividad adrenérgica, alteran la memoria de reconocimiento al sabor (Rueti et al., 2014). Así mismo se ha demostrado la importancia de la actividad dopaminérgica en la memoria de reconocimiento (De Lima et al., 2011; Guzmán-Ramos et al., 2012; Rossato et al., 2013); durante la adquisición en una tarea de reconocimiento de objetos se observó un aumento de la concentración de dopamina (DA) en la CI (Guzmán-Ramos et al., 2012), mientras que la administración de agonistas del receptor a DA tipo D1 mejoraron la memoria de reconocimiento a objeto 24 y 72 horas después de la prueba (de Lima et al., 2011). Finalmente, se ha reportado que la actividad simultánea en la amígdala y la corteza prefrontal (CPF) medial de los receptores tipo D1/D5 es necesaria para la consolidación de memoria de reconocimiento de objetos (Rossato et al., 2013). Como se observa, se ha demostrado la participación de varios sistemas de neurotransmisores involucrados en la formación y consolidación de la memoria de reconocimiento, especialmente de la DA y de la CI.

Ante la presentación de un nuevo sabor los organismos limitan la ingesta de este (Figura 1), lo que permite al organismo evaluar los efectos gastrointestinales del estímulo novedoso, este fenómeno se le conoce como neofobia (Bermúdez-Rattoni, 2004; Grau-Perales et al., 2021; Lin et al., 2012). La neofobia gustativa es un fenómeno que ha permitido el estudio de la memoria de reconocimiento al sabor (Bermúdez-Rattoni, 2004). La actividad de diversas áreas del SNC ha mostrado tener un papel en la neofobia gustativa. En el caso de la corteza perirrinal, se ha reportado que lesiones de esta área interrumpen la respuesta inicial de neofobia, así como previene la formación del trazo de memoria que convierte un sabor de novedoso a familiar (Ramos, 2020). Una medida útil para evaluar la neofobia son los patrones de lengüeteo ante la presentación de un nuevo sabor; entre las medidas a evaluar se encuentran el número promedio de lengüeteos que un animal hace sin tomar pausas, la eficacia del lengüeteo, entre otros (Lin et al., 2012).

Cuando el nuevo sabor no tiene consecuencias negativas se reconoce como una señal segura lo que lleva a un aumento en su consumo, es decir, se da el fenómeno de atenuación de la neofobia (AN). Pero si el nuevo sabor es asociado con malestar, los sujetos lo rechazan en la siguiente presentación, desarrollando una memoria de aversión al sabor de largo plazo (Bermúdez-Rattoni, 2004; Rodríguez-Ortiz et al., 2005). Se ha planteado que el incremento de la ingesta durante la AN constituye una forma asociativa de aprendizaje (Bermúdez-Rattoni, 2004; Domjan, 1976). La AN depende de la asociación de una señal gustativa con la ausencia de consecuencias aversivas, por lo que la información gustativa sirve para predecir si es seguro consumir dichos alimentos en encuentros posteriores. A esta propuesta se denominada teoría de la seguridad aprendida, lo que implica que el animal aprende que no hay consecuencias negativas asociadas con el sabor (Bermúdez-Rattoni, 2004; Nachman & Jones, 1974). Se ha demostrado que la AN es más susceptible de interrupción que la asociación

entre gusto y malestar (Bermúdez-Rattoni, 2004). En pruebas de AN se ha demostrado un aumento de la actividad de la proteína c-Fos en el núcleo accumbens (NAc) shell (Grau-Perales et al., 2019). Así mismo, la manipulación de la actividad dopaminérgica en el hipocampo ventral (Grau-Perales et al., 2021) modula la expresión de AN en un protocolo de memoria de reconocimiento al sabor dependiente de contexto, pues antagonistas dopaminérgicos interrumpe la AN (Grau-Perales et al., 2021). Finalmente, se ha demostrado que la inhibición de síntesis de proteínas de la CI (Rodríguez-Ortiz et al., 2005) y la manipulación de los receptores glutamatérgicos mGluR1 en esta área (Ramírez-Lugo et al., 2015) alteran la AN en un modelo en roedores.

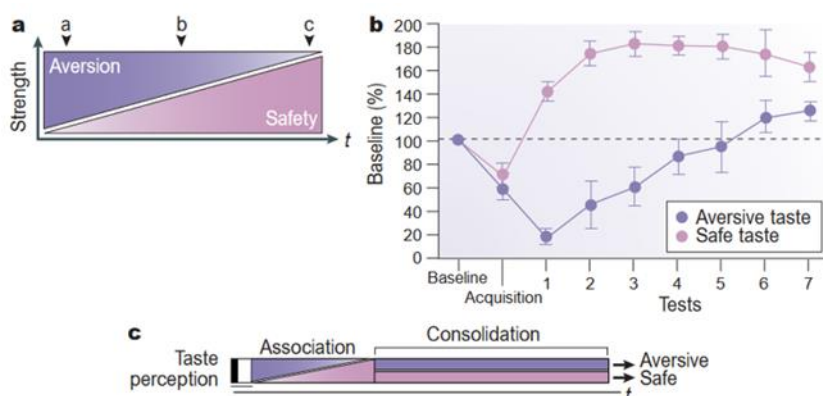


Figura 1. Trazos de memoria gustativa. (A) Cuando un animal ingiere una sustancia nueva e inofensiva, aprende gradualmente que es seguro consumirla. Las flechas representan la posible aparición de malestar. Por ejemplo, si se induce malestar en el momento (t) "a", el animal desarrollará una aversión más fuerte que

en el momento "b". Sin embargo, una vez finalizado el período asociativo de aversión (triángulo de aversión), los animales desarrollarán una atenuación de la neofobia (triángulo de seguridad), incluso cuando el malestar se produjo en el momento 'c'. (B) Consumo de sacarina expresado como porcentaje del consumo inicial de agua durante la primera (adquisición) y posteriores presentaciones de una solución de sacarina al 0,25%. Nótese la disminución del consumo (neofobia) durante la primera presentación de sacarina. Los círculos morados representan un grupo que recibió un agente inductor de malestar (una inyección intraperitoneal de cloruro de litio) 15 minutos después de la primera exposición a la sacarina, desarrollando una aversión condicionada al gusto. Los círculos rosados representan un grupo que mostró atenuación de la neofobia, ya que estos animales no recibieron cloruro de litio. (c) Curso temporal de los acontecimientos después de la presentación de un nuevo gusto. La percepción del gusto desencadena la formación de un trazo de memoria gustativa; si se induce malestar durante este intervalo, entonces se lleva a cabo la asociación y comienza un proceso de consolidación. Imagen tomada de Bermúdez-Rattoni (2004).

En resumen, la memoria de reconocimiento al sabor es un tipo de memoria con relevancia para la supervivencia de los individuos, pues permite evitar alimentos con posibles consecuencias negativas (Bermúdez-Rattoni, 2004; Lin et al., 2012). La memoria de reconocimiento al sabor puede estudiarse a través de procesos como la neofobia gustativa y la AN (Bermúdez-Rattoni, 2004; Lin et al., 2012), ambos involucran diversas áreas del SNC, entre ellas la CI (Bermúdez-Rattoni, 2014; Rodríguez-Ortiz et al., 2005) y la actividad de neuromoduladores como la DA (De Lima et al., 2011; Guzmán-Ramos et al., 2012; Rossato et al., 2013).

Vía gustativa

El sabor tiene principalmente dos funciones: la primera es identificar la toxicidad y/o nutrientes de un alimento (Chaudhari & Roper, 2010) y la segunda función es preparar al cuerpo para metabolizar los alimentos una vez que son ingeridos (Breslin, 2013). El sistema

gustativo ha evolucionado de tal manera que es capaz de distinguir entre sustancias apetitivas y sustancias aversivas (Gutierrez et al., 2020). Este sistema detecta gran variedad de moléculas gracias a la activación de receptores localizados en las papilas gustativas; estas son conjuntos de hasta 100 células neuroepiteliales polarizadas que forman “islas” compactas y de columnas pseudoestratificadas incrustadas en el epitelio de la cavidad oral y en la faringe (Breslin, 2013; Chaudhari & Roper, 2010; Gutierrez et al., 2020).

La estimulación de los receptores al sabor se traduce en una variedad de atributos multisensoriales como la identidad del sabor, valor hedónico y la intensidad del sabor (Gutierrez et al., 2020; Wang et al., 2018). La identidad y la valencia hedónica del sabor son características que están relacionadas. Por ejemplo, los mamíferos tienen una preferencia innata por los estímulos dulces y una aversión por los estímulos amargos. Así mismo la valencia del estímulo, la cualidad de un estímulo de ser apetitivo o aversivo al individuo, puede modificarse por la concentración del estímulo, por otros estímulos asociados al sabor o por el estado del organismo (Staszko et al., 2020).

Se han identificado y caracterizados cuatro tipos de células receptoras al sabor: tipo I, tipo II, tipo III y células basales (Chaudhari & Roper, 2010; Gutierrez et al., 2020). El tipo I son las células receptoras al sabor más abundantes y su función más estudiada es la de mantener la homeostasis en las papilas gustativas, pues además engullir otras células, cuenta con canales ROMK los cuales eliminan el K^+ acumulado durante los potenciales de acción prolongados, se han asociado el procesamiento del sabor salado (Chaudhari & Roper, 2010).

Las células de sabor de tipo II, también llamada células receptoras, cuenta con receptores membranales acoplados a proteína G (GPCR) con siete dominios transmembranales (Chaudhari & Roper, 2010). Se han reportado por lo menos tres tipos de GPCR y la combinación de estos permite la detección de los diferentes sabores: los tipos T1R1+T1R3 detectan el sabor umami, los tipos T1R2+T1R3 detectan el sabor dulce y la familia de los T2R detectan el sabor amargo (Breslin, 2013; Chaudhari & Roper, 2010; Gutierrez et al., 2020). Las células tipo III procesan información de los sabores ácidos y soluciones carbonadas. Finalmente, las células basales se describen como esféricas u ovoides, los procesos de este tipo de células no alcanzan el poro de las papilas gustativas, por lo que se consideran células al sabor inmaduras (Chaudhari & Roper, 2010). De manera general, la vía de señalización en las papilas gustativas al detectar un sabor comienza con las células tipo II que detectan y discriminan los sabores dulce, amargo y umami, estas generan señales de Ca^{2+} y liberan ATP a través de hemicanales de pannexina 1. El ATP extracelular excita receptores de ATP (P2X, P2Y) en aferentes nerviosas y en células de sabor tipo III; el ATP produce una excitación secundaria en las células tipo III integrando las señales gustativas y a su vez libera neurotransmisores como la serotonina que pueden inhibir las células tipo II. Por otra parte, en las células de sabor tipo III los ácidos orgánicos penetran a través de la membrana plasmática y acidifican el citoplasma donde se disocian para acidificar el citosol, ahí se cree que el H^+ intracelular bloquea un canal de K^+ sensible a protones y despolariza la membrana, posteriormente los canales de Ca^{2+} activados por voltaje elevarían el Ca^{2+} citoplásmico para desencadenar la exocitosis de las vesículas sinápticas. Finalmente, el sabor salado se detecta mediante la permeación directa de iones de Na^+ a través de los canales

iónicos de la membrana para despolarizar la membrana (Chaudhari & Roper, 2010; Gutierrez et al., 2020).

Una vez estimulados los diferentes tipos de receptores al sabor, la información se transmite a través de los nervios facial, glossofaríngeo y vago al SNC (Bermúdez-Rattoni, 2004) (Figura 2); el primer relevo en el SNC para el procesamiento gustativo es la porción rostral del núcleo del tracto solitario. En los roedores, pero no en los humanos, la información asciende al núcleo parabraquial dorsolateral del Puente de Varolio que posteriormente proyecta al núcleo paraventricular del hipotálamo lateral, al núcleo basolateral (BLA) y central (CeA) de la amígdala, a las células parvocelulares del tálamo posteromedial ventral y finalmente, al último relevo de la vía gustativa: la CI (Bermúdez-Rattoni, 2004; Gutierrez et al., 2020). La información gustativa proveniente de la lengua asciende a la CI (a través de sus relevos) de manera ipsilateral y contra-lateralmente (Stevenson et al., 2013). Aunque en humanos se ha reportado la falta de relevo en el núcleo parabraquial dorsolateral en la vía gustativa, existen reportes del relevo en este núcleo en el flujo de la información visceral (Staszko & Boughter, 2020; Topolovec et al., 2004), un componente importante los estímulos gustativos.

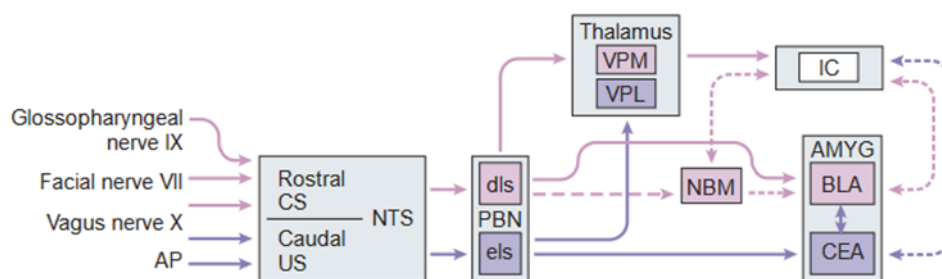


Figura 2. Esquema de las vías gustativa y visceral. AMYG, amígdala; AP, área postrema; BLA, núcleo basolateral de la amígdala; CEA, núcleo central de la amígdala; CS, estímulo condicionado; dls, subnúcleo dorsolateral; els, subnúcleo lateral exterior; IC, corteza insular; NBM, núcleo basal magnocelular; NTS, núcleo del tracto solitario; PBN, núcleo parabraquial; VPL, núcleo ventral posterior lateral del tálamo; VPM, núcleo posteromedial ventral del tálamo. Las líneas continuas representan axones que transportan información gustativa o visceral. Las líneas discontinuas representan proyecciones que se sabe que están involucradas en la aversión condicionada al gusto. Imagen tomada de Bermúdez-Rattoni (2004).

En la CI, el último relevo de la información gustativa, la presentación de un estímulo gustativo novedoso, como la sacarina y la quinina, induce un incremento en la liberación de acetilcolina (ACh) y DA (Bermúdez-Rattoni, 2004; Guzmán-Ramos et al., 2010; Miranda et al., 2000). La ACh actúa sobre receptores muscarínicos y activa a la fosfolipasa C (PLC). La PLC activa proteínas cinasas tipo C (PKC) lo que induce la fosforilación de receptores tipo ácido N-metil-D-aspartato (NMDA) y contribuye a la formación de la memoria (Roberson et al., 1999). Una vez que el sabor se ha vuelto familiar, la liberación de ACh disminuye (Bermúdez-Rattoni, 2004; Miranda et al., 2000). Por otra parte, la DA activa receptores tipo D1 que incrementan los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) a través de adenilato ciclasa (AC), activando proteínas cinasas tipo A (PKA) las cuales activan a factores de transcripción como CREB (proteína de respuesta a elementos vinculantes a AMPC, por

sus siglas en inglés) y cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) (Guzmán-Ramos et al., 2012). Finalmente, la información visceral que se asocia con un estímulo gustativo induce la liberación de Glu en la CI promoviendo una cadena de señalización que incluye la fosforilación de PKA, PKC, actividad de la proteína calcio calmodulina cinasa II (CaMKII), de CREB y de ERK, entre otras (Bermúdez-Rattoni, 2014; Guzmán-Ramos et al., 2012). En conjunto, estas evidencias sugieren que la actividad de la CI es esencial para el procesamiento de la información gustativa, futuras investigaciones son necesarias para determinar su participación en la formación, consolidación y evocación de memorias de aversión al sabor.

Corteza Insular

Localización

La CI mantiene una ubicación anatómica similar interespecies (Gogolla, 2017). En los primates, incluidos los humanos, la CI se pliega profundamente dentro del surco lateral de cada hemisferio escondida entre los lóbulos frontales, parietales y temporales; en especies lisencefálicas, como ratones y ratas, la ínsula se encuentra expuesta en la superficie lateral del hemisferio por encima de la cisura rinal y con una porción localizada ventral a la corteza olfatoria (Gogolla, 2017; Maffei et al., 2012). La CI comprende tres áreas que difieren en su citoarquitectura: las subdivisiones granular, disgranular y agranular (Figura 3) (Bermúdez-Rattoni, 2004; Gogolla, 2017; Maffei et al., 2012; Pushparaj et al., 2015). La CI granular tiene una estructura clásica de seis capas, en la CI disgranular la capa IV es más delgada y en la CI agranular la estructura es trilaminar pues, no se encuentra la capa IV y las capas V y VI se fusionan (Gogolla, 2017; Maffei et al., 2012).

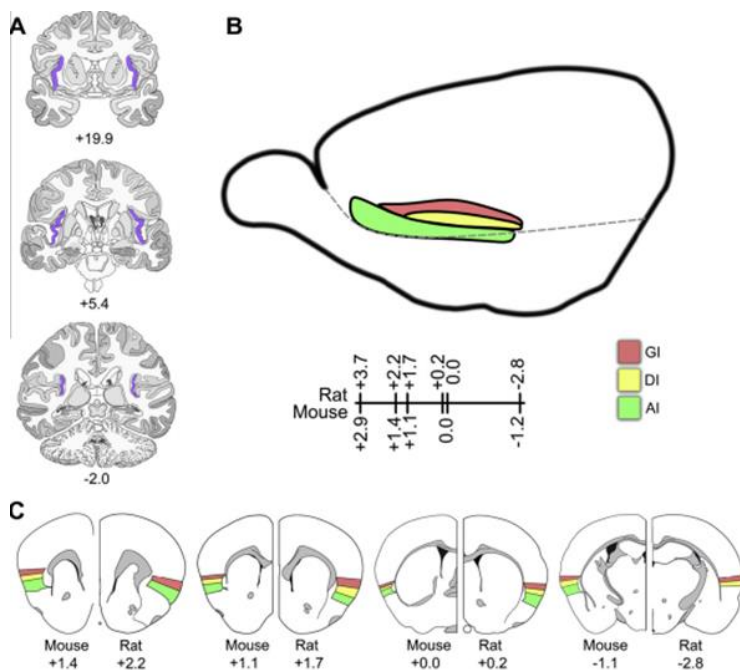


Figura 3. Anatomía de la corteza insular. A) Representación esquemática del CI en humanos, las coordenadas son de la comisura anterior. B) Representación esquemática del CI en ratones y ratas a lo largo del surco rinal que muestra a la CI granular (GI), disgranular (DI) y agranular (AI). C) Representaciones esquemáticas de secciones coronales de ratones (izquierda) y ratas (derecha) en varias secciones antero-posterior desde bregma como cero. Imagen tomada de Bermúdez-Rattoni (2014).

Diferentes estudios han segregado a lo largo de los ejes rostrocaudal y dorsal-ventral a la CI y han denominado a la CI posterior como “corteza visceral” y a la CI anterior como la “corteza gustativa (Staszko et al., 2020). Sin embargo, existe un alto grado de

interconectividad entre estas regiones de la CI a lo largo de ambos ejes anatómicos y entre hemisferios (Mizoguchi et al., 2016; Stevenson et al., 2013), por lo que las subregiones de la CI no deben examinarse como estructuras independientes, sino como parte de una red cortical distribuida más grande (Staszko et al., 2020). Respecto a la topografía de la CI y sus funciones, la CI disgranular se ha asociado a modalidades gustativas, la granular con funciones viscerosensoriales y la posterior agranular con la integración multimodal límbica (Bermúdez-Rattoni, 2014). La CI presenta actividad de diferentes neuromoduladores, entre ellos la ACh, DA, serotonina y NA (Gogolla, 2017).

Si bien, se ha reportado que en la CI existe una segregación espacial para el procesamiento de la identidad de los sabores, mientras que la CI anterior se identifica como la corteza dulce y la CI posterior como la corteza amarga (Chen et al., 2011; Wang et al., 2018), otros trabajos no reportan dicha segregación espacial para la detección de sabores dentro de la CI (Fletcher et al., 2017). Adicionalmente, se ha demostrado que las neuronas en la CI responden a señales que predicen los estímulos gustativos después que se han asociado con estímulos de otra modalidad (incluidas señales visuales o auditivas), lo que sugiere que la actividad de la CI puede ser modulada por el aprendizaje y la experiencia (Vincis & Fontanini, 2016). Este hallazgo apoya la idea de que la CI en lugar de ser únicamente un relevo en el procesamiento de la información gustativa, sirve para integrar múltiples tipos de información, entre ellas la regulación de estados conductuales y el aprendizaje asociativo relacionado con la información gustativa (Maffei et al., 2012; Staszko et al., 2020).

Funciones de la corteza insular

Diversas investigaciones han destacado el papel de la CI en una gran variedad de funciones cognitivas entre ellas las representaciones sensoriales (Bermúdez-Rattoni, 2004, 2014; Gogolla, 2017; Jaramillo et al., 2018; Namkung et al., 2017), el procesamiento de información interoceptiva (Gil-Lievana et al., 2022; Naqvi et al., 2014; Paulus & Stewart, 2014), el procesamiento emocional (Bermúdez-Rattoni, 2014; Gogolla, 2017; Lamm et al., 2010; Namkung et al., 2017), el control autonómico y motor (Gogolla, 2017; Volkow et al., 2019), la predicción de error (Gogolla, 2017; Jensen et al., 2007), la toma de decisiones (Gogolla, 2017; Namkung et al., 2017), la motivación (Gogolla, 2017; Jaramillo et al., 2018; Namkung et al., 2017; Pushparaj et al., 2015) y procesos sociales complejos como la empatía (Gogolla, 2017; Lamm et al., 2010; Namkung et al., 2017).

Una de las funciones cognitivas asociadas a la actividad de la CI es la interocepción (Gil-Lievana et al., 2022; Naqvi et al., 2014; Paulus & Stewart, 2014). La interocepción permite señalar el estado fisiológico de los tejidos periféricos, incluido el dolor y la percepción de sabor, así como el prurito, el pH, la temperatura, las sensaciones orales durante la ingesta, las sensaciones viscerales generales del intestino y las sensaciones del sistema cardiovascular (Naqvi et al., 2014). La interocepción tiene un papel crítico en la sensación de placer subjetivo que se deriva del cumplimiento de necesidades homeostáticas; por ejemplo, el sabor es una sensación interoceptiva que es capaz de señalar la obtención de un nutriente y a su vez sin el sentido del gusto se le asignaría poco valor hedónico de placer al comer (Naqvi et al., 2014; Paulus & Stewart, 2014). Particularmente, la CI anterior juega un papel importante en la interocepción a través de su participación en la detección e integración

de información sobre el estado fisiológico interno en el contexto de la actividad en curso (Paulus & Stewart, 2014). La comunicación bidireccional entre la CI y regiones límbicas sugiere un papel en la integración de la información autonómica y visceral (incluida la información transmitida desde el nervio vago al núcleo del tracto solitario) con información emotiva y motivacional (Volkow et al., 2019). Uno de los componentes de la interocepción es la información gustativa, particularmente, la CI se ha considerado la corteza gustativa primaria (Bermúdez-Rattoni, 2004, 2014; Gogolla, 2017; Jaramillo et al., 2018). En este sentido, la actividad de la CI ha demostrado ser necesaria para la memoria gustativa, ya que lesiones en esta área inhiben la formación de este tipo de memorias (Bermúdez-Rattoni, 2004; Stehberg et al., 2011). El establecimiento de la memoria de sabor de largo plazo involucra la traducción de proteínas relacionadas con la plasticidad en la CI (Guzmán-Ramos et al., 2018; Rodríguez-Ortiz et al., 2005). Guzmán-Ramos et al. demostraron que la síntesis de Arc (un gen de expresión temprana) en la CI está involucrada en la memoria de largo plazo de sabores seguros, es decir, aquellos sin consecuencias gástricas aversivas, pero no en los trazos de memoria aversiva al sabor. En su lugar los autores sugieren que la amígdala se encarga de estabilizar estos trazos (Guzmán-Ramos et al., 2018). Por otro lado, diversos estudios han demostrado la importancia de la CI en los procesos de adquisición, consolidación y extinción del condicionamiento de aversión al sabor (CAS) (Bermúdez-Rattoni, 2004); en este paradigma conductual un sabor novedoso es asociado con un malestar visceral (Bermúdez-Rattoni, 2014; Gogolla, 2017). Por ejemplo, Rodríguez-Durán et al. encontraron que la inducción de depresión a largo plazo en la proyección BLA-CI previa al entrenamiento de CAS facilita la extinción del CAS. Por el contrario, la inducción de potenciación a largo plazo mejora la retención del CAS (Rodríguez-Durán et al., 2017). Yiannakas et al. reportaron que la adquisición de una memoria aversiva al sabor requiere de la activación de neuronas excitadoras y la inhibición de neuronas inhibitoras, particularmente de las interneuronas de parvalbúmina en la CI anterior (Yiannakas et al., 2021). Aunado a esto, Stehberg et al. señalan que la CI es esencial para la adquisición y recuperación de la memoria al sabor independiente de la preferencia del sabor original, pues lesiones en la CI generan una disminución de la neofobia tanto para sabores preferidos como no preferidos (Stehberg et al., 2011). Así mismo, Osorio-Gómez et al., señalan que la presentación de un estímulo gustativo novedoso induce una elevación en la CI de noradrenalina (NA) y DA independientemente de la valencia innata del estímulo, adicionalmente reportan que la actividad de DA se asocia a la formación de una memoria de reconocimiento al sabor y la actividad glutamatérgica se asocia con el valor aprendido de un estímulo gustativos (Osorio-Gómez et al., 2021) Así mismo, la actividad de la CI se ha asociado con procesos motivacionales como las adicciones. Naqvi (2007) realizó un estudio a pacientes con daño cerebral en diferentes áreas del sistema nervioso central y encontró que el daño en la CI produce la interrupción del consumo de tabaco en pacientes adictos. Esta interrupción en el consumo se vio acompañada de la ausencia de recaídas durante la abstinencia y reportes de ausencia de deseos conscientes de fumar (Naqvi et al., 2007). Otros trabajos de neuroimagen también han reportado el aumento de actividad de la CI ante la presentación de sustancias de abuso (Brasser et al., 2012; Feldstein-Ewing et al., 2010; Filbey et al., 2008) o de claves visuales relacionadas a estas sustancias (Tang et al., 2012).

Adicionalmente, se ha reportado una relación entre la actividad de la CI anterior dorsal y las conductas de búsqueda de sustancias de abuso (Cosme et al., 2015). Diversos trabajos han reportado que el consumo de sustancias de abuso, como nicotina (Addicott et al., 2012; Naqvi et al., 2014; Sutherland et al., 2011), el cannabis (Jacobus et al., 2012; Van Hell et al., 2011), la cocaína (Bonsón, 2002), las anfetaminas (Morales et al., 2012), entre otros, generan cambios de actividad en la CI. Dichos trabajos sugieren que estos cambios de actividad en la CI están asociados a la función interoceptiva de esta área. Además, la actividad de la CI se ha asociado a la valoración hedónica durante procesos tanto cognitivos como afectivos (Vijayaraghavan et al., 2013).

Se ha argumentado que la CI proporciona una señal de saliencia durante el procesamiento relacionado con la recompensa (Metereau & Dreher, 2013), componente importante en procesos motivacionales como las adicciones. La saliencia se define como la capacidad de un estímulo para aumentar el estado alerta, excitación y atención, lo que mejoran el procesamiento neuronal y las respuestas conductuales (Schultz, 2013). Existen tres formas de saliencia: la saliencia física, aquella asociada a la intensidad del estímulo en comparación con otros, la saliencia de novedad o sorpresa que se origina en eventos novedosos o sorprendentes y la saliencia motivacional que es producida comúnmente por recompensas y castigos (Schultz, 2013). La saliencia de los estímulos, incluido el gusto, es adaptativa porque la información saliente tiene mayor probabilidad de consolidarse a memoria a largo plazo comparado con información de estímulos menos salientes (Gil-Lievana et al., 2022). Como se observa, la CI cuenta con una amplia variedad de funciones entre las que destacan los procesos interoceptivos y motivacionales, lo que podría señalar a esta área como un centro integrador de información emocional, sensorial y cognitiva.

El VTA y el sistema dopaminérgico

Como se mencionó anteriormente, la CI presenta actividad de diferentes neuromoduladores, entre ellos la DA (Gogolla, 2017). La aferencia dopaminérgica más importante hacia la CI proviene del VTA (Gil-Lievana et al., 2020, 2022; Ohara et al., 2003). El VTA es un área del mesencéfalo que está integrada por diferentes poblaciones celulares, principalmente dopaminérgicas, pero también gabaérgicas y glutamatérgicas (Bariselli et al., 2016; Morales & Margolis, 2017; Trutti et al., 2019). De manera general el VTA se puede dividir en áreas laterales y mediales formada por diversos núcleos: lateralmente se encuentran el núcleo pigmentado parabrancúlico y el núcleo paranigral, medialmente se encuentran el núcleo interfascicular, el núcleo lineal rostral y el núcleo lineal caudal (Figura 4) (Bariselli et al., 2016; Trutti et al., 2019). Mientras que las neuronas dopaminérgicas en el VTA tienen un patrón de organización homogéneo, las neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas tienden a distribuirse dorso-medialmente (Morales & Margolis, 2017; Morales & Root, 2014). En humanos, se ha reportado que aproximadamente del 50 al 80% de las células corresponde a neuronas dopaminérgicas, mientras que el 30% es gabaérgicas y el 5% glutamatérgicas (Root et al., 2016; Trutti et al., 2019).

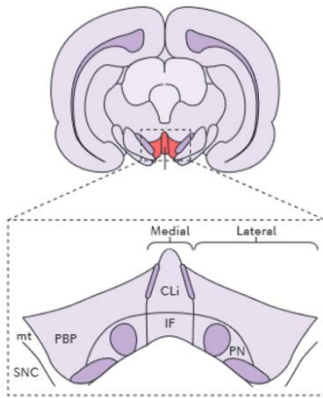


Figura 4. Esquema de anatomía del VTA. El VTA se divide en diferentes núcleos: el núcleo pigmentado parabraquial (PBP), el núcleo paranigral (PN), el núcleo lineal caudal (CLi), el núcleo interfascicular (IF) y el núcleo lineal rostral del rafe (RLi; no se muestra). Otras abreviaturas: mt, núcleo terminal medial del tracto óptico accesorio; SNC, sustancia negra pars compacta. Imagen tomada de Morales & Margolis, (2017).

Las neuronas dopaminérgicas del VTA tiene conexiones con diferentes áreas corticales y subcorticales, entre ellos con el NAc, la amígdala, el hipocampo, el palidum ventral, el giro periacueductal, el núcleo del lecho de la estría terminal, el bulbo olfatorio, el locus coeruleus, y la corteza (Morales et al., 2012; Morales & Margolis, 2017). Entre las áreas corticales con las que el VTA tiene conexión se encuentra la CPF medial (Lammel et al., 2012) y la CI (Gil-Lievana et al., 2020, 2022; Ohara et al., 2003). Las neuronas dopaminérgicas del VTA han reportado cambios de actividad ante estímulos recompensantes (especialmente para aquellos estímulos recompensantes impredecibles), ante estímulos aversivos, entre otras (Eshel et al., 2016; Schultz, 2002). Aunque la actividad dopaminérgica también se ha asociado con actividad motora, se ha reportado que la DA originada en su mayor parte por la sustancia nigra es la responsable de esta función, Howe & Dombeck (2016) reportaron que del total de las neuronas registradas el 19% de neuronas dopaminérgicas del VTA se activaron ante la locomoción, comparado con el 100% de las neuronas dopaminérgicas registradas en la sustancia nigra (Howe & Dombeck, 2016). Generalmente, la actividad tónica de las neuronas DA ronda en los 1-8 Hz, mientras que la actividad fásica se da en valores > 15 Hz (Schultz, 2002; Volkow et al., 2019).

Se ha mostrado que el uso de sustancias de abuso modifica diversos sistemas de neurotransmisores como el sistema glutamatérgico (Scheefhals & MacGillavry, 2018), el sistema gabaérgico (Yiannakas et al., 2021), el sistema colinérgico (Dautan et al., 2016), el serotoninérgicos (Macoveanu, 2014) o el noradrenérgicos (Fitzgerald, 2013). La actividad dopaminérgica y su interacción con diversas áreas del SNC forman el denominado circuito de recompensa que es modificado durante las adicciones (MacNicol, 2017; Volkow & Morales, 2015). El uso de sustancias de abuso activa el circuito de recompensa, particularmente a través del sistema dopaminérgico, lo que genera sensaciones de placer y en consecuencia el individuo continua con conductas dirigidas a la búsqueda y consumo de estas (MacNicol, 2017). La actividad de la vía VTA-NAc a través de neuronas dopaminérgicas se ha asociado a las conductas dirigidas a la búsqueda de la recompensa y a la saliencia de estímulos asociados a ella (Salamone & Correa, 2012). Así mismo, las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra proyectan al cuerpo estriado dorsal, la activación

repetida de esta conexión está asociada a la formación de hábitos durante las adicciones (Everitt & Robbins, 2016). La DA proveniente del VTA también se proyecta a la amígdala y el hipocampo e interviene en las asociaciones emocionales (Volkow et al., 2019). Finalmente, las proyecciones del VTA a la CPF median la atribución de saliencia y la autorregulación lo que participa en el reforzamiento y condicionamiento que lleva al consumo crónico de sustancias de abuso (Domingos et al., 2011; Mikhailova et al., 2016; Stuber et al., 2011; Volkow et al., 2019).

En resumen, el VTA es un área con alta conexión con diversas áreas corticales, entre ellas la CI, La actividad del sistema dopaminérgico proveniente del VTA es capaz de modular el aprendizaje y la memoria a través de otros sistemas de neurotransmisión como el glutamatérgico. Así mismo, se ha reportado que el consumo de sustancias de abuso modifica la actividad dopaminérgica y en conjunto con otras áreas del SNC promueven conductas de búsqueda y acercamiento a dicha sustancia de abuso, esto a través del aprendizaje y la memoria.

Corteza insular, memoria de reconocimiento al sabor e interocepción

La actividad de la CI es importante en los procesos interoceptivos, particularmente en el procesamiento de información gustativa y la valoración hedónica (Gil-Lievana et al., 2022; Naqvi et al., 2014; Paulus & Stewart, 2014). Modelos animales en roedores de consumo de a dos botellas (alcohol vs agua y sacarosa vs agua) muestran que la estimulación de la CI anterior disminuye el consumo tanto de alcohol como de sacarosa, no así de agua. Lo anterior sugiere que la actividad de esta área modifica la percepción de estímulos recompensantes y no así de neutros (Haaranen et al., 2020). Por otra parte, se ha reportado la participación de la actividad dopaminérgica tanto a estímulos gustativos apetitivos como aversivos en la CI (Osorio-Gómez et al., 2021). Estudios de nuestro grupo de investigación muestran que la estimulación optogenética de los cuerpos celulares catecolaminérgicos en el VTA produce preferencia de lugar. Además, la estimulación optogenética del VTA modula las respuestas neuronales de la CI anterior. (Gil-Lievana et al., 2020), así mismo la fotoestimulación dopaminérgica del VTA y de la vía VTA-CI incrementa la saliencia de los estímulos y logra consolidar estímulos gustativos, independientemente de su valor hedónico (Gil-Lievana et al., 2022). Adicionalmente, reportaron que la estimulación dopaminérgica de la vía VTA- CI no afecta el entrenamiento, pero sí la memoria de reconocimiento gustativa en una prueba de preferencia a dos botellas (Gil-Lievana et al., 2022). El trabajo de Gil-Lievana et al., (2022), logra evaluar de manera general a la memoria de reconocimiento al sabor, sin embargo, deja de lado el papel de la neofobia y la AN en este tipo de memoria. Finalmente, Peng et al. (2015) observaron que la estimulación optogenética en la CI anterior incrementa el consumo de un estímulo amargo, así como promover conductas relacionadas al estímulo como las expresiones faciales (Peng et al., 2015). En este trabajo nos enfocamos en investigar la diferencia entre la fotoestimulación de los somas catecolaminérgicos del VTA y las terminales catecolaminérgicas de la vía VTA-CI en la formación de la memoria de reconocimiento al sabor a través del estudio de la neofobia y la atenuación de la neofobia (AN), particularmente en estímulos gustativos aversivos.

JUSTIFICACIÓN

Históricamente la investigación preclínica en adicciones ha dicotomizado los efectos de las sustancias de abuso en el sistema gustativo y los post-ingestivos, muchas veces ignorando o quitándole importancia a los efectos gustativos (Brasser et al., 2015). El sabor juega un papel importante en las adicciones ya que este puede servir como un reforzador y como un estímulo discriminativo (Meisch, 2001). El rol del aprendizaje en la recompensa sensorial que se obtiene por la administración oral de algunas sustancias de abuso se hace relevante cuando se toma en cuenta que el tabaco (Bewley et al., 1974; Hahn et al., 1990) y el alcohol (Brasser et al., 2012, 2015) contienen componentes aversivos que con el uso continuo dejan de influir en el consumo de dichas sustancias (Naqvi & Bechara, 2005; Rose, 2006). Como se ha mencionado, el VTA y la CIa son áreas asociadas no sólo a las adicciones, sino también a los procesos de memoria, entre ellas la memoria de reconocimiento al sabor. Adicionalmente, se ha reportado una conexión de tipo catecolaminérgica entre dichas áreas. El estudio de la vía VTA-CIa nos permitirá entender los cambios en el procesamiento de la información gustativa que puede existir en los procesos adictivos, entre ellos la neofobia, la atenuación de la neofobia gustativa y la memoria de reconocimiento al sabor. Es importante señalar que estudiar el efecto de la estimulación optogenética de los somas catecolaminérgicos del VTA vs el efecto en la vía VTA-CIa nos permitirá identificar con mejor precisión la función de la vía sobre en la neofobia, atenuación de la neofobia y la memoria de reconocimiento al sabor pues, estimular optogenéticamente los somas catecolaminérgicos del VTA podría afectar la actividad de conexiones a otras áreas nos gustativas.

OBJETIVOS

Generales

Investigar las diferencias entre la fotoestimulación de los somas catecolaminérgicos del VTA y las terminales catecolaminérgicas de la vía VTA-CI en la neofobia y atenuación de la neofobia gustativa como parte de la formación de la memoria de reconocimiento al sabor, particularmente sobre estímulos gustativos aversivos.

Particulares

Evaluar si la estimulación optogenética de los somas catecolaminérgicos del VTA durante la primera presentación al sabor tiene un efecto en la neofobia gustativa de un sabor amargo.

Evaluar si la estimulación optogenética de las fibras catecolaminérgica en la CI provenientes del VTA durante la primera presentación al sabor tiene un efecto en la neofobia gustativa de un sabor amargo.

Evaluar el efecto de la estimulación optogenética de somas catecolaminérgicos del VTA durante la segunda presentación de un sabor amargo en la atenuación de la neofobia.

Evaluar el efecto de la estimulación optogenética de las fibras catecolaminérgica en la CI provenientes del VTA durante la segunda presentación de un sabor amargo en la atenuación de la neofobia.

Evaluar el efecto de la estimulación optogenética en los somas catecolaminérgicos del VTA y de las fibras catecolaminérgica en la CI provenientes del VTA en una prueba de memoria de preferencia a dos botellas entre agua y un sabor amargo.

HIPÓTESIS

Si el VTA participa en la asignación de recompensa de los estímulos, entonces la estimulación optogenética de los somas catecolaminérgicos del VTA durante la primera presentación de quinina eliminará la neofobia gustativa.

Si la vía VTA-CI está asociada al procesamiento de información interoceptiva, entonces la estimulación optogenética de las fibras catecolaminérgicas de la CI provenientes del VTA durante la primera presentación de quinina incrementará el efecto de neofobia gustativa.

Si el VTA participa en la asignación de recompensa de los estímulos, entonces la estimulación optogenética de los somas catecolaminérgicos del VTA acelerará la atenuación de la neofobia de la quinina.

Si la vía VTA-CI está asociada al procesamiento de información interoceptiva, entonces, la estimulación optogenética de las fibras catecolaminérgicas de la CI proveniente del VTA retrasará la atenuación de la neofobia de la quinina.

Si el VTA participa en la asignación de recompensa de los estímulos, entonces a estimulación optogenética de los somas catecolaminérgicos del VTA producirá una preferencia por la quinina en una prueba de memoria de reconocimiento a dos botellas.

Si la vía VTA-CI está asociada al procesamiento de información interoceptiva, entonces, la estimulación optogenética de las fibras catecolaminérgicas de la CI proveniente del VTA producirá una aversión por la quinina en una prueba de memoria de reconocimiento a dos botellas, comparado con su grupo control.

MÉTODO

Animales

Se utilizaron ratones macho y hembra TH-Cre heterocigotos de la cepa C57BL/6, así como ratones wild type C57BL/6 de 8 a 12 semanas para todas las pruebas conductuales (Figura 5). Reportes indican que no existen diferencias significativas en el umbral de reconocimiento de la quinina entre machos y hembras (Fulenwider et al., 2019) y que una vez que los animales alcanzan las seis semanas de vida no hay cambios progresivos en la preferencia de quinina (Tordoff, 2007). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Fisiología Celular (FBR125-18) y cumplieron con los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre el uso y cuidado de animales de laboratorio. Los ratones fueron

alojados del nacimiento a los 2 meses de edad en cajas de entre 4 a 5 animales; una vez cumplido este periodo se almacenaron en cajas individuales. Los animales estuvieron en un ambiente de 22 a 24°C con un ciclo 12/12 de luz-oscuridad, con agua y alimento ad libitum, al menos que se establezca lo contrario en los protocolos conductuales.

Con el fin de evaluar el cambio del valor hedónico de un sabor se formaron grupos experimentales que fueron manipulados por medio de la técnica de optogenética. Con esta técnica es posible modificar las respuestas neuronales a través de la inserción de proteínas sensibles a la luz (Goshen, 2014; Pastrana, 2011). Por otra parte, los ratones transgénicos TH-Cre tienen el promotor de tirosina hidroxilasa (TH) de rata que dirige la expresión de la recombinasa Cre a las células catecolaminérgicas, lo que restringe la estimulación de neuronas catecolaminérgicas ante la estimulación optogenética (The Jackson Laboratory, 2019). Es por esto por lo que, mediante la infección de un virus portador de la proteína sensible a la luz, channel rodopsin 2 (ChR2), en animales transgénicos TH-Cre se manipuló la actividad de las neuronas catecolaminérgicas.

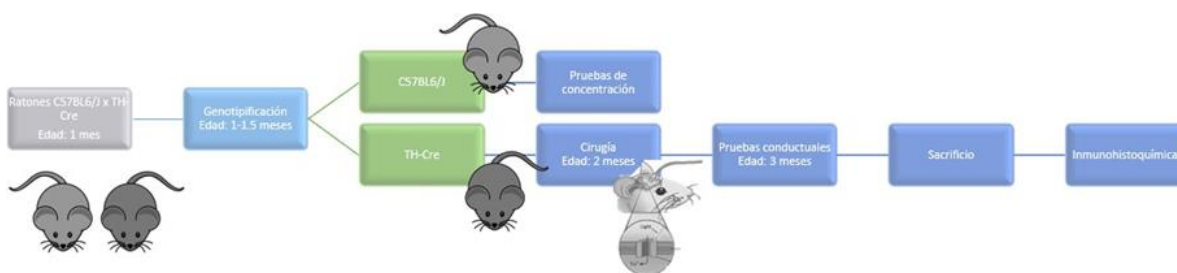


Figura 5. Cronología de la vida de los animales utilizados para los procedimientos

Genotipificación

Para la identificación de los ratones heterocigotos TH-Cre se realizó una genotipificación a través de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR). La extracción de tejido se hizo inmediatamente después del destete de los animales, es decir, al primer mes de vida de los ratones; esto se hizo obteniendo un pedazo de cola del animal. Tras obtener las colas, estas fueron maceradas con solución de lisis alcalina (50 μ L de NaOH 10N) y se incubaron por 1 hora a 95°C. Después se añadió solución de neutralización (50 μ L de Tris HCl 40mM) y se centrifugaron las muestras (4°C a 12,500 rpm por 2 minutos). A las muestras se les añadió la mezcla de primers con los reactivos correspondientes, y se colocaron en un termociclador de PCR para su procesamiento. Este ADN se usó para la amplificación de PCR con el kit QIAGEN. Los primers utilizados para la PCR fueron Cre Reverse: 5'GGTTTCCCGCAGAACCTGAA y Cre Forward: 5'AGCCTGTTTTGCACGTTACCC. El producto de la reacción fue identificado por medio de electroforesis en un gel de agarosa en una solución amortiguadora TAE 1x (Trizma base + ácido acético + EDTA) a 70 V por 45 minutos.

Procedimientos de infección

Para estudiar la vía catecolaminérgica VTA-CI se hizo uso de un constructo adenoviral cre-dependiente que exprese el canal de rodopsina-2 (ChR2), activado con luz (λ

473 nm) y la proteína reportera (EYFP), para infectar animales transgénicos que expresen la cre-recombinasa en presencia del promotor de la enzima TH.

Para la infección se realizó una cirugía estereotáxica. Se indujo anestesia con isoflurano 2-3 % y mantenimiento de esta al 0.5-1%, con flujo constante de oxígeno a 1 l/min, los animales fueron montados en un aparato estereotáxico con un adaptador para ratón. Durante la cirugía se aplicaron lagrimas artificiales para evitar daño a los ojos. Se removió una pequeña porción de piel de la cabeza del ratón para tener acceso al cráneo y se alinearon en bregma al mismo plano horizontal que lambda.

Todos los grupos fueron infectados en el VTA en las coordenadas AP: +3.0 mm, ML: \pm 0.6 mm, DV: -5.4 mm con referencia en el parénquima, a través de la administración bilateral de 0.5 μ L con el virus pAAV5-EF-1-DIO-hChR2-EYFP (virus que promueve la síntesis del canal de rodopsina y la expresión de la proteína verde fluorescente) o el virus pAAV5-EF-1-DIO-EYFP (virus que solo promueve la expresión de la proteína verde fluorescente). La administración fue realizada manteniendo en el VTA un capilar que permite la difusión del virus por 5 minutos. A todos los grupos se le implantó bilateralmente férulas de fibra óptica (apertura numérica 0.22, 200 μ m de diámetro; Doric Lenses) en la CI o en el VTA, dependiendo del grupo

Las fibras ópticas se aseguraron con un casco de cemento dental. Al finalizar la cirugía se aplicó un antimicótico de efecto local en las heridas (ketoconazol), y los animales fueron devueltos a sus cajas para la recuperación. De tres a cuatro semanas después de la administración de vector viral, comenzaron las pruebas conductuales. Dichas semanas permitieron la expresión del canal de rodopsina.

Grupos

Se formaron los siguientes grupos experimentales:

Con el fin de analizar si la estimulación optogenética en la vía VTA-CI modifica el consumo de quinina, al primer grupo VTA-CI ChR2, fue infectado en el VTA con el virus pAAV5-EF-1-DIO-hChR2-EYFP y se implantó bilateralmente férulas de fibra óptica en la CIa en las coordenadas: AP: -1.6 mm, ML: \pm 2.9 mm, DV: -3.2 mm con referencia a bregma.

Como grupo control, el grupo VTA-CI EYFP, fue infectado en el VTA con el vector vacío pAAV5-EF-1-DIO-EYFP y se le implantó bilateralmente férulas de fibra óptica en la CI en las coordenadas: AP: -1.6 mm, ML: \pm 2.9 mm, DV: -3.2 mm con referencia a bregma.

Con el fin de analizar si la estimulación optogenética en el VTA modifica el consumo de quinina, el grupo VTA ChR2 fue infectado con el virus pAAV5-EF-1-DIO-hChR2-EYFP y se le implantó bilateralmente férulas de fibra óptica en el VTA en las coordenadas: AP: +3.0 mm, ML: \pm 0.6 mm, DV: -5.0 mm con referencia a parenquima, con un ángulo de 14°.

Como grupo control, el grupo VTA EYFP fue infectado con el vector vacío pAAV5-EF-1-DIO-EYFP y se le implantó bilateralmente férulas de fibra óptica en el VTA en las coordenadas: AP: +3.0 mm, ML: \pm 0.6 mm, DV: -5.0 mm con referencia a parenquima, con un ángulo de 14°.

Adicionalmente, se realizaron dos grupos SHAM-agua. Los animales de este grupo recibieron el mismo procedimiento quirúrgico (férulas bilaterales) con las características y en las coordenadas ya mencionadas, con la excepción de no recibir ningún constructo viral y en su lugar recibir solución salina.

Pruebas conductuales

Prueba de concentración de quinina

Con el fin de evaluar la concentración de quinina a la cual los animales eran capaces de distinguir entre agua y quinina se llevó a cabo una prueba a dos botellas por 48 horas. De acuerdo con Tordoff (2002). Las pruebas a dos botellas de 48 horas proveen tres principales ventajas sobre otros métodos: la primera es que un periodo de 48 horas reduce el riesgo de derrames o evaporación de los líquidos a medir; la segunda ventaja es que el rango de ingestas típicamente observado en las pruebas de 48 horas son lo suficientemente grande como para ver diferencias entre diferentes grupos de animales, tratamientos o concentración del sabor; la tercera ventaja es que este periodo de tiempo permite controlar la preferencia de lugar innata en los animales ya que la posición del bebedero con la solución a evaluar se cambia a las 24 horas (Tordoff, 2002).

En este protocolo los animales fueron alojados individualmente y en su caja hábitat se colocaron dos bebederos, uno de ellos con agua y el otro con quinina. Diferentes grupos recibieron diferentes concentraciones de quinina, esto con el fin de evaluar la discriminación entre quinina y agua. Se realizaron cuatro grupos que correspondían a la concentración de quinina, expresada como la cantidad en miligramos de quinina en 100 ml de agua: 1.0mg/100ml, 1.5mg/100ml, 2.0mg/100ml y 2.5mg/100ml. Al inicio del protocolo, de un lado de la caja se colocó el bebedero con quinina y a una distancia de 5cm el bebedero de agua. A las 24 horas, la posición de los bebederos se intercambiaba y se hacía una medición de la cantidad de consumo en cada bebedero. Al término del segundo día del protocolo se hizo una segunda medición del consumo de cada bebedero. La posición inicial del bebedero con quinina se contrabalanceo en todos los grupos. El promedio de los dos días fue la medida para evaluar la discriminación entre agua y quinina.

Prueba preferencia de sabor

El protocolo conductual de reconocimiento de sabor fue adaptado de Domingos et al. (2011). Para dicho protocolo, se construyó una caja de las siguientes dimensiones: 8cm de ancho, 15.5 cm de largo y 32 cm de alto. La caja contó con dos orificios adaptados para dos medidores de lengüeteo de contacto (con una fuente láser) en una de las paredes a 2.5cm sobre el piso y 2 cm de diferencia entre cada uno de los orificios.

La estimulación optogenética se realizó mediante la aplicación de un haz de luz (láser) a 473 nm (luz azul) conectado por fibra óptica a las férulas. Los parámetros de estimulación fueron pulsos cuadrados de 5ms a una frecuencia de 20Hz y fueron administrados en el momento en el que el animal lengüeteaba los bebederos. El láser de estimulación se mantenía encendido durante 500 ms después del último de los lengüeteos. El láser se activaba mediante un sistema de detección de lengüeteos conectado al bebedero por medio de una tarjeta ARDUINO provista con un programa capaz de detectar el contacto de la lengua del animal

con el bebedero de metal y enviar una señal al láser en la frecuencia mencionada. La tarjeta estuvo conectada a una computadora que contabiliza el número de lengüeteos.

El protocolo conductual se llevó a cabo entre 21-28 días tras la cirugía de infección (Figura 6). Previo al inicio del protocolo conductual, los animales fueron manipulados por el experimentador durante 10 minutos al día por dos o tres días. El inicio del protocolo conductual comenzó en el día 0 con la habituación a la caja conductual, en este día se introducen a los animales a la caja conductual por 10 minutos, esto con el fin de habituarlos al nuevo contexto, inmediatamente después de la habituación los animales fueron privados de agua. Al siguiente día, día 1 del protocolo, a los ratones se le permitió el acceso a quinina (0.046 mM) a través del bebedero izquierdo de la caja conductual, mientras que del lado derecho el bebedero se encontraba vacío, esto por 1 hora. El consumo de quinina se pareó con una estimulación optogenética que se mantenía durante el tiempo que el animal permanecía bebiendo y 500ms después del último lick. Para equilibrar cualquier sesgo de lugar, se contrabalanceará la posición de las botellas en los diferentes grupos. En el día 2, los animales tuvieron acceso a agua en el bebedero contrario y únicamente se hizo un registro de lengüeteos y de consumo, sin ninguna estimulación. En los días 3 y 4 se hicieron repeticiones de los días 1 y 2, respectivamente. En el día 5 se realizó una prueba de preferencia de sabor a dos botellas en la que los animales tuvieron acceso a ambos bebederos (quinina y agua) durante 10 minutos. El índice de consumo para el test se calculó con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{quinina}}{\text{quinina} + \text{agua}}$$

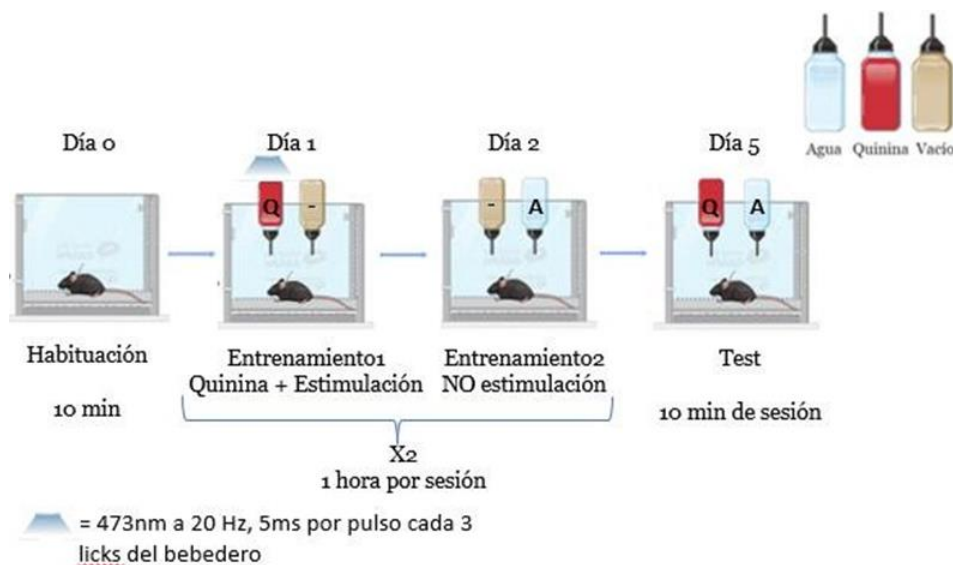


Figura 6. Cronología de la prueba de preferencia sabores.

En el caso del grupo SHAM-agua, se realizó un protocolo conductual similar al mencionado en la Figura 6. En dicho protocolo los grupos de animales SHAM fueron sometidos a 2-3 días de manipulación, un día de habituación a la caja conductual, cuatro días de entrenamiento en los que se colocó un bebedero con agua en un solo lado de la caja y

contrabalanceando de un día a otro la disponibilidad del bebedero, esto durante una hora. Durante el test, se presentaron ambos bebederos con agua por diez minutos. En todo el protocolo se midió el consumo y número de lengüeteos.

Inmunohistoquímica

Con el fin de obtener observar la correcta infección de los constructos virales se realizaron inmunohistoquímicas a cortes de cerebro de los animales experimentales. La inmunohistoquímica es un método basado en las reacciones inmuno-enzimáticas usando anticuerpos mono o policlonales para detectar la presencia de proteínas específicas en las células de tejidos. Tras los procedimientos conductuales, a los animales se les administró una dosis letal de pentobarbital sódico y solución salina 1:1, inmediatamente después se realizó la fijación del cerebro mediante perfusión intracardiaca con 0.9 % de NaCl seguido de solución de paraformaldehído 4% pH 7.4. Los cerebros se removieron y se colocaron en solución de paraformaldehído 4% pH 7.4 por 12 horas aproximadamente, posteriormente se colocaron en solución de sacarosa 30% durante 48 horas. Los cerebros fueron colocados en tissu-tek para realizar cortes coronarios con el criostato (Leica Biosystem, Richmond, USA) en cortes de 50 μm colocados en flotación en buffer de Trizma base-salina (TBS) 0.1 M pH 7.4.

Para la inmunohistoquímica se seleccionó cortes correspondientes al VTA y CI y se realizó 3 lavados con TBS 1x pH 7.4 durante 10 min, posteriormente se realizó un bloqueo con TBS-Tritón 0.1 % y BSA 2% por 30 min y se incubó con anticuerpo primario rabbit α -TH (1:1000, Millipore) en TBST 0.1% pH 7.4 y BSA 2% durante una noche a 4°C en agitación constante. Al día siguiente se lavó con TBS-T 0.1% pH 7.4 y se incubó con anticuerpo secundario goat anti-Rabbit IgG Cy3 (1:500, Milipore) en TBS-T 0.1% pH 7.4 y BSA 2%, durante 1 h a temperatura ambiente, cubriendo los cortes de la luz y con agitación constante. Posteriormente se lavó con TBS 1x pH 7.4 y se agregó DAPI al 0.3 μM por 1min, seguido de un lavado con TBS 1x pH 7.4 por 10 minutos. Finalmente se realizó montaje en laminillas VWR en medio DAKO.

Análisis estadístico

Para determinar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de D'Agostino & Pearson, Para realizar el análisis estadístico del consumo durante el entrenamiento y preferencia de consumo se usó una ANOVA de dos vías (grupo x sesión) y como prueba post hoc la prueba Fisher, Un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo. Los datos fueron analizados usando Microsoft Excel y Prism (GraphPad Software).

RESULTADOS

Con el fin de determinar la concentración a la cual los animales reconocían entre la quinina y el agua se realizó una prueba a dos botellas durante 48 horas. Como se observa en la Figura 7 la concentración de 1.0mg en 100 ml de agua los animales son incapaces de reconocer entre agua y quinina. Sin embargo, a partir de una concentración de 1.5mg en 100ml el consumo de quinina es significativamente menor que el de agua lo que implica que, los animales son capaces de distinguir la quinina a esta concentración. De acuerdo con estos

resultados, la concentración de 1.5mg/100ml (0.46 μ M) de quinina fue la que se utilizó para las pruebas de reconocimiento al sabor.

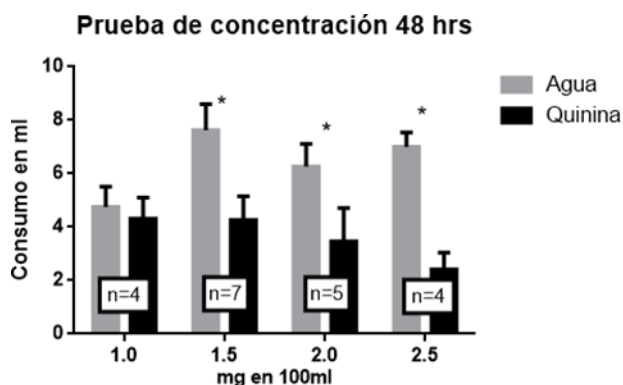


Figura 7. Prueba para determinar la concentración de quinina en las pruebas de reconocimiento al sabor. Se realizó una prueba a dos botellas por 48 horas para determinar la concentración a la cual los animales distinguen entre agua y quinina. Se realizó el test de Mann Whitney para determinar las diferencias de consumo de quinina y agua en cada grupo y se encontró que a una concentración de 1.0mg/100ml (n=4) los animales son incapaces de distinguir entre las soluciones (P=0.4143). Sin embargo, a una concentración de 1.5mg/100ml (n=7), de

2.0mg/100ml (n=5) y de 2.5mg/100ml (n=4) se encontraron diferencias significativas entre el consumo de agua y quinina (P<0.05). A partir de estos resultados se decidió utilizar en las pruebas de reconocimiento al sabor la concentración de 1.5mg/100ml. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. * P <0.05.

Con el fin de comprobar la conectividad en el VTA y la CIA, se analizaron cortes coronales de cerebro de ratones que fueron infectados con una proteína reportera expresada únicamente en células con presencia del promotor de la enzima tirosina hidroxilasa, precursor de neuromoduladores de tipo catecolaminérgico. Dichos cortes fueron tratados con una inmunohistoquímica para neuronas endógenas THérgicas y así como con un marcador núcleos celulares, diclorhidrato de 4',6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI). Se observó la expresión de la proteína reportera en los somas catecolaminérgicos del VTA y en las terminales catecolaminérgicas de la CIA provenientes del VTA, así como su co-localización con la actividad endógena de TH y del marcador DAPI. Observamos que las neuronas VTA con inmunorreactividad de TH endógena fueron positivas para EYFP cerca del sitio de inyección viral. De manera similar, en cortes coronales de aIC, la expresión de EYFP se co-localizó con terminales TH+ provenientes del VTA (Figura 8).

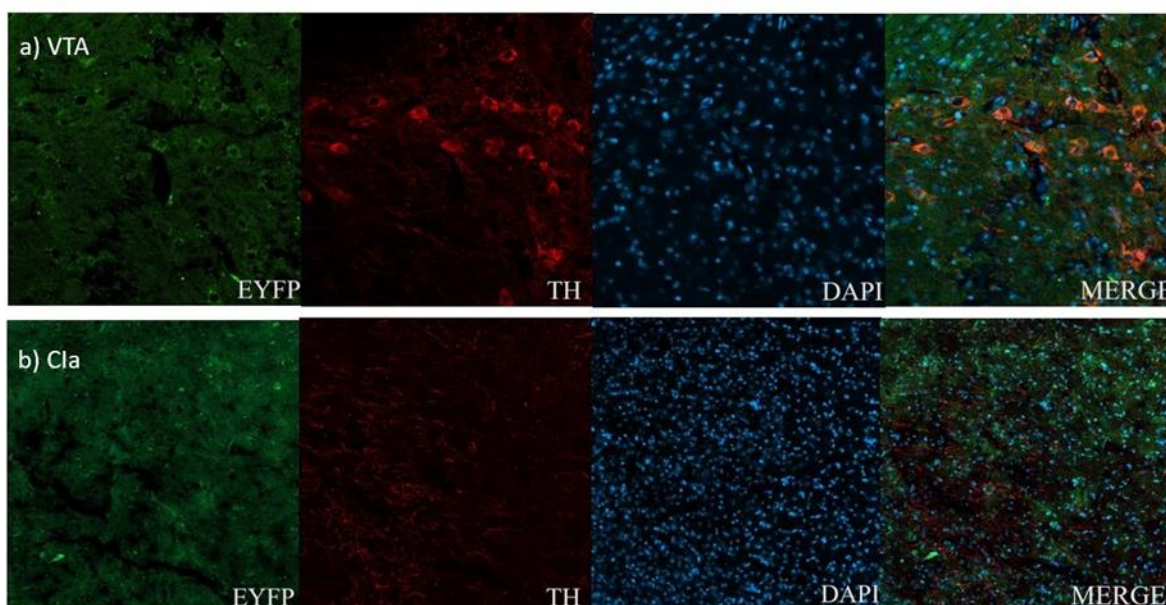


Figura 8. Imágenes representativas de la infección con la proteína reportera y la inmunorreactividad endógena de neuronas THergicas. A) Imágenes representativas del VTA, en verde observamos la presencia de la proteína reportera EYFP, en rojo la actividad endógena de neuronas TH, en azul el marcaje con DAPI. La última imagen muestra la co-localización de los tres marcadores. B) Imágenes representativas de triple inmunofluorescencia en la CIA y de la co-localización de estos.

Para determinar el papel de la estimulación optogenética de los somas catecolaminérgicos del VTA en el reconocimiento de un sabor aversivo, se realizó un protocolo de preferencia de sabor adaptado de Domingos et al., (2011). En este protocolo se asoció el consumo de quinina con una estimulación optogenética de 20 Hz (5 ms laser ON 45 ms OFF, a 12-14 mW de potencia y una longitud de onda del láser de 473 nm) cada vez que el animal hacía lengüeteaba el bebedero 3 o más veces dentro de un periodo de 1ms. Los grupos experimentales fueron los siguientes: el primer grupo fue infectado en el VTA con el canal de rodopsina sensible a la luz (VTA ChR2), mientras que el segundo grupo fue infectado únicamente con una proteína reportera (VTA EYFP). Adicionalmente, se comparó el consumo de agua en un grupo SHAM al que se sometió únicamente a la cirugía estereotáxica sin la infección del constructo viral que contenía el canal de rodopsina (SHAM-agua). Se observó que durante la primera presentación de quinina los ratones del grupo VTA ChR2 disminuyeron significativamente el consumo de quinina comparado con el grupo SHAM-agua; esta disminución se mantuvo durante la segunda presentación del control VTA EYFP (Figura 9). Adicionalmente, se encontró una diferencia significativa entre la primera y segunda presentación de quinina en los grupos VTA ChR2, el grupo control EYFP y el grupo SHAM-agua, es decir, los tres grupos aumentaron el consumo de quinina durante la segunda presentación del sabor. En resumen, la estimulación de los somas catecolaminérgicos el VTA tiene un efecto en el reconocimiento de un sabor aversivo al acentuar la neofobia gustativa, pues, el grupo VTA ChR2 consumió significativamente menos quinina que los grupos controles. Así mismo, durante la segunda presentación de quinina las diferencias entre el grupo ChR2 y los grupos controles se mantenían, sin embargo, en los tres grupos el consumo aumentó, esto lo interpretamos como un retraso en la AN por parte del grupo VTA-ChR2.

Consumo durante estimulación optogenética del VTA

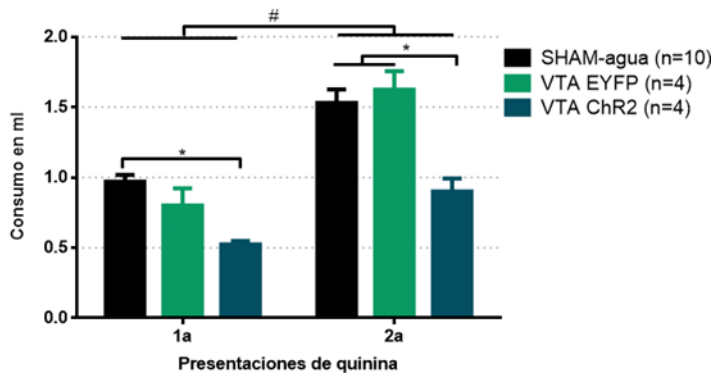


Figura 9. Consumo de quinina durante la estimulación optogenética de somas catecolaminérgicos del VTA.

Para evaluar el papel de la estimulación catecolaminérgica de somas del VTA en el reconocimiento de un sabor aversivo, se evaluó el consumo de quinina en una concentración de 1.5mg/100ml durante la estimulación optogenética. Se comparó el efecto en un grupo con el canal de rodopsina ChR2 (VTA ChR2, n=4) con un grupo control únicamente con una proteína reportera (VTA EYFP, n=4), así

como con un grupo SHAM-agua. El ANOVA de medidas repetidas mostró el efecto principal del grupo: $F(2, 15) = 15.91$ $P < 0.05$ y efecto de las sesiones $F(1, 15) = 53.82$ $P < 0.05$. La prueba post-hoc de Fisher mostró diferencias significativas en los grupos VTA ChR2 vs SHAM-agua ($P < 0.05$) durante la primera sesión de entrenamiento; durante la segunda sesión de entrenamiento se encontraron diferencias significativas de los grupos VTA ChR2 vs EYFP y VTA ChR2 vs SHAM-agua ($P < 0.05$ en ambos casos). Así mismo, se encontraron

diferencias significativas entre la primera y segunda sesión de entrenamiento en los tres grupos: VTA ChR2 ($P<0.05$), VTA EYFP ($P<0.05$) y SHAM-agua ($P<0.05$). Todos los datos se muestran como media \pm SEM. * $P<0.05$ entre grupos y # $P<0.05$ entre sesiones.

Una vez evaluado el efecto de la estimulación optogenética en los somas catecolaminérgicos del VTA en una prueba de reconocimiento al sabor, nos propusimos evaluar el efecto de la estimulación optogenética de las terminales catecolaminérgicas de la vía VTA-CI en el reconocimiento de un sabor aversivo. Se realizó el mismo protocolo de preferencia al sabor explicado anteriormente en donde el consumo de quinina se acompañaba de una estimulación optogenética. Los grupos experimentales fueron los siguientes: el primer grupo fue infectado en el VTA con el canal de rodopsina sensible a la luz con la fibra de estimulación en la CI anterior (VTA-CI ChR2), de esta manera la estimulación catecolaminérgica se limitaba a las terminales catecolaminérgicas en le CI anterior provenientes del VTA, el segundo grupo fue infectado únicamente con una proteína reportera y la fibra óptica en la CI (VTA-CI EYFP) y el tercer grupo SHAM-agua. Se observó que los ratones del grupo VTA-CI ChR2 disminuyen significativamente el consumo de quinina durante la primera presentación de quinina comparado con el grupo control EYFP y el grupo SHAM-agua. Así mismo, se presentaron diferencias significativas en el consumo entre presentaciones de quinina en el grupo VTA-CI EYFP y el grupo SHAM-agua, es decir, en ambos grupos hubo un aumento significativo del consumo durante la segunda sesión de entrenamiento; este aumento no se presentó en el grupo VTA-CI ChR2 (Figura 10). En resumen, la estimulación de las terminales catecolaminérgicas en la CIa provenientes del VTA produce una disminución en el consumo de quinina comparado con sus grupos controles, lo que indica que esta estimulación acentúa la neofobia gustativa antes la primera presentación de un sabor. Dicha diferencia con los grupos controles se mantiene en la segunda presentación de quinina, lo que parece indicar ser una inhibición en la AN.

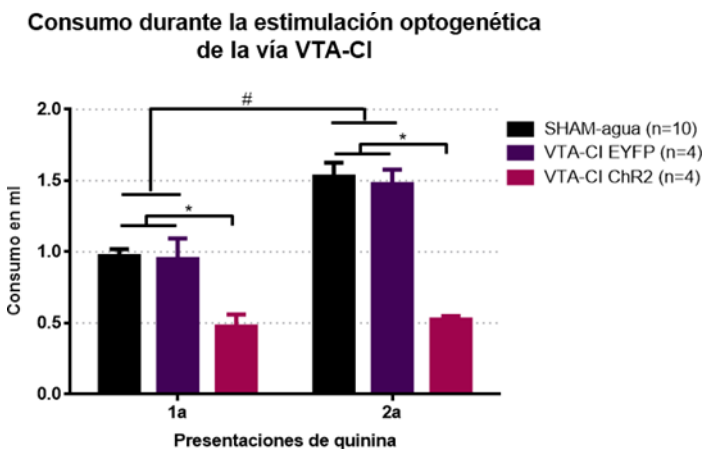


Figura 10. Consumo de quinina durante la estimulación de terminales catecolaminérgicas de la vía VTA-CI.

Para evaluar el papel de la estimulación de terminales catecolaminérgicas en la vía VTA-CI en el reconocimiento de un sabor aversivo se evaluó el consumo de quinina a una concentración de 1.5mg/100ml. Se comparó el efecto en el grupo VTA-CI ChR2 (n=4) con un grupo el grupo control VTA-CI EYFP (n=4), así como un grupo SHAM-agua. El ANOVA de medidas repetidas mostró un efecto principal de sesión $F(1, 15) = 19.38$ $P<0.05$ y de grupo

$F(2, 15) = 37.39$ $P<0.05$. La prueba post-hoc de Fisher mostró diferencias significativas entre los grupos VTA-CI ChR2 vs EYFP ($P<0.05$) y de VTA-CI ChR2 vs SHAM-agua ($P<0.05$) durante la primera sesión de entrenamiento, así como durante la segunda presentación ($P<0.05$ en ambos casos). Entre sesiones, se encontraron diferencias significativas entre la primera y la segunda sesión de entrenamiento en los grupos VTA-CI EYFP ($P<0.05$) y el grupo SHAM-agua ($P<0.05$). Todos los datos se muestran como media \pm SEM. * $P<0.05$ entre grupos y # $P<0.05$ entre sesiones.

Para determinar si la manipulación optogenética de los somas catecolaminérgicos en el VTA o en las terminales catecolaminérgicas de la CIa provenientes del VTA tiene un efecto en la memoria de reconocimiento al sabor, se evaluó el consumo en una prueba a dos botellas de quinina vs agua tras el entrenamiento de asociación de quinina y estimulación. Los resultados indican que únicamente el grupo VTA-CI ChR2 mostró una memoria de reconocimiento al sabor, expresado como una disminución de la preferencia por el consumo de quinina, esto comparado con su grupo control EYFP y con el grupo SHAM-agua. Así mismo, existe una diferencia significativa en la preferencia por la quinina entre los grupos VTA ChR2 y el grupo VTA-CI ChR2. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo VTA ChR2 y su grupo control EYFP o el grupo SHAM-agua (Figura 11). En resumen, sólo la estimulación de las terminales catecolaminérgicas en la CIa provenientes del VTA produjo cambios en la memoria de reconocimiento al sabor, expresada como una disminución en la preferencia en el consumo de quinina.

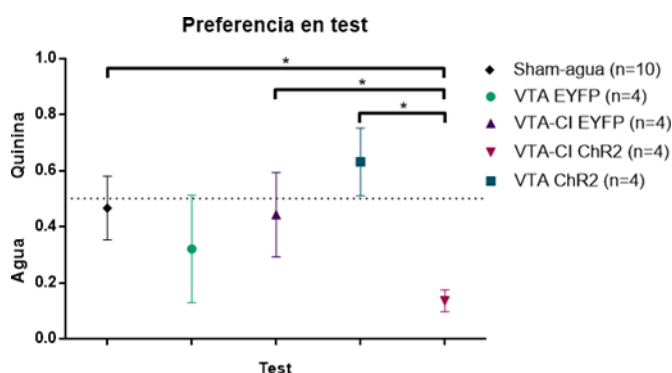


Figura 11. Diferencias entre la estimulación de somas del VTA y terminales catecolaminérgicas en la CI en una prueba de memoria de reconocimiento al sabor. Con el fin de determinar si existen diferencias de estimular optogenéticamente los somas del VTA o sus terminales en la CI durante la presentación de quinina [1.5mg/100ml], se llevó a cabo una prueba de memoria de reconocimiento al sabor a dos botellas entre quinina y agua. Se comparó el efecto del grupo

VTA ChR2 (n=4), su grupo control VTA EYFP (n=4), el grupo VTA-CI ChR2 (n=4) y su grupo control VTA-CI EYFP (n=4). Se realizó una t de student para encontrar diferencias significativas entre el consumo de agua y quinina para cada grupo y se encontró diferencias significativas del grupo VTA-CI ChR2 con los grupos SHAM-agua ($P<0.05$), el grupo VTA-CI EYFP ($P<0.05$) y el grupo VTA ChR2 ($P<0.05$). Todos los datos se muestran como media \pm SEM. * $P<0.05$.

Es importante notar que entre los grupos VTA ChR2 y VTA-CI ChR2 existe una diferencia significativa en el consumo de quinina durante la segunda presentación. Un análisis estadístico independiente con únicamente estos grupos experimentales reveló que durante la segunda presentación de quinina el grupo VTA-CI ChR2 mostraba una disminución significativa del consumo de quinina comparado con el grupo VTA ChR2. Entre sesiones, solo el grupo VTA ChR2 aumentó significativamente el consumo de quinina en la segunda sesión de entrenamiento (Figura 12).

Consumo entrenamiento en grupos estimulados

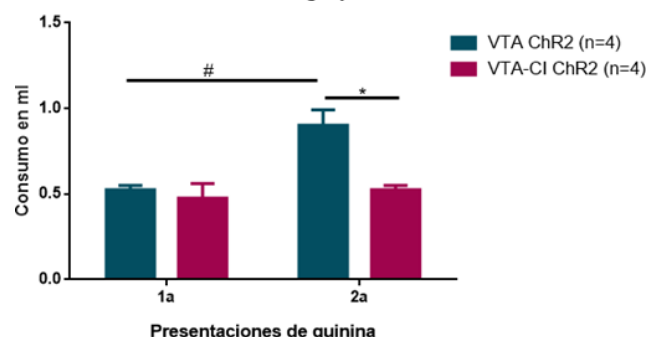


Figura 12. Comparación del efecto de la estimulación optogenética en los somas y terminales catecolaminérgicos. Para analizar las diferencias de la estimulación de los somas del VTA y las terminales catecolaminérgicas en la CI en el reconocimiento a un sabor aversivo, se evaluó el consumo de quinina a una concentración de 1.5mg/100ml. Se comparó el efecto en el grupo VTA ChR2 (n=4) y el grupo VTA-CI ChR2 (n=4). El ANOVA de medidas

repetidas mostró un efecto principal de grupo $F(1, 6)=7.539$ $P<0.05$, un efecto principal de sesión $F(1, 6)=18.45$ $P<0.05$ y un efecto de interacción $F(1, 6)=10.79$ $P<0.05$. La prueba post-hoc de Fisher mostró lo siguiente: durante la primera presentación no existen diferencias significativas entre los grupos VTA y VTA-CI ChR2. Sin embargo, durante la segunda presentación se observaron diferencias significativas en los grupos ChR2 VTA vs VTA-CI ($P<0.05$). Entre sesiones únicamente el grupo VTA ChR2 aumento significativamente el consumo de quinina ($P<0.05$), comparado con el grupo VTA-CI ChR2. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. * $P<0.05$ entre grupos y # $P<0.05$ entre sesiones.

Finalmente, un dato interesante que encontramos fue que la estimulación optogenética tuvo un efecto en el consumo de agua en el grupo VTA-CI ChR2 y no en el grupo VTA ChR2 o en los controles. Parte de nuestro protocolo conductual implicó la presentación de agua entre las presentaciones de quinina, por lo que evaluamos el consumo de agua en los grupos ChR2 y EYFP. Como se observa, el grupo VTA-CI ChR2 presenta diferencias significativas comparado con su grupo el grupo control VTA-CI EYFP, es decir, el grupo ChR2 mostró una disminución del consumo de agua (Figura 13B). Por otra parte, la estimulación optogenética en el grupo VTA ChR2 no tiene efecto en el consumo de agua. En resumen, la estimulación optogenética de las terminales catecolaminérgicas en la CIA provenientes del VTA no solo produce una disminución del consumo un sabor aversivo dada por la asociación entre consumo y estimulación, sino que también generaliza las consecuencias de estimulación que estímulos no pareados, como el agua presentada entre las presentaciones de quinina. (Figura 12A).

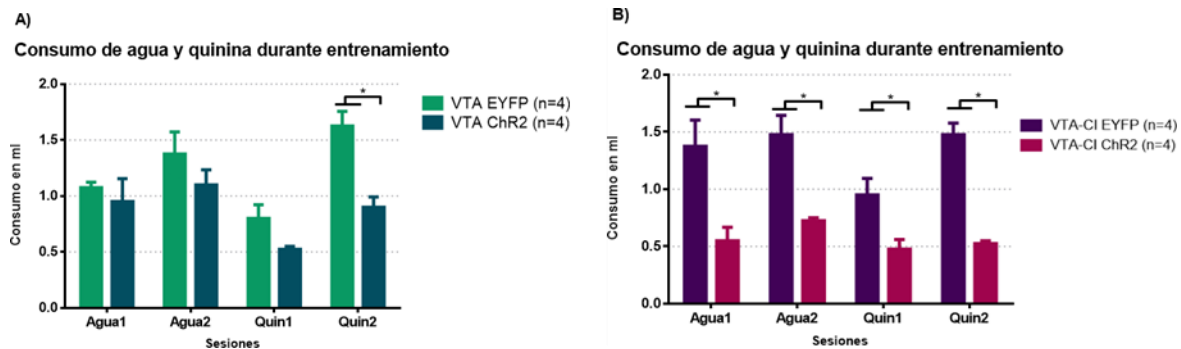


Figura 13. Consumo de agua y quinina durante los días de entrenamiento en una prueba de preferencia al sabor. En nuestro protocolo conductual entre ambas presentaciones de quinina se presentaba un bebedero con agua en el otro lado de la caja, durante estos días también registraba el consumo. Para evaluar si la estimulación optogenética de los somas y terminales catecolaminérgicas durante el consumo de quinina tuvo un efecto en el consumo de agua, un estímulo neutro y al cuál no estaba asociado ningún otro estímulo, se evaluó su efecto en los diferentes grupos. Se comparó el efecto en el grupo VTA ChR2 (n=4), su grupo control VTA EYFP (n=4), el grupo VTA-CI ChR2 (n=4) y su grupo control VTA-CI EYFP (n=4). A) Efecto de la estimulación en los somas catecolaminérgicos en el VTA en el consumo de agua. El ANOVA de medidas repetidas mostró un efecto principal para el factor interacción $F(3, 18) = 3.393$ $P<0.05$ y en la sesión $F(3, 18) = 15.53$ $P<0.05$. La prueba post-hoc de Fisher mostró las diferencias significativas únicamente en la segunda presentación de quinina entre el grupo VTA EYFP vs ChR2 ($P<0.05$). B) Efecto en la estimulación en las terminales catecolaminérgicas en la CI en el consumo de agua. El ANOVA de medidas repetidas mostró un efecto principal para el factor sesión $F(3, 18) = 5.533$ $P<0.05$, el factor grupo $F(1, 6) = 29.39$ $P<0.05$ y el factor sujetos $F(6, 18) = 3.903$ $P<0.05$. La prueba post-hoc de Fisher mostró diferencias significativas en todas las sesiones entre el grupo VTA-CI EYFP vs ChR2, $P<0.05$. Es decir, el grupo VTA-CI ChR2 mostró una disminución de consumo tanto de quinina como de agua comparado con el grupo control. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. * $P<0.05$.

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue investigar las diferencias entre la fotoestimulación de los somas catecolaminérgicos del VTA y las terminales catecolaminérgicas de la vía VTA-CIa en la formación de la memoria de reconocimiento al sabor, particularmente sobre estímulos gustativos aversivos. Es importante diferenciar estos grupos pues, estimular optogenéticamente los somas catecolaminérgicos del VTA podría tener efecto en la actividad de conexiones a otras áreas nos gustativas, mientras que estimular optogenéticamente la vía VTA-CIa nos permitirá observar con mejor precisión el papel de la actividad catecolaminérgica en la memoria de reconocimiento al sabor. Se ha reportado la participación de la actividad dopaminérgica ante estímulos novedosos tanto apetitivos como aversivos (Lammel et al., 2012; Osorio-Gómez et al., 2021) y, en este sentido, se ha demostrado que la estimulación optogenética de los cuerpos celulares catecolaminérgicos en el VTA producen una modulación en las respuestas neuronales de la CI anterior y genera preferencia al lugar en un modelo de memoria adictiva (Gil-Lievana et al., 2020). Así mismo, Peng et al. (2015) observaron que la estimulación optogenética en la CI anterior incrementa el consumo de un estímulo amargo y promueve conductas relacionadas al estímulo, como las expresiones faciales de disgusto (Peng et al., 2015). Por lo tanto, la finalidad de este trabajo fue analizar la participación de la vía VTA-CI en la neofobia y atenuación de la neofobia, así como determinar el papel de la vía en la memoria de reconocimiento al sabor, particularmente de un sabor aversivo como la quinina.

Concentración mínima de quinina que permite el reconocimiento de un sabor aversivo

Previo a la realización de las pruebas conductuales de reconocimiento al sabor, se realizó una prueba a dos botellas por 48 horas para determinar la sensibilidad sensorial a diferentes concentraciones de quinina, un estímulo naturalmente aversivo. Los resultados de la prueba de 48 horas indicaron que la concentración mínima para el reconocimiento de quinina era de 1.5mg/100ml (0.046mM) (Figura 7). Tordoff (2002) señalaron que las pruebas menores a 48 horas son insensibles para la discriminación entre estímulos gustativos, por lo que resultados con concentraciones evaluados con protocolos de menos de 48 horas pueden sesgar los datos con efectos de piso o de techo. Si bien, consideramos que nuestra concentración de quinina de 0.046mM es una concentración mínima para el reconocimiento, otros trabajos han utilizado concentraciones más altas de quinina. Gil-Lievana et al., (2022) reportaron que una concentración de 0.126mM de quinina es sub-umbral al no generar una memoria de reconocimiento al sabor, sin embargo, el protocolo de 48 horas que utilizamos nos permite identificar la concentración mínima (umbral) para el reconocimiento de un sabor, pero que no genera una memoria, es decir, sub-umbral. Tomando en cuenta esto, consideramos que nuestra prueba de 48 horas a dos botellas nos concede un dato más adecuado sobre la concentración umbral de quinina, de la cual se distingue del agua y además es reconocida como un estímulo aversivo.

Conectividad entre el VTA y la CIa a través de neuronas con actividad catecolaminérgica

Con el fin de comprobar la conectividad en el VTA y la CIa, se analizaron cortes coronales de cerebro de ratones transgénicos que expresen la cre-recombinasa en presencia del promotor de la enzima tirosina hidroxilasa (TH-Cre), precursor de neuromoduladores de tipo catecolaminérgicos. Los animales transgénicos fueron previamente infectados con un constructo adenoviral cre-dependiente, que expresó el canal de rodopsina-2 (ChR2) y la proteína reportera (EYFP). Observamos que las neuronas del VTA con inmunoreactividad de tirosina hidroxilasa (TH) endógena fueron positivas para EYFP cerca del sitio de inyección viral (Figura 8a). De manera similar, en cortes coronales de CIa, la expresión de eYFP se co-localizó con terminales TH+ provenientes del VTA (Figura 8b). Estos datos concuerdan con los reportes de la conexión anatómica entre el VTA y la CI, en los que se han señalado que el VTA envía neuronas de tipo dopaminérgicas a la CIa agranular (Gabbott et al., 2005; Gerfen & Clavier, 1979; Ohara et al., 2003), particularmente a la capa V de la CI agranular dorsal (Gabbott et al., 2005). En este sentido Gil-Lievana et al., (2020, 2022) demostraron que la conexión entre el VTA y la CIa no es sólo anatómica, sino que también es funcional pues existe una modulación electrofisiológica de las neuronas THérgicas del VTA a la CIa. Nuestros datos muestran que la conexión anatómica y funcional entre el VTA y la CIa es de tipo catecolaminérgica.

La estimulación del VTA y de la vía VTA-CIa acentúa la neofobia y retrasa la atenuación a la neofobia gustativa

Una vez demostrada la conexión anatómica, evaluamos el efecto de la estimulación optogenética de los somas catecolaminérgicos del VTA y de las terminales catecolaminérgicas de la CIa proveniente del VTA en el reconocimiento de un sabor aversivo. Nuestro primer hallazgo fue que, en un protocolo de reconocimiento al sabor, la estimulación optogenética tanto de los somas catecolaminérgicos en el VTA como de las terminales catecolaminérgicas en la CIa provenientes del VTA acentuaron la neofobia gustativa durante la primera presentación de quinina (Figura 9-10), pues en ambos grupos ChR2 disminuyó significativamente el consumo de quinina comparado con los grupos controles. La neofobia gustativa es un mecanismo de defensa que limita la ingesta de un nuevo sabor (Bermúdez-Rattoni, 2004; Lin et al., 2012). La neofobia también modula la palatabilidad pues disminuye el promedio de aproximaciones al sabor durante las primeras presentaciones (Lin et al., 2012). En este sentido, se ha reportado que la actividad de la CI es importante en la novedad gustativa, pues lesiones en la CI debilitan la neofobia (Lin et al., 2015). Así mismo, se ha reportado que, sin importar la valencia innata del estímulo, la presentación de un estímulo gustativo novedoso induce una elevación de DA y NA en la CI (Osorio-Gómez et al., 2021). Nuestros datos muestran que la liberación catecolaminérgica en el VTA, y de manera particular en la vía VTA-CIa, están asociados a fenómenos como la neofobia gustativa, pues su estimulación acentúa la neofobia.

En este sentido, la saliencia es un fenómeno altamente relacionado con la novedad y la actividad catecolaminérgica (Osorio-Gómez et al., 2022). La saliencia se define como la capacidad de un estímulo para aumentar el estado alerta, excitación y atención, lo que

mejoran el procesamiento neuronal y las respuestas conductuales (Schultz, 2013). La saliencia de los estímulos, incluido el gusto, es adaptativa porque la información saliente tiene mayor probabilidad de consolidarse a memoria a largo plazo comparado con información de estímulos menos salientes (Gil-Lievana et al., 2022; Osorio-Gómez et al., 2022). En el caso particular de la memoria de reconocimiento uno de los dos elementos que tiene es la discriminación para determinar si el estímulo es novedoso o familiar (Bermúdez-Rattoni, 2014; Eichenbaum, 2010; Manns, 2017). Así, la exposición a la novedad (un estímulo nuevo saliente) desencadena una respuesta conductual máxima que se reduce progresivamente durante las presentaciones posteriores (estímulo familiar, no destacado) (Osorio-Gómez et al., 2022). Las transiciones de novedad a familiaridad son cambios graduales provocados por el aprendizaje y cambios en la plasticidad neuronal (Bermúdez-Rattoni, 2004; Gil-Lievana et al., 2022; Osorio-Gómez et al., 2022). Por otra parte, se ha sugerido que la actividad dopaminérgica se ha asociado a las conductas dirigidas a la búsqueda de la recompensa y a la saliencia de estímulos asociados a ella. Reportes indican que la actividad dopaminérgica de tipo fásica se asocia a la presentación de estímulos salientes como lo pueden ser la comida, los choques eléctricos o la disponibilidad de una pareja sexual (Cho et al., 2017). De acuerdo con Gil-Lievana et al., (2022) la modulación catecolaminérgica del VTA a la CI incrementa la saliencia de estímulos gustativos sub-umbrales, independientemente de su valor hedónico (Gil-Lievana et al., 2022). Es importante señalar que, como mencionamos anteriormente, la concentración utilizada es umbral para el reconocimiento al sabor, por lo que los resultados observados tanto en estimulación de los somas del VTA como en las terminales en la CIa se debe a un incremento de las características gustativas e interoceptivas del sabor, es decir, aumenta de la saliencia, lo que se ve reflejado como un aumento de la neofobia gustativa. Es justo asumir que la estimulación de DA promueve y acentúa ese estado de novedad en los animales estimulados optogenéticamente lo que conductualmente se expresa como una disminución del consumo del estímulo comparado con los grupos control.

También observamos que la estimulación optogenética de los somas catecolaminérgicos del VTA retrasa la atenuación de la neofobia, mientras que la estimulación de las terminales catecolaminérgicas en la CIa provenientes del VTA inhiben la atenuación de la neofobia. Después de presentarse la neofobia, cuando un nuevo sabor no tiene consecuencias negativas se reconoce como una señal segura lo que lleva a un aumento en su consumo, a esto se le conoce como atenuación de la neofobia (Grau-Perales et al., 2019, 2021; Grau-Perales & Gallo, 2020). La neofobia es una medida conductual del proceso de familiaridad en la memoria de reconocimiento al sabor y nuestros datos muestran que durante la segunda presentación de quinina los grupos control presentaron atenuación de la neofobia. En la segunda presentación, los tres grupos presentaron un aumento significativo en el consumo de quinina con respecto a la primera presentación, sin embargo, la estimulación optogenética de los somas catecolaminérgicos en el VTA retrasó la atenuación de la neofobia (Figura 9) y la estimulación de las terminales de catecolaminérgicas provenientes del VTA en la CIa inhibieron en su totalidad la atenuación de la neofobia (Figura 10). En un trabajo reciente, se buscó determinar el efecto de la familiaridad de estímulos gustativos en la CI usando imagenología de calcio: a los animales se le presentó una serie de estímulos gustativos

por cinco días de manera consecutiva y se encontró que la cantidad de células activas en la corteza insular, así como la cantidad de células caracterizadas como sensibles al gusto, disminuyó significativamente a medida que los animales se familiarizaron con los estímulos gustativos (Staszko et al., 2020). Los autores sugieren que la experiencia repetida de un estímulo gustativo va disminuyendo gradualmente el número de neuronas activas, probablemente porque algunas de esas células tienen funciones atencionales. Esto implica que el proceso de novedad-familiaridad va disminuyendo la actividad de la CI cuando se consume repetidamente un sabor (Staszko et al., 2020). Nuestros datos no solo concuerdan con este trabajo, sino que también sugieren que las neuronas catecolaminérgicas participan del proceso de novedad-familiaridad, pues la estimulación optogenética persistente de la proyección VTA-CIa impediría la familiaridad del estímulo gustativo, y por lo tanto la atenuación de la neofobia. De manera interesante encontramos que la estimulación de los somas catecolaminérgicos del VTA genera un retraso y no una inhibición de la atenuación de la neofobia. Este efecto puede deberse a que en la estimulación de los somas catecolaminérgicos del VTA estamos reclutando diversos circuitos además de la proyección VTA-CI; el VTA mantiene conexiones con la CPF, la BLA, el NAc shell y core, y no sólo a la proyección con la CIa (Bariselli et al., 2016; Lammel et al., 2012). La fotoestimulación del VTA podría desencadenar la liberación de DA en diferentes estructuras cerebrales potencialmente implicadas en las conductas motivadas (Domingos et al., 2011), el control motor (Bourdy & Barrot, 2012) o incluso el procesamiento de la recompensa (Lammel et al., 2011). Estas proyecciones podrían interferir con la consolidación de la memoria gustativa.

De acuerdo con Gutiérrez (2004), la neofobia y la atenuación de la neofobia depende de la concentración de la solución. En el caso de la neofobia, el valor de neofobia es directamente proporcional a la concentración del sabor, es decir, a mayor concentración del sabor mayor valor de neofobia. En el caso de la atenuación de la neofobia la relación es inversamente proporcional, es decir, a mayor concentración del sabor menor la atenuación de la neofobia. Nuestro trabajo sugiere que la estimulación optogenética de los somas catecolaminérgicos en el VTA y de las terminales catecolaminérgicas en la CIa provenientes del VTA aumentan la saliencia del estímulo gustativo, en este caso, de la quinina. Por lo tanto, se incrementan las características gustativas e interoceptivas del sabor (Gil-Lievana et al., 2022), lo que se expresa como un aumento de la neofobia gustativa. Lo anterior está acorde con la idea de que la actividad catecolaminérgica proveniente del VTA contribuye a la saliencia de estímulos y que su conexión a la CIa es de gran importancia en este fenómeno. El aumento de saliencia promueve la neofobia y la inhibición la AN, por lo que los animales reconocen una concentración baja como una más alta comparado.

En conclusión, la estimulación optogenética de las terminales catecolaminérgicas de la CIa provenientes del VTA produce un aumento de la neofobia gustativa a un estímulo de baja concentración, así como inhibir la AN. Esto se podría explicar debido al aumento a la saliencia de este estímulo y, por lo tanto, las características gustativas e interoceptivas del sabor. En consecuencia, los procesos de novedad-familiaridad son afectados y eso se expresa conductualmente como una inhibición de la atenuación de la neofobia (Figura 10). En contraste, la estimulación optogenética de los somas catecolaminérgicos del VTA sólo

produce un retraso en la atenuación de la neofobia (Figura 9) y esta diferencia se puede explicar por las diferentes proyecciones que se originan en el VTA, lo que generaría una competencia con las diferentes funciones de dichas proyecciones.

La estimulación de las terminales catecolaminérgicas en la CIa provenientes del VTA promueve la memoria de reconocimiento al sabor

Una vez evaluado el efecto de la estimulación optogenética en los somas catecolaminérgicos del VTA y en las terminales catecolaminérgicas en la CIa provenientes del VTA en el reconocimiento al sabor, nos propusimos evaluar el efecto de dicha estimulación en la memoria de reconocimiento al sabor. En primer lugar, la estimulación de los somas catecolaminérgicos del VTA no mostró un efecto en la memoria de reconocimiento (Figura 11), Únicamente el grupo VTA-CI ChR2 mostró efecto en la memoria en la prueba a dos botellas entre quinina y agua comparado con los grupos controles (Figura 11). Nuestros datos difieren del reporte de Gil-Lievana et al., (2022) en el que la estimulación de somas catecolaminérgicos del VTA aumentan la saliencia de un estímulo de baja concentración lo suficiente para producir una memoria de reconocimiento al sabor. Las diferencias pueden atribuirse a las diferentes concentraciones utilizada por Gil-Lievana et al., la cual es el triple que la concentración que utilizamos, lo que podría provocar un efecto de piso en la aversión por quinina.

Por otra parte, nuestros datos coinciden con los trabajos que señalan que la CI es esencial para la adquisición y recuperación de la memoria de sabor a largo plazo (Bermúdez-Rattoni, 2004; Gutierrez et al., 2020; Guzmán-Ramos et al., 2010, 2018; Rodríguez-Ortiz et al., 2005; Stehberg et al., 2011). En este sentido se ha reportado que la liberación simultánea de DA y GLU dentro del CI es necesaria para lograr la consolidación de la memoria de CAS (Guzmán-Ramos et al., 2010). Así mismo, se ha demostrado la importancia de la síntesis de proteínas en la CI para la consolidación de la memoria gustativa de largo plazo (Guzmán-Ramos et al., 2018; Rodríguez-Ortiz et al., 2005). La actividad de la CI también está relacionada con el procesamiento de información interoceptiva, con la codificación de estímulos aversivos y de la expectativa durante el procesamiento a la recompensa (Paulus & Stewart, 2014), así como con la valoración hedónica durante procesos tanto cognitivos como afectivos (Vijayaraghavan et al., 2013). Gil-Lievana et al. (2020) plantea una posible relación de la actividad de esta vía con el mantenimiento de recuerdos asociados a las conductas de búsqueda. En este sentido, Naqvi et al., (2014) propone que la CIa está involucrada en la evocación de las representaciones interoceptivas, lo que coincide con nuestros datos acerca de la importancia de la actividad de la CIa en la memoria de reconocimiento al sabor. Así mismo, se ha demostrado que para la consolidación de un trazo de memoria es necesaria la actividad de neuromoduladores que promuevan la activación de los receptores metabotrópicos (sobre todo los receptores de DA D1/D5) (Duszkiewicz et al., 2019; McNamara et al., 2014). Específicamente, los receptores dopaminérgicos de tipo D1 han mostrado ser importantes en la adquisición de tareas de reconocimiento (Balderas et al., 2015; Gil-Lievana et al., 2022). Nuestros resultados sugieren que la estimulación optogenética de la vía VTA-CI aumenta la disponibilidad dopaminérgica/catecolaminérgica, lo que promueve

la saliencia de los efectos interoceptivos de la quinina y refuerza el trazo de memoria de reconocimiento al sabor.

La estimulación de la CI generaliza la aversión, mientras que la estimulación del VTA solo aumenta saliencia

La neofobia y la inhibición de la atenuación de la neofobia observada en el grupo VTA-CI ChR2 se generalizó también a un estímulo neutro, como el agua (Figura 13B). Parte de nuestro protocolo de preferencia al sabor implicó la presentación de quinina en un lado de la caja conductual y entre ambas presentaciones de quinina se presentaba agua en lado opuesto de la caja, durante estos días únicamente se registró el consumo de agua. Con estos datos encontramos diferencias significativas entre el grupo VTA-CI ChR2 y el grupo control, es decir, mientras que el grupo control aumentó el consumo ante la entrega de agua, los animales del grupo VTA-CI ChR2 mantuvieron niveles bajos de consumo en los días correspondientes al consumo de agua (Figura 13B). Estos datos sugieren una generalización de la aversión a la quinina con estímulos neutros, lo que concuerda con la propuesta de Wu et al., (2020), donde sugiere que la CIa está asociada a las conductas de evitación y aversión, lo que explicaría porqué la estimulación en el grupo VTA-CI ChR2 mostró una disminución en el consumo de agua y no así el grupo VTA ChR2.

De acuerdo con Brown & Banks (2015) y Bermúdez-Rattoni et al., (2004, 2014), la memoria de reconocimiento al sabor cuenta con dos elementos, el de discriminación-familiaridad y la recolección de claves contextuales. Nuestros datos muestran que la estimulación de las terminales catecolaminérgicas en la CIa disminuye también el consumo de agua bajo el mismo contexto en el cual se asoció la estimulación con el consumo de quinina, lo que podría sugerir la CI insular participa en ambos elementos de la memoria de reconocimiento al sabor. En este sentido, tal y como lo ha propuesto Vincis & Fontanini (2016) la CI, además de ser la corteza gustativa primaria, se encarga de integrar señales que predicen la entrega de los estímulos gustativos asociados con estímulos de otras modalidades (incluidas señales visuales o auditivas), lo que sugiere que las respuestas neuronales en la CI pueden ser moduladas por el aprendizaje y la experiencia (Vincis & Fontanini, 2016). En conclusión, la estimulación de las terminales catecolaminérgicas de la CIa provenientes del VTA es capaz de generalizar las propiedades asociadas a un estimulado gustativo aversivo a estímulos neutros.

PERSPECTIVAS

De manera general, existen otras consideraciones del trabajo que podrían mejorar el análisis y la discusión de nuestros resultados. La principal es la falta de análisis de patrones de lengüeteo durante el consumo, medidas que ha mostrado ser sensible para evaluar la palatabilidad de un sabor (Lin et al., 2012). Con el análisis de lengüeteo podríamos obtener los patrones temporales de lengüeteo, incluidos los lengüeteos totales, las tasas de lengüeteo en varios intervalos de tiempo, el intervalo entre lengüeteos, el intervalo entre clusters, el número de clusters y el tamaño de los clusters. Este tipo de análisis ha revelado que el tamaño de clusters y la tasa de lengüeteos inicial son medidas sensibles de la palatabilidad del sabor (Lin et al., 2017), por lo que una perspectiva a futuro de nuestro proyecto es realizar un

análisis más detallado de todos estos parámetros de lengüeteo. De la misma manera, otra herramienta útil para mejorar el análisis de nuestros resultados sería evaluar los reflejos conductuales y fisiológicos estereotípicos de disgusto como la boca abierta, retching (reflejo muscular que puede o no, provocar el vómito), náuseas y vomito (Schier & Spector, 2019).

CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos que la estimulación optogenética de las terminales catecolaminérgicas de la CIa provenientes del VTA potencia el efecto de una neofobia gustativa a un estímulo gustativo aversivo de baja concentración (quinina). Así mismo, es capaz de inhibir la atenuación de la neofobia gustativa. Por otra parte, también demostramos que la estimulación en los somas catecolaminérgicos del VTA, retrasa (y no inhibe) la atenuación de la neofobia. Estos datos podrían indicarnos que la estimulación catecolaminérgica, específicamente de la vía VTA-CIa aumenta la saliencia de los estímulos, lo que en consecuencia podría estar afectando las características gustativas e interoceptivas de un estímulo gustativo de baja concentración, lo que conductualmente se expresa como un aumento en la neofobia y una inhibición en la atenuación de la neofobia. Finalmente, la estimulación optogenética de las catecolaminérgicas de la CIa provenientes del VTA asociado a un estímulo gustativo de baja concentración es capaz de producir una memoria de reconocimiento al sabor.

El estudio de la saliencia de estímulos, particularmente de estímulos gustativos, y la actividad de la CI es importante para entender el fenómeno de las adicciones. Se ha propuesto que la función de la CI es asociar las conductas dirigidas a la búsqueda de sustancia de abuso con el valor de la ingesta de dicha sustancia. Dicha vinculación se logra a través de las representaciones interoceptivas como lo son el sabor, las sensaciones orales y las sensaciones viscerales generales (Naqvi et al., 2014). Nuestros resultados nos permiten conocer el papel del VTA y de la vía VTA-CIa en la neofobia, la atenuación de la neofobia y las consecuencias en la memoria de reconocimiento al sabor de un estímulo gustativo aversivo, relacionado los cambios en la saliencia sensorial con los cambios interoceptivos.

REFERENCIAS

- Addicott, M. A., Baranger, D. A. A., Kozink, R. V., Smoski, M. J., Dichter, G. S., & McClernon, F. J. (2012). Smoking withdrawal is associated with increases in brain activation during decision making and reward anticipation: A preliminary study. *Psychopharmacology*, 219(2), 563–573. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2404-3>
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., & Bermudez-Rattoni, F. (2015). Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 285, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.049>
- Bariselli, S., Glangetas, C., Tzanoulinou, S., & Bellone, C. (2016). Ventral tegmental area subcircuits process rewarding and aversive experiences. *Journal of Neurochemistry*, 139(6), 1071–1080. <https://doi.org/10.1111/jnc.13779>

- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(3), 209–217. <https://doi.org/10.1038/nrn1344>
- Bermúdez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.01.001>
- Bewley, B. R., Bland, J. M., & Harris, R. (1974). Factors associated with the starting of cigarette smoking by primary school children. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 28(1), 37–44. <https://doi.org/10.1136/jech.28.1.37>
- Bisaz, R., Travaglia, A., & Alberini, C. M. (2014). The Neurobiological Bases of Memory Formation: From Physiological Conditions to Psychopathology. *Psychopathology*, 47(6), 347–356. <https://doi.org/10.1159/000363702>
- Bonson, K. (2002). Neural Systems and Cue-Induced Cocaine Craving. *Neuropsychopharmacology*, 26(3), 376–386. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00371-2](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00371-2)
- Bourdy, R., & Barrot, M. (2012). A new control center for dopaminergic systems: Pulling the VTA by the tail. *Trends in Neurosciences*, 35(11), 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.06.007>
- Brasser, S. M., Castro, N., & Feretic, B. (2015). Alcohol sensory processing and its relevance for ingestion. *Physiology & Behavior*, 148, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.09.004>
- Brasser, S. M., Silbaugh, B. C., Ketchum, M. J., Olney, J. J., & Lemon, C. H. (2012). Chemosensory responsiveness to ethanol and its individual sensory components in alcohol-preferring, alcohol-nonpreferring and genetically heterogeneous rats: Ethanol chemosensory responses. *Addiction Biology*, 17(2), 423–436. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00415.x>
- Breslin, P. A. S. (2013). An Evolutionary Perspective on Food and Human Taste. *Current Biology*, 23(9), R409–R418. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.010>
- Brown, M. W., & Banks, P. J. (2015). In search of a recognition memory engram. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 50, 12–28. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.09.016>
- Chaudhari, N., & Roper, S. D. (2010). The cell biology of taste. *Journal of Cell Biology*, 190(3), 285–296. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003144>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1204076>
- Cho, J. R., Treweek, J. B., Robinson, J. E., Xiao, C., Bremner, L. R., Greenbaum, A., & Gradinaru, V. (2017). Dorsal Raphe Dopamine Neurons Modulate Arousal and

- Promote Wakefulness by Salient Stimuli. *Neuron*, 94(6), 1205-1219.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.020>
- Cosme, C. V., Gutman, A. L., & LaLumiere, R. T. (2015). The Dorsal Agranular Insular Cortex Regulates the Cued Reinstatement of Cocaine-Seeking, but not Food-Seeking, Behavior in Rats. *Neuropsychopharmacology*, 40(10), 2425–2433. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.92>
- Dautan, D., Souza, A. S., Huerta-Ocampo, I., Valencia, M., Assous, M., Witten, I. B., Deisseroth, K., Tepper, J. M., Bolam, J. P., Gerdjikov, T. V., & Mena-Segovia, J. (2016). Segregated cholinergic transmission modulates dopamine neurons integrated in distinct functional circuits. *Nature Neuroscience*, 19(8), 1025–1033. <https://doi.org/10.1038/nn.4335>
- De Lima, M. N. M., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Siciliani Scalco, F., Roesler, R., Garcia, V. A., & Schröder, N. (2011). Modulatory influence of dopamine receptors on consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(3), 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.12.007>
- Domingos, A. I., Vaynshteyn, J., Voss, H. U., Ren, X., Gradinaru, V., Zang, F., Deisseroth, K., De Araujo, I. E., & Friedman, J. (2011). Leptin regulates the reward value of nutrient. *Nature Neuroscience*, 14(12), 1562–1568. <https://doi.org/10.1038/nn.2977>
- Domjan, M. (1976). Determinants of the Enhancement of Flavored-Water Intake by Prior Exposure. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2(1), 17–27. <https://doi.org/10.1037/0097-7403.2.1.17>
- Duszkiewicz, A. J., McNamara, C. G., Takeuchi, T., & Genzel, L. (2019). Novelty and Dopaminergic Modulation of Memory Persistence: A Tale of Two Systems. *Trends in Neurosciences*, 42(2), 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.10.002>
- Eichenbaum, H. (2010). Memory systems. *WIREs Cognitive Science*, 1(4), 478–490. <https://doi.org/10.1002/wcs.49>
- Eshel, N., Tian, J., Bukwich, M., & Uchida, N. (2016). Dopamine neurons share common response function for reward prediction error. *Nature Neuroscience*, 19(3), 479–486. <https://doi.org/10.1038/nn.4239>
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2016). Drug Addiction: Updating Actions to Habits to Compulsions Ten Years On. *Annual Review of Psychology*, 67(1), 23–50. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-122414-033457>
- Feldstein-Ewing, S. W., Filbey, F. M., Chandler, L. D., & Hutchison, K. E. (2010). Exploring the Relationship Between Depressive and Anxiety Symptoms and Neuronal Response to Alcohol Cues. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(3), 396–403. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.01104.x>

- Fiddick, L. (2011). There is more than the amygdala: Potential threat assessment in the cingulate cortex. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(4), 1007–1018. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.09.014>
- Filbey, F. M., Claus, E., Audette, A. R., Niculescu, M., Banich, M. T., Tanabe, J., Du, Y. P., & Hutchison, K. E. (2008). Exposure to the Taste of Alcohol Elicits Activation of the Mesocorticolimbic Neurocircuitry. *Neuropsychopharmacology*, 33(6), 1391–1401. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301513>
- Fitzgerald, P. J. (2013). Elevated Norepinephrine may be a Unifying Etiological Factor in the Abuse of a Broad Range of Substances: Alcohol, Nicotine, Marijuana, Heroin, Cocaine, and Caffeine. *Substance Abuse: Research and Treatment*, 7, SART.S13019. <https://doi.org/10.4137/SART.S13019>
- Fletcher, M. L., Ogg, M. C., Lu, L., Ogg, R. J., & Boughter, J. D. (2017). Overlapping Representation of Primary Tastes in a Defined Region of the Gustatory Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 37(32), 7595–7605. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0649-17.2017>
- Frot, M., Magnin, M., Mauguiere, F., & Garcia-Larrea, L. (2006). Human SII and Posterior Insula Differently Encode Thermal Laser Stimuli. *Cerebral Cortex*, 17(3), 610–620. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhk007>
- Gabbott, P. L. A., Warner, T. A., Jays, P. R. L., Salway, P., & Busby, S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *The Journal of Comparative Neurology*, 492(2), 145–177. <https://doi.org/10.1002/cne.20738>
- Gerfen, C. R., & Clavier, R. M. (1979). Neural inputs to the prefrontal agranular insular cortex in the rat: Horseradish peroxidase study. *Brain Research Bulletin*, 4(3), 347–353. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(79\)80012-X](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(79)80012-X)
- Gil-Lievana, E., Balderas, I., Moreno-Castilla, P., Luis-Islas, J., McDevitt, R. A., Tecuapetla, F., Gutierrez, R., Bonci, A., & Bermúdez-Rattoni, F. (2020). Glutamatergic basolateral amygdala to anterior insular cortex circuitry maintains rewarding contextual memory. *Communications Biology*, 3(1), 139. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0862-z>
- 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, 823220. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.823220>
- Gogolla, N. (2017). The insular cortex. *Current Biology*, 27(12), R580–R586. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.010>

- Goshen, I. (2014). The optogenetic revolution in memory research. *Trends in Neurosciences*, 37(9), 511–522. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.06.002>
- Grau-Perales, A. B., & Gallo, M. (2020). The auditory context-dependent attenuation of taste neophobia depends on D1 dopamine receptor activity in mice. *Behavioural Brain Research*, 391, 112687. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112687>
- Grau-Perales, A. B., Gámiz, F., & Gallo, M. (2021). Effect of hippocampal 6-OHDA lesions on the contextual modulation of taste recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 409, 113320. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113320>
- Grau-Perales, A. B., Gómez-Chacón, B., & Gallo, M. (2019). Differential activity pattern of c-Fos in the nucleus accumbens between adult and aged rats during flavor recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 371, 111935. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111935>
- Gutierrez, R. (2004). Formación de la memoria gustativa: papel de la Corteza Insular. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México]. Obtenido de <http://132.248.9.195/ppt2004/0328256/Index.html>
- Gutierrez, R., Fonseca, E., & Simon, S. A. (2020). The neuroscience of sugars in taste, gut-reward, feeding circuits, and obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(18), 3469–3502. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03458-2>
- Guzmán-Ramos, K., Moreno-Castilla, P., Castro-Cruz, M., McGaugh, J. L., Martínez-Coria, H., LaFera, F. M., & Bermúdez-Rattoni, F. (2012). Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learning & Memory*, 19(10), 453–460. <https://doi.org/10.1101/lm.026070.112>
- Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2010). Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation: Dopamine-glutamate reactivation in consolidation. *Journal of Neurochemistry*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06758.x>
- Guzmán-Ramos, K., Venkataraman, A., Morin, J.-P., Osorio-Gómez, D., & Bermúdez-Rattoni, F. (2018). Differential requirement of de novo Arc protein synthesis in the insular cortex and the amygdala for safe and aversive taste long-term memory formation. *Behavioural Brain Research*, 342, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.01.006>
- Haaranen, M., Scuppa, G., Tambalo, S., Järvi, V., Bertozzi, S. M., Armirotti, A., Sommer, W. H., Bifone, A., & Hyytiä, P. (2020). Anterior insula stimulation suppresses appetitive behavior while inducing forebrain activation in alcohol-preferring rats. *Translational Psychiatry*, 10(1), 150. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0833-7>
- Hahn, G., Charlin, V. L., Sussman, S., Dent, C. W., Manzi, J., Stacy, A. W., Flay, B., Hansen,

- W. B., & Burton, D. (1990). Adolescents' first and most recent use situations of smokeless tobacco and cigarettes: Similarities and differences. *Addictive Behaviors*, 15(5), 439–448. [https://doi.org/10.1016/0306-4603\(90\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0306-4603(90)90030-2)
- Howe, M. W., & Dombeck, D. A. (2016). Rapid signalling in distinct dopaminergic axons during locomotion and reward. *Nature*, 535(7613), 505–510. <https://doi.org/10.1038/nature18942>
- Jacobus, J., Goldenberg, D., Wierenga, C. E., Tolentino, N. J., Liu, T. T., & Tapert, S. F. (2012). Altered cerebral blood flow and neurocognitive correlates in adolescent cannabis users. *Psychopharmacology*, 222(4), 675–684. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2674-4>
- Jaramillo, A. A., Van Voorhies, K., Randall, P. A., & Besheer, J. (2018). Silencing the insular-striatal circuit decreases alcohol self-administration and increases sensitivity to alcohol. *Behavioural Brain Research*, 348, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.04.007>
- Jensen, J., Smith, A. J., Willeit, M., Crawley, A. P., Mikulis, D. J., Vitcu, I., & Kapur, S. (2007). Separate brain regions code for salience vs. Valence during reward prediction in humans. *Human Brain Mapping*, 28(4), 294–302. <https://doi.org/10.1002/hbm.20274>
- Lamm, C., Meltzoff, A. N., & Decety, J. (2010). How Do We Empathize with Someone Who Is Not Like Us? A Functional Magnetic Resonance Imaging Study. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 22(2), 362–376. <https://doi.org/10.1162/jocn.2009.21186>
- Lammel, S., Ion, D. I., Roeper, J., & Malenka, R. C. (2011). Projection-Specific Modulation of Dopamine Neuron Synapses by Aversive and Rewarding Stimuli. *Neuron*, 70(5), 855–862. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.025>
- Lammel, S., Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., Deisseroth, K., & Malenka, R. C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*, 491(7423), 212–217. <https://doi.org/10.1038/nature11527>
- Lin, J.-Y., Amodeo, L. R., Arthurs, J., & Reilly, S. (2012). Taste neophobia and palatability: The pleasure of drinking. *Physiology & Behavior*, 106(4), 515–519. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.03.029>
- Lin, J.-Y., Arthurs, J., & Reilly, S. (2015). Gustatory insular cortex, aversive taste memory and taste neophobia. *Neurobiology of Learning and Memory*, 119, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.01.005>
- Lin, J.-Y., Arthurs, J., & Reilly, S. (2017). Conditioned taste aversions: From poisons to pain to drugs of abuse. *Psychonomic Bulletin & Review*, 24(2), 335–351. <https://doi.org/10.3758/s13423-016-1092-8>

- MacNicol, B. (2017). The biology of addiction. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal Canadien d'anesthésie*, 64(2), 141–148. <https://doi.org/10.1007/s12630-016-0771-2>
- Macoveanu, J. (2014). Serotonergic modulation of reward and punishment: Evidence from pharmacological fMRI studies. *Brain Research*, 1556, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.02.003>
- Maffei, A., Haley, M., & Fontanini, A. (2012). Neural processing of gustatory information in insular circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(4), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.04.001>
- Manns, J. R. (2017). Neurobiology of Recognition Memory. En *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* (pp. 177–187). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21075-4>
- Mansvelder, H. D., Verhoog, M. B., & Goriounova, N. A. (2019). Synaptic plasticity in human cortical circuits: Cellular mechanisms of learning and memory in the human brain? *Current Opinion in Neurobiology*, 54, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.06.013>
- Mazzola, L., Isnard, J., Peyron, R., & Mauguière, F. (2012). Stimulation of the human cortex and the experience of pain: Wilder Penfield's observations revisited. *Brain*, 135(2), 631–640. <https://doi.org/10.1093/brain/awr265>
- McNamara, C. G., Tejero-Cantero, Á., Trouche, S., Campo-Urriza, N., & Dupret, D. (2014). Dopaminergic neurons promote hippocampal reactivation and spatial memory persistence. *Nature Neuroscience*, 17(12), 1658–1660. <https://doi.org/10.1038/nn.3843>
- Meisch, R. A. (2001). Oral drug self-administration: An overview of laboratory animal studies. *Alcohol*, 24(2), 117–128. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(01\)00149-5](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(01)00149-5)
- Metereau, E., & Dreher, J.-C. (2013). Cerebral Correlates of Salient Prediction Error for Different Rewards and Punishments. *Cerebral Cortex*, 23(2), 477–487. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs037>
- Mikhailova, M. A., Bass, C. E., Grinevich, V. P., Chappell, A. M., Deal, A. L., Bonin, K. D., Weiner, J. L., Gainetdinov, R. R., & Budygin, E. A. (2016). Optogenetically-induced tonic dopamine release from VTA-nucleus accumbens projections inhibits reward consummatory behaviors. *Neuroscience*, 333, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.006>
- Miranda, M. I., Ramírez-Lugo, L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Research*, 882(1–2), 230–235. [https://doi.org/10.1016/S0926-6410\(00\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0926-6410(00)00050-1)

- Mizoguchi, N., Kobayashi, M., & Muramoto, K. (2016). Integration of olfactory and gustatory chemosignals in the insular cortex. *Journal of Oral Biosciences*, 58(3), 81–84. <https://doi.org/10.1016/j.job.2016.03.002>
- 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>
- Morales, A. M., Lee, B., Hellemann, G., O'Neill, J., & London, E. D. (2012). Gray-matter volume in methamphetamine dependence: Cigarette smoking and changes with abstinence from methamphetamine. *Drug and Alcohol Dependence*, 125(3), 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.02.017>
- Morales, & Margolis. (2017). Ventral tegmental area: Cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(2), 73–85. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.165>
- Morales, & Root, D. H. (2014). Glutamate neurons within the midbrain dopamine regions. *Neuroscience*, 282, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.032>
- Mutschler, I., Ball, T., Wankerl, J., & Strigo, I. A. (2012). Pain and emotion in the insular cortex: Evidence for functional reorganization in major depression. *Neuroscience Letters*, 520(2), 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.03.095>
- Nachman, M., & Jones, D. R. (1974). Learned taste aversions over long delays in rats: The role of learned safety. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 86(5), 949–956. <https://doi.org/10.1037/h0036409>
- Namkung, H., Kim, S.-H., & Sawa, A. (2017). The Insula: An Underestimated Brain Area in Clinical Neuroscience, Psychiatry, and Neurology. *Trends in Neurosciences*, 40(4), 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.02.002>
- Naqvi, N. H., & Bechara, A. (2005). The airway sensory impact of nicotine contributes to the conditioned reinforcing effects of individual puffs from cigarettes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(4), 821–829. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.06.005>
- Naqvi, N. H., Gaznick, N., Tranel, D., & Bechara, A. (2014). The insula: A critical neural substrate for craving and drug seeking under conflict and risk: The insula: craving and drug seeking under conflict and risk. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1316(1), 53–70. <https://doi.org/10.1111/nyas.12415>
- Naqvi, N. H., Rudrauf, D., Damasio, H., & Bechara, A. (2007). Damage to the Insula Disrupts Addiction to Cigarette Smoking. *Science*, 315(5811), 531–534. <https://doi.org/10.1126/science.1135926>
- Ohara, P. T., Granato, A., Moallem, T. M., Wang, B.-R., Tillet, Y., & Jasmin, L. (2003). Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of

the rat. *Journal of Neurocytology*, 32(2), 131–141.
<https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000005598.09647.7f>

- 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, 107437. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107437>
- Osorio-Gómez, D., Guzmán-Ramos, K., & Bermúdez-Rattoni, F. (2022). Dopamine activity on the perceptual salience for recognition memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16, 963739. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.963739>
- Pastrana, E. (2011). Optogenetics: Controlling cell function with light. *Nature Methods*, 8(1), 24–25. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.323>
- Paulus, M. P., & Stewart, J. L. (2014). Interoception and drug addiction. *Neuropharmacology*, 76, 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.002>
- Paxinos, G., & Franklin, K. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. USA: Elsevier, Academic Press.
- 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>
- Peyron, R., & Fauchon, C. (2019). The posterior insular-opercular cortex: An access to the brain networks of thermosensory and nociceptive processes? *Neuroscience Letters*, 702, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.11.042>
- Pushparaj, A., Kim, A. S., Musiol, M., Trigo, J. M., & Le Foll, B. (2015). Involvement of the rostral agranular insular cortex in nicotine self-administration in rats. *Behavioural Brain Research*, 290, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.039>
- Ramírez-Lugo, L., Zavala-Vega, S., Pedroza-Llinas, R., Núñez-Jaramillo, L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2015). Effects of glutamate and its metabotropic receptors class 1 antagonist in appetitive taste memory formation. *Behavioural Brain Research*, 284, 213–217. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.020>
- Ramos, J. M. J. (2020). Perirhinal cortex supports both taste neophobia and its attenuation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 173, 107264. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107264>
- Redondo, R. L., & Morris, R. G. M. (2011). Making memories last: The synaptic tagging and capture hypothesis. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(1), 17–30. <https://doi.org/10.1038/nrn2963>
- Reinhardt, I., Jansen, A., Kellermann, T., Schüppen, A., Kohn, N., Gerlach, A. L., & Kircher,

- T. (2010). Neural correlates of aversive conditioning: Development of a functional imaging paradigm for the investigation of anxiety disorders. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 260(6), 443–453. <https://doi.org/10.1007/s00406-010-0099-9>
- Roberson, E. D., English, J. D., Adams, J. P., Selcher, J. C., Kondratieck, C., & Sweatt, J. D. (1999). The Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Couples PKA and PKC to cAMP Response Element Binding Protein Phosphorylation in Area CA1 of Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 19(11), 4337–4348. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-11-04337.1999>
- Rodríguez-Durán, L. F., Martínez-Moreno, A., & Escobar, M. L. (2017). Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD. *Neurobiology of Learning and Memory*, 142, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.014>
- Rodríguez-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 & Memory*, 12(5), 533–537. <https://doi.org/10.1101/lm.94505>
- Root, D. H., Wang, H.-L., Liu, B., Barker, D. J., Mód, L., Szocsics, P., Silva, A. C., Maglóczy, Z., & Morales, M. (2016). Glutamate neurons are intermixed with midbrain dopamine neurons in nonhuman primates and humans. *Scientific Reports*, 6(1), 30615. <https://doi.org/10.1038/srep30615>
- Rose, J. (2006). Nicotine and nonnicotine factors in cigarette addiction. *Psychopharmacology*, 184(3–4), 274–285. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0250-x>
- Rossato, J. I., Radiske, A., Kohler, C. A., Gonzalez, C., Bevilaqua, L. R., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2013). Consolidation of object recognition memory requires simultaneous activation of dopamine D1/D5 receptors in the amygdala and medial prefrontal cortex but not in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 106, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.07.012>
- Ruetti, E., Justel, N., Mustaca, A., & Boccia, M. (2014). Corticosterone and propranolol's role on taste recognition memory. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 127, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.09.013>
- Salamone, J. D., & Correa, M. (2012). The Mysterious Motivational Functions of Mesolimbic Dopamine. *Neuron*, 76(3), 470–485. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.021>
- Scheefhals, N., & MacGillavry, H. D. (2018). Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 91, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.05.002>

- Schier, L. A., & Spector, A. C. (2019). The Functional and Neurobiological Properties of Bad Taste. *Physiological Reviews*, 99(1), 605–663. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2017>
- Schultz, W. (2002). Getting Formal with Dopamine and Reward. *Neuron*, 36(2), 241–263. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00967-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00967-4)
- Schultz, W. (2013). Updating dopamine reward signals. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(2), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.11.012>
- Squire, L. R., & Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13515–13522. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13515>
- Staszko, S. M., & Boughter, J. D. (2020). Taste Pathways, Representation and Processing in the Brain. En *The Senses: A Comprehensive Reference* (pp. 280–297). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.23891-1>
- Staszko, S. M., Boughter, J. D., & Fletcher, M. L. (2020). Taste coding strategies in insular cortex. *Experimental Biology and Medicine*, 245(5), 448–455. <https://doi.org/10.1177/1535370220909096>
- Stehberg, J., Moraga-Amaro, R., & Simon, F. (2011). The role of the insular cortex in taste function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(2), 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.03.005>
- Stevenson, R. J., Miller, L. A., & McGrillen, K. (2013). The lateralization of gustatory function and the flow of information from tongue to cortex. *Neuropsychologia*, 51(8), 1408–1416. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2013.04.010>
- Stuber, G. D., Sparta, D. R., Stamatakis, A. M., Van Leeuwen, W. A., Hardjoprajitno, J. E., Cho, S., Tye, K. M., Kempadoo, K. A., Zhang, F., Deisseroth, K., & Bonci, A. (2011). Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. *Nature*, 475(7356), 377–380. <https://doi.org/10.1038/nature10194>
- Sutherland, M. T., Ross, T. J., Shakleya, D. M., Huestis, M. A., & Stein, E. A. (2011). Chronic smoking, but not acute nicotine administration, modulates neural correlates of working memory. *Psychopharmacology*, 213(1), 29–42. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2013-6>
- Sweatt, D. (2010). The Basics of Psychological Learning and Memory Theory. En D. Sweatt, *Mechanisms of memory*.
- Tang, D. W., Fellows, L. K., Small, D. M., & Dagher, A. (2012). Food and drug cues activate similar brain regions: A meta-analysis of functional MRI studies. *Physiology & Behavior*, 106(3), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.03.009>
- The Jackson Laboratory. (10 de Agosto de 2019). B6.Cg-7630403G23RikTg(Th-Cre)1Tmd/J. Obtenido de <http://www.jax.org/strain/008601>

- Topolovec, J. C., Gati, J. S., Menon, R. S., Shoemaker, J. K., & Cechetto, D. F. (2004). Human cardiovascular and gustatory brainstem sites observed by functional magnetic resonance imaging. *The Journal of Comparative Neurology*, 471(4), 446–461. <https://doi.org/10.1002/cne.20033>
- Tordoff, M. G. (2002). Influence of Test Duration on the Sensitivity of the Two-bottle Choice Test. *Chemical Senses*, 27(9), 759–768. <https://doi.org/10.1093/chemse/27.9.759>
- Trutti, A. C., Mulder, M. J., Hommel, B., & Forstmann, B. U. (2019). Functional neuroanatomical review of the ventral tegmental area. *NeuroImage*, 191, 258–268. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.01.062>
- Van Hell, H. H., Bossong, M. G., Jager, G., Kristo, G., Van Osch, M. J. P., Zelaya, F., Kahn, R. S., & Ramsey, N. F. (2011). Evidence for involvement of the insula in the psychotropic effects of THC in humans: A double-blind, randomized pharmacological MRI study. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(10), 1377–1388. <https://doi.org/10.1017/S1461145711000526>
- Vijayaraghavan, L., Adolphs, R., Kennedy, D. P., Cassell, M., Tranel, D., & Paradiso, S. (2013). A selective role for right insula—Basal ganglia circuits in appetitive stimulus processing. *Social Cognitive and Affective Neuroscience*, 8(7), 813–819. <https://doi.org/10.1093/scan/nss077>
- Vincis, R., & Fontanini, A. (2016). Associative learning changes cross-modal representations in the gustatory cortex. *eLife*, 5, e16420. <https://doi.org/10.7554/eLife.16420>
- Volkow, N. D., Michaelides, M., & Baler, R. (2019). The Neuroscience of Drug Reward and Addiction. *Physiological Reviews*, 99(4), 2115–2140. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2018>
- Volkow, N. D., & Morales, M. (2015). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, 162(4), 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046>
- Voss, J. L., & Paller, K. A. (2008). Brain substrates of implicit and explicit memory: The importance of concurrently acquired neural signals of both memory types. *Neuropsychologia*, 46(13), 3021–3029. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2008.07.010>
- Wager, T. D., Atlas, L. Y., Lindquist, M. A., Roy, M., Woo, C.-W., & Kross, E. (2013). An fMRI-Based Neurologic Signature of Physical Pain. *New England Journal of Medicine*, 368(15), 1388–1397. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1204471>
- 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>

- Woo, C.-W., Roy, M., Buhle, J. T., & Wager, T. D. (2015). Distinct Brain Systems Mediate the Effects of Nociceptive Input and Self-Regulation on Pain. *PLoS Biology*, 13(1), e1002036. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002036>
- Yiannakas, A., Kolatt Chandran, S., Kayyal, H., Gould, N., Khamaisy, M., & Rosenblum, K. (2021). Parvalbumin interneuron inhibition onto anterior insula neurons projecting to the basolateral amygdala drives aversive taste memory retrieval. *Current Biology*, 31(13), 2770-2784.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2>.