



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**EFFECTO DEL CONSUMO CRÓNICO DE SABORES DULCES SOBRE LA  
FORMACIÓN DE LA MEMORIA GUSTATIVA: FUNCIÓN DE LA ACTIVIDAD  
COLINÉRGICA CORTICAL**

**T E S I S  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS  
(NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:  
FÍS: DANIELA JULIA FREGOSO URRUTIA**

**DIRECTORA DE TESIS  
DRA. MARÍA ISABEL MIRANDA SAUCEDO  
DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA CONDUCTUAL Y COGNITIVA,  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

**CAMPUS JURIQUILLA, QUERÉTARO. ABRIL 2014**



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.

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Instituto de Neurobiología**

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Daniela Julia Fregoso Urrutia, cuyo título es: “Efecto del consumo crónico de sabores dulces sobre la formación de la memoria gustativa: Función de la actividad colinérgica cortical”, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**Presidente**

**Dra. María Teresa Morales Guzmán**

**Secretario (Tutor)**

**Dra. María Isabel Miranda Saucedo**

**Vocal**

**Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola**

**Suplente**

**Dra. Livia Sánchez Carrasco**

**Suplente**

**Dr. Mauricio Díaz Muñoz**

**Aprobado por el Comité Académico**

---

**Dr. Alfredo Varela Echavarría**

**Coordinador del Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)**

# I – RESUMEN

Para estudiar la memoria gustativa, que junto a la memoria olfativa se denomina “memoria del sabor”, se han utilizado diversos modelos tales como son el de *respuesta apetitiva*, de *preferencia* y el *condicionamiento de aversión al sabor* (CAS). Durante la formación de la memoria del sabor, los niveles de acetilcolina (ACh) liberada en la corteza insular (CI) se relacionan directamente con el grado de novedad del estímulo gustativo. Se ha demostrado que el carbacol, agonista de los receptores muscarínicos para ACh, es capaz de imitar la activación colinérgica generada por un sabor novedoso (p.e. sacarina), de tal forma que un sabor familiar puede ser considerado como uno novedoso. El primer objetivo de esta tesis fue comparar los efectos del consumo crónico (14 días) de dos sabores dulces con diferente contenido calórico, sacarina y sacarosa, en ratas Wistar macho (340-360 g) sobre la memoria apetitiva del sabor, durante un nuevo aprendizaje aversivo (p.e. CAS) y el re-aprendizaje durante la extinción de la aversión a ese mismo sabor. Debido a que los resultados de la primera parte del proyecto indicaron que el contenido calórico juega un rol importante en el nuevo aprendizaje aversivo y en el re-aprendizaje, así como en los efectos crónicos tras su consumo durante 14 días, se decidió utilizar la sacarosa para evaluar los efectos de manipulaciones farmacológicas sobre la actividad colinérgica durante diferentes grados de familiaridad al sabor. De tal forma, en sujetos que tuvieron un consumo agudo (2 días) o un crónico (14 días), se estudiaron los efectos del carbacol, administrado bilateralmente en la CI 20 min antes de la adquisición del CAS, y sus consecuencias posteriores sobre el re-aprendizaje asociativo del sabor durante la extinción de la aversión. Los resultados obtenidos muestran que el consumo crónico de sacarosa produce una memoria apetitiva significativamente robusta del sabor, la cual induce cambios diferenciales en la función de los receptores muscarínicos de la corteza insular que se correlacionan con la forma en que se re-aprende o adquiere nuevas asociaciones para el mismo sabor.

## II – ABSTRACT

During taste memory formation, the amount of acetylcholine (ACh) in the insular cortex (IC) directly correlates with novelty. Moreover, it has been demonstrated that carbachol, a muscarinic agonist receptor, is able to mimic the cholinergic activation generated by a novel taste (saccharin), on which basis a familiar taste would be treated as novel. Our first goal was to compare the chronic consumption of two sweet tastants with different caloric content, saccharin and sucrose, on male Wistar rats (340-360 g) over the appetitive taste memory, during a new aversive learning (conditioned taste aversion, CTA) as well as the effects on re-learning taste association during the extinction of aversion. Since the results indicated that the caloric content had a differential effect on new and re-learning, we focused on sucrose for the pharmacological manipulations. Carbachol, administered bilaterally in the IC 20 minutes before the CTA acquisition, only had an effect on the re-learning taste association during the extinction of aversion. These findings suggest that the chronic consumption of sucrose induces a strong taste appetitive memory representation that could differentially change cortical cholinergic activity and the possibility to re-learn or acquire new associations for the same taste stimulus.

## **III - AGRADECIMIENTOS**

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**

**A mi tutora**, Dra. María Isabel Miranda Saucedo

**A mi Comité Tutelar**, Dra. Gina Lorena Quirarte y Dr. Mauricio Díaz Muñoz

**Personal de apoyo en el Laboratorio de Neuroquímica de la memoria (B-14):**

Técnica Académica Dra. Gabriela Vera

Auxiliar de laboratorio Lic. Alejandro Rangel

**Unidad de enseñanza**

M. en C. Leonor Casanova Rico

**Biblioteca**

Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela

MVZ. Román Pacheco Barrita

**Bioterio**

MVZ José Martín García Servín

**El presente proyecto fue financiado por:**

Fondos para la Investigación del CONACYT No. 152208,

Proyecto PAPIIT-DGAPA IN209911

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**

Becario No: 372508



2.4.1 Corteza Insular	18
2.5 – FUNCIÓN COLINÉRGICA CORTICAL EN LA MEMORIA DEL SABOR	21
2.5.1 Agonista colinérgico carbacol	25
<b>3 – JUSTIFICACIÓN</b>	<b>27</b>
<b>4 – HIPÓTESIS</b>	<b>29</b>
<b>5 – OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
<b>6 – SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
6.1 - SUJETOS	31
6.2 – MÉTODOS	31
6.2.1 - Línea base	32
6.2.2 – Preferencia	32
6.2.3 – Consumo crónico	32
6.2.4 - Cirugía	33
6.2.5 – Inyección intracerebral	33
6.2.6 – CAS	34
6.2.6.1 CAS con una probeta	34
6.2.6.2 CAS con dos probetas	35
6.2.7 – Extinción	35
6.2.8 - Histología	35
6.2.9 - Prueba de ansiedad	36

6.3 – EXPERIMENTO 1, OBJETIVOS 1 Y 2: CONSUMO DE SABORES DULCES CON DIFERENTE CONTENIDO CALÓRICO	37
6.3.1 - Grupos experimentales	38
6.4 – EXPERIMENTO 2, OBJETIVOS 3 Y 4: EFECTO DE LA INYECCIÓN DE CARBACOL EN LA CORTEZA INSULAR SOBRE LA CONDUCTA	39
6.4.1 - Grupos experimentales	40
6.5 - EXPERIMENTO 3, OBJETIVO ADICIONAL: ESTUDIO DE ANSIEDAD	43
6.5.1 - Grupos experimentales	44
<b>7 – RESULTADOS</b>	46
7.1 – OBJETIVO 1: COMPARACIÓN DE LA PREFERENCIA DE CONSUMO ENTRE SABORES DULCES CON CONTENIDO CALÓRICO	46
7.1.1 – Preferencia al sabor dulce	46
7.1.2 – Consumo crónico	47
7.1.2.1 – Efecto en el consumo de líquido	47
7.1.2.2 – Efecto en el consumo de alimento	48
7.1.2.3 – Efecto en la ingesta calórica diaria	49
7.1.2.4 – Efecto en el peso	51
7.2 – OBJETIVO 2: EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN LATENTE DEL CAS Y LA EXTINCIÓN DE LA AVERSIÓN DESPUÉS DE UN CONSUMO CRÓNICO DE SABORES DULCES CON	52

<b>DIFERENTE CONTENIDO CALÓRICO</b>	
<b>7.3 – OBJETIVO 3: EFECTO DE LA INYECCIÓN DE CARBACOL EN LA CORTEZA INSULAR DURANTE EL CAS</b>	<b>55</b>
<b>7.4 – OBJETIVO 4: EFECTO DE LA INYECCIÓN DE CARBACOL EN LA CORTEZA INSULAR DURANTE LA EXTINCIÓN DE LA AVERSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>7.5 - EXPERIMENTO ADICIONAL: ESTUDIO DE ANSIEDAD</b>	<b>59</b>
7.5.1 Tiempo en brazo abierto en el día 8 de aclimatación	59
7.5.2 Tiempo en brazo abierto en el día de la adquisición del CAS	60
7.5.3 Tiempo en brazo abierto en el día de la extinción 3	60
<b>8 – DISCUSIÓN</b>	<b>62</b>
<b>9 – CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>IV – REFERENCIAS</b>	<b>iv</b>
<b>V – ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>v</b>
<b>VI - ABREVIATURAS</b>	<b>vi</b>

# 1 - INTRODUCCIÓN

Todos los organismos obtienen constantemente información del mundo a través de los sentidos y la procesan para formar representaciones internas que guiarán conductas futuras. Estas representaciones internas que se encuentran almacenadas son lo que se conoce como *memoria*. Se sabe que no existe un centro único de la memoria en el cerebro, sino que ésta se encuentra codificada por un grupo de circuitos específicos a lo largo de varias vías y estructuras (Squire y Kandel, 2000).

La memoria ha sido clasificada de diversas maneras tomando en cuenta, como algunos ejemplos, su temporalidad (memoria de corto y largo plazo), de acuerdo con la información que almacena (declarativa y no declarativa) y por su modalidad sensorial (memoria táctil, visual, auditiva, olfativa y gustativa). Esta última clasificación es en la que se basa esta tesis, particularmente nos centraremos en la memoria gustativa ya que es una de las memorias más robustas que poseen los organismos debido a que el reconocimiento de los alimentos que lo benefician o perjudican es de vital importancia para su sobrevivencia.

Según el modelo propuesto por Bures, la información gustativa es almacenada en la memoria a corto plazo hasta que sus consecuencias post-ingestionales permitan clasificarla como benéfica o perjudicial (Bures *et al.*, 1998). La memoria gustativa se actualiza constantemente con las experiencias que se van adquiriendo acerca de los estímulos gustativos contenidos en los alimentos (Miranda, 2011).

La memoria gustativa subyace en varias estructuras cerebrales trabajando conjuntamente. Entre estas estructuras se encuentran el núcleo del tracto solitario (NTS), el núcleo parabraquial (NPB), la amígdala basolateral (BLA) y la corteza insular (CI). Se ha propuesto a la CI como centro integrador de la información ya

que recibe aferencias tanto gustativas como viscerales (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2009).

Para estudiar la memoria gustativa, que junto a la memoria olfativa se denomina memoria del sabor, se han utilizado diversos modelos como son el de *respuesta apetitiva*, de *preferencia* y el *condicionamiento de aversión al sabor* (CAS). Tanto el modelo de respuesta apetitiva como el de preferencia se consideran modelos apetitivos. Es posible cambiar las preferencias innatas del organismo a través de aprendizajes asociativos como en el caso del CAS.

La necesidad que guía al organismo a consumir ciertos alimentos no sólo depende del sabor en sí sino de otras características intrínsecas como son su textura (Avena, 2007, 2009; Fortuna, 2010; Pelchat, 2002), su contenido calórico (Myers y Sclafani, 2006; Martínez-Moreno, 2009) y su valor hedónico asociado (de la Torre-Vacas, 2006; Lundy, 2008). Tanto la textura como el contenido calórico son característicos de los alimentos que no pueden modificarse (aunque su percepción puede ser alterada debido a ciertos estados transitorios como las drogas); sin embargo, el valor hedónico (placentero o no placentero) puede cambiar a través del aprendizaje ya que depende de las propiedades reforzadoras asociadas a éste (de la Torre-Vacas, 2006).

Además de lo anterior, evolutivamente existen predisposiciones innatas de preferencia y rechazo por ciertos sabores. El sabor dulce es altamente preferido; los frutos dulces están asociados como alimentos nutritivos, Capaldi (1992) menciona que esta preferencia es un medio evolutivo para que las crías acepten la leche materna. También, a concentraciones adecuadas, los sabores salados son preferidos ya que se relacionan a sales y minerales necesarios para la vida. Otros sabores como los amargos y los ácidos son innatamente considerados como peligrosos (Myers y Sclafani, 2006; Miranda, 2011). Los sabores como el de la cerveza y los quesos fuertes deberían ser naturalmente rechazados ya que su sabor amargo indica al organismo que estos se encuentran en un proceso de

descomposición y por consiguiente pueden ser dañinos. Sin embargo, el sujeto aprende que, a ciertas concentraciones, tales alimentos no generan consecuencias post-ingestionales graves y su consumo aumenta. (Myers y Sclafani, 2006).

El valor hedónico y la asociación con una fuente rápida de energía no son los únicos causantes de la preferencia por sabores dulces en los organismos. Se ha observado que el sabor dulce activa el circuito de recompensa del cerebro (Volkow y Wise, 2005; Fortuna 2010). La gran mayoría de las personas al comer un chocolate experimentan una sensación de saciedad y aumento en su ánimo (Avena, 2010; Fortuna, 2010), es así que los sabores dulces tienen un efecto significativo en la química cerebral que puede llevar a un consumo exacerbado y prolongado.

## 2- ANTECEDENTES

### 2.1 PREFERENCIA A LOS SABORES DULCES

La preferencia por sabores dulces está guiada por dos componentes principalmente, uno hedónico y uno metabólico. Los sabores dulces tienen un valor hedónico positivo puesto que diferentes especies lo han sido asociado con energía y saciedad a lo largo de su evolución (Volkow y Wise, 2005; Johnson *et al.*, 2007; Fortuna, 2010). Cada vez está más claro que los sabores altamente apetitosos activan los circuitos de recompensa del cerebro, a través de rápidas señales sensoriales de entrada y lentas consecuencias digestivas, de forma similar que muchas drogas de abuso, las cuales activan las mismas rutas pero a través de efectos farmacológicos directos (Volkow y Wise, 2005; Fortuna, 2010). El efecto que el sabor dulce tiene en los mecanismos de recompensa utilizados por el cerebro puede ser la causa del porqué su consumo aumenta incluso hasta niveles compulsivos (Volkow y Wise, 2005). Se ha demostrado que las ratas con ingesta crónica de sacarosa exhiben un número de aberraciones fisiológicas comparables a las observadas en obesidad humana (Jurdak y Kanarek, 2009).

¿Cuáles son los mecanismos que se encuentran involucrados para que se incremente el consumo de sabores dulces de manera exacerbada? Aún prevalece una gran polémica al tratar de contestar esta pregunta.

Entre los mecanismos neuroquímicos asociados que se han propuesto que podrían estar guiando este consumo exacerbado de sabores dulces se encuentran:

- Activación del sistema reforzante/recompensa, a través del aumento de dopamina (DA) extracelular en el núcleo acúmbens (NAcc), efecto similar a

lo observado bajo el consumo de algunas drogas de abuso (Wise *et al.*, 1995; Avena, 2006).

- Liberación de opioides endógenos que producen efectos analgésicos (Blass y Hoffmeyer, 1991) y que dan un carácter reforzante a la ingesta de sabores dulces. (Pelchat, 2002; Fortuna, 2010; Mercer y Holder, 1997).
- La ingestión de carbohidratos, incluidos los azúcares simples, lleva a un aumento en la producción de serotonina, neurotransmisor que contrarresta los efectos de ansiedad y estrés, y que juega un papel importante modulando el dolor, sueño y ritmos circadianos (Fortuna, 2010).

### 2.1.1 - Componente hedónico

Innatamente, los sabores pueden ser considerados placenteros (valor hedónico positivo) o no placenteros (valor hedónico negativo). Los sabores dulces se ha demostrado que tienen un valor hedónico positivo pues a través de generaciones se han asociado con una fuente de energía importante para los organismos.

Se ha demostrado que la ingesta de sabores altamente apetitosos, como el sabor dulce, puede estimular respuestas similares a drogas duras en la vía dopaminérgica mesolímbica (Nestler, 2005). Esta vía se compone de neuronas dopaminérgicas originadas en el área ventral tegmental (AVT) que son proyectadas al NAcc. Aún no se ha logrado dilucidar cómo es posible que la ingestión de ciertos alimentos está impactando en dicha vía pero se cree que el péptido orexina, expresado en el hipotálamo lateral (HL), pueda estar estimulando directamente las neuronas dopaminérgicas en el AVT y promoviendo la liberación de DA en el NAcc (Zheng *et al.*, 2006).

El valor hedónico es susceptible de modificaciones mediante aprendizajes asociativos. Por ejemplo, en el CAS se utiliza usualmente un sabor con valor

hedónico positivo como estímulo condicionado. En los inicios del estudio del aprendizaje aversivo gustativo, John García y colaboradores probaron que las ratas preferían una solución de sacarina sobre agua (el consumo de la solución de sacarina representó el 86% del consumo total) y que al ser relacionada con un estímulo incondicionado nocivo (radiación gama), se podía observar una disminución de su consumo (García *et al.*, 1955). Desde entonces la sacarina ha servido como principal sabor (estímulo condicionado) en el modelo del CAS ya que además de tener un valor hedónico positivo no cuenta con un aporte calórico que pueda estar interfiriendo con los mecanismos involucrados en la memoria del sabor.

### 2.1.2 - Componente metabólico (contenido calórico)

Se ha sugerido que además del valor hedónico del sabor dulce, el contenido calórico puede estar guiando la preferencia de su consumo (Capaldi *et al.*, 1987; Ackroff y Sclafani, 1991; Fortuna, 2010).

La decisión de ingerir ciertos alimentos puede depender de un desequilibrio fisiológico que los organismos tratan de compensar. Este proceso de regulación de desequilibrios fisiológicos fue denominado por Cannon (1932) como homeostasis. La homeostasis correspondiente a la ingesta de alimentos se debe a la regulación del balance de energía del organismo.

Existen dos moléculas que principalmente estarán indicando al SNC acerca del nivel de energía en el cuerpo, estas son la leptina y la grelina. La leptina es una hormona producida principalmente por las células adiposas. La leptina tiene un efecto de suprimir la ingesta de alimento al estimular neuronas POMC/CART e inhibir neuronas NPY/agRP en el núcleo arcuato (NAR) (Lutter y Nestler, 2009). La grelina es una hormona sintetizada por el estómago, en ausencia de alimento sus niveles aumentan y se produce en el organismo la sensación de apetito.

El aporte energético de los alimentos se mide en calorías. Se define la unidad caloría como la cantidad de energía que es requerida para que un gramo de agua eleve su temperatura 1°C.

Una de las moléculas con aporte calórico más ampliamente estudiadas es la sacarosa o llamada comúnmente azúcar. Se compone de una molécula de glucosa y otra de fructosa. Es de sabor dulce y su aporte energético es de 3.9 kcal/g.

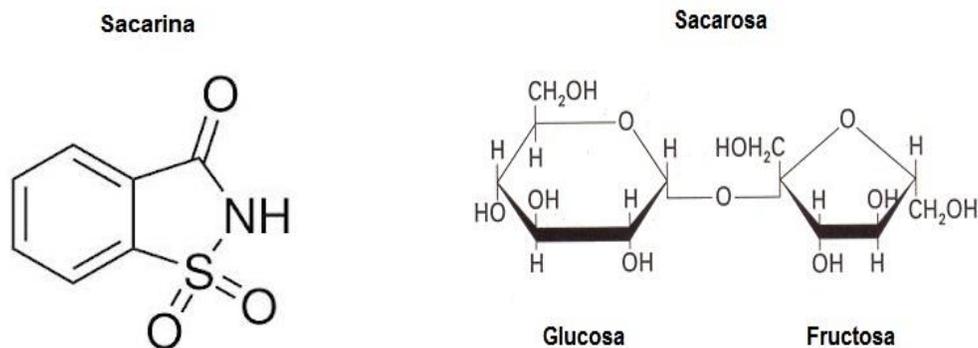


Figura 1. Molécula de sacarina y molécula de sacarosa. La sacarina es un edulcorante sin aporte energético 300 veces más dulce que la sacarosa. La sacarosa es un disacárido que se compone de una molécula de glucosa y una de fructosa que se unen a través de un enlace O-glucosídico.

En 2009 Avena y colaboradores demostraron que bajo un protocolo de exposición intermitente y limitada a una solución de sacarosa al 10%, las ratas incrementan su consumo y muestran un efecto de disminución de ingesta de alimento sólido. Sin embargo, tanto su ingesta calórica diaria como peso corporal se mantuvo similar a los sujetos control (Avena *et al.*, 2009).

También en 2009, Martínez-Moreno y colaboradores exploraron este problema de sabor contra calorías para determinar si la conducta de ingesta difería. Para ello, utilizaron una solución de sucralosa<sup>1</sup> y una de glucosa<sup>2</sup> suministradas bajo un

<sup>1</sup> Edulcorante sin aporte energético al igual que la sacarina

<sup>2</sup> Monosacárido con aporte energético, componente de la sacarosa.

régimen intermitente y a grupos independientes. Ellos encontraron que el grupo al que le dieron a consumir la solución de glucosa, consumió más que el grupo con la solución de sucralosa (Martínez-Moreno *et al.*, 2009).

## 2.2 APRENDIZAJE Y MEMORIA

Aprender a utilizar herramientas, recordar cuáles alimentos nos hace daño, recordar el camino a nuestro hogar, aprender que ciertas acciones están ligadas a recompensas o a castigos, recordar el rostro de nuestros padres (al necesitar aún de su sustento) son algunos ejemplos de que el aprendizaje y la memoria son procesos adaptativos sumamente importantes para nuestra sobrevivencia.

El aprendizaje se define como la generación, dependiente de experiencias, de representaciones internas duraderas y el almacenamiento de dichas representaciones, que se lleva a cabo mediante cambios en el sistema nervioso, se conoce como memoria (Dudai, 1989).

El proceso de memoria conlleva 3 fases:

- **Adquisición:** La información nueva es traducida y codificada en el sistema nervioso.
- **Consolidación:** Proceso mediante el cual lo aprendido se almacena gradualmente y pasa a convertirse en una memoria a largo plazo.
- **Evocación:** Es la recuperación de la información almacenada.

La memoria humana se ha clasificado en memoria declarativa y no declarativa. La memoria declarativa se compone de hechos y eventos como el recordar el

cumpleaños de una persona, lo que desayunamos el día de ayer o la fórmula de la densidad. En la memoria no declarativa se subdivide en memoria de procedimientos, aprendizajes asociativos y no asociativos. Esta tiene la particularidad de no tener acceso al recuerdo consciente, es decir, para corroborar su aprendizaje se necesitan pruebas implícitas.

La memoria también puede ser clasificada con respecto al sistema sensorial que la codificó, de tal manera que se puede tener una memoria visual, una táctil, una auditiva, una olfativa y una gustativa. A la memoria gustativa en conjunto con la olfativa se le conoce como memoria del sabor, cuya definición será abordada en la sección siguiente.

## 2.3 – MEMORIA DEL SABOR

La memoria del sabor puede definirse como el almacenamiento de la información percibida por el sistema gustativo que podrá guiar conductas de ingesta futuras; incluye además otras características intrínsecas de un alimento como su textura, su valor hedónico asociado, grado de familiaridad y sus características tóxicas asociadas con el sabor (Gutiérrez *et al.*, 2003; Núñez-Jaramillo, 2009). Desde un punto de vista evolutivo, la memoria del sabor representa una de las más importantes formas de memoria debido a que la decisión de ingerir o no un alimento tendrá un impacto en la probabilidad de sobrevivencia de la especie (Bermúdez Rattoni, 2004).

La memoria del sabor ha sido útil para estudiar las fases de la memoria (adquisición, consolidación y evocación), ya que éstas son fácilmente diferenciables, además de que se conocen las rutas neuronales básicas involucradas durante el procesamiento de los estímulos gustativos y viscerales mediante estudios electrofisiológicos y anatómicos (Bures *et al.*, 1998).

## 2.3.1 - Modelos de aprendizaje y memoria del sabor

Existen predisposiciones innatas para preferir (sabores dulces y salados) algunas comidas y evadir otras (sabores amargos y ácidos), pero también todos los animales adquieren nuevas preferencias de sabor y aversiones a través de procesos de aprendizaje asociativos (Touzani y Scaflani, 2007; de la Torre-Vacas, 2006).

Se han descrito numerosos modelos para estudiar la memoria del sabor y éstos se pueden clasificar en apetitivos y aversivos. A continuación se expondrán los modelos utilizados en este trabajo.

### 2.3.1.1 - Respuesta apetitiva

En algunas ocasiones, cuando un alimento con un sabor relevante/notorio es ingerido por primera vez, suele consumirse con cautela, disminuyendo la cantidad ingerida como respuesta instintiva ante lo nuevo hasta que las consecuencias posteriores a su ingesta sean evaluadas por el organismo. Lo anterior se conoce en términos generales como neofobia<sup>3</sup> al sabor. Si el alimento no generó ningún malestar gastrointestinal, el consumo de éste permanece estable o, generalmente, se incrementa en ingestas posteriores. A dicho incremento se le conoce como atenuación a la neofobia (Domjan, 1977) y lleva a la formación de una memoria incidental gustativa. Sólo algunos estímulos gustativos novedosos inducen una respuesta apetitiva, llevando a un incremento del consumo e interpretada como memoria de sabor apetitiva (Núñez-Jaramillo *et al.*, 2009).

---

<sup>3</sup> La neofobia no es exclusiva de los estímulos gustativos, también puede presentarse a un contexto u objetos.

### 2.3.1.2 - Preferencia

En el modelo de preferencia al sabor, se presenta al sujeto la opción de ingerir entre 2 o más sabores de manera simultánea. Se mide la preferencia de un sabor sobre otro al comparar los consumos (Bures *et al.*, 1998).

Aunque las características intrínsecas de los alimentos percibidas por el organismo no cambian, los estados motivacionales internos y la búsqueda por la homeostasis van a influir para que estas preferencias varíen incluso de un día a otro. También las preferencias son susceptibles a ser modificadas mediante aprendizajes asociativos.

### 2.3.1.3 - Condicionamiento de aversión a los sabores

El condicionamiento de aversión a los sabores (CAS) es un modelo de aprendizaje asociativo en el cual se asocia un sabor (estímulo condicionado) con una consecuencia post-ingestional negativa (estímulo incondicionado), resultando en una disminución en el consumo (García *et al.*, 1955). Si el sabor era novedoso para el organismo, usualmente se requerirá de una sola asociación o ensayo para disminuir su consumo (por criterio de nuestro laboratorio, consideramos un CAS adecuado cuando el consumo se encuentra por debajo del 50% de lo consumido antes de la asociación). La asociación del sabor con el estímulo incondicionado puede llevar de 1-12 h (Bures *et al.*, 1998).

El estímulo condicionado utilizado comúnmente en el CAS es una solución de sacarina y el estímulo incondicionado es una inyección intraperitoneal (i.p.) de Cloruro de Litio (LiCl).

El CAS ha demostrado ser un paradigma de aprendizaje sumamente útil para estudiar los mecanismos moleculares de aprendizaje y memoria debido a que

muestra diversas ventajas: es un aprendizaje de un solo ensayo, requiere manipulación conductual mínima y sus fases (adquisición, consolidación y evocación) son fácilmente diferenciables (Bures *et al.*, 1998; Rosenblum, 2008)

#### 2.3.1.4 - Extinción

Después de un CAS, al presentar sucesivamente el estímulo gustativo sin el malestar subsecuente, se observa un aumento gradual de su consumo hasta alcanzar un nivel de consumo similar a un sabor familiar-seguro. Esta disminución de la aversión al estímulo condicionado se conoce como extinción (Bures *et al.*, 1998).

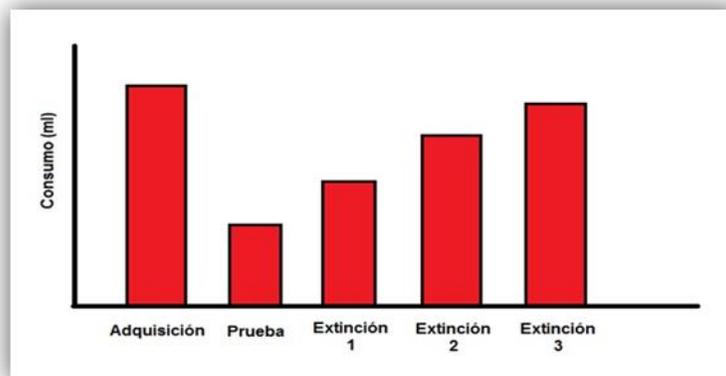


Figura 2. Ejemplo del aprendizaje aversivo (Prueba) tras la adquisición del CAS y la posterior extinción de la aversión gustativa. Se puede observar que después de la prueba, cuando se deja de presentar el estímulo aversivo, el sujeto disminuye gradualmente la asociación aversiva a ese sabor y se ve reflejado en un aumento en el consumo.

### 2.3.1.5 - Inhibición latente

Con respecto al aprendizaje aversivo gustativo, cuando los animales tuvieron un consumo del sabor previo a la adquisición del CAS (días o semanas), van a requerir un mayor número de asociaciones con el estímulo aversivo para disminuir su consumo, proceso que se conoce como inhibición latente (Lubow y Moore, 1959). Durante la etapa de consumo previo se forma una memoria gustativa, por lo que la fuerza aversiva de la memoria del sabor, observada en una reducción del consumo, va a ser menor que un condicionamiento de aversión al sabor regular (Berman *et al.*, 2000). El animal se ve forzado a re-aprender a asociar el sabor con la nueva consecuencia aversiva.

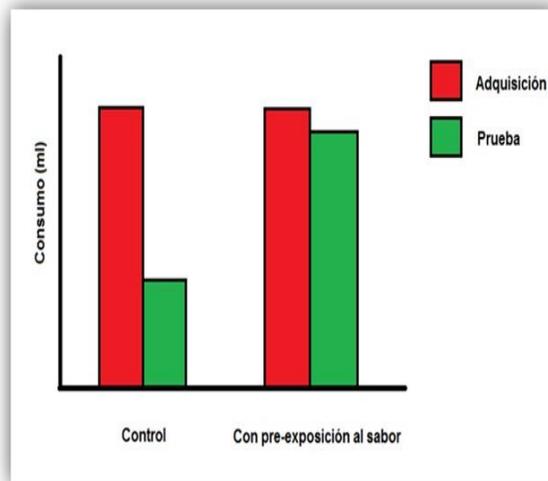


Figura 3. Ejemplo de Inhibición latente del CAS. Los sujetos no pre-expuestos al sabor (Control) presentan una aversión significativa (p.e. Control-Prueba) tras la adquisición del CAS. Sin embargo, Cuando los sujetos son pre-expuesto al sabor días antes del CAS, éstos no adquieren una aversión significativa (p.e. valores similares entre la adquisición y la prueba), requiriendo un número mayor de entrenamientos del CAS para lograr un aprendizaje aversivo y disminuir su consumo.

Se han realizado diferentes propuestas para tratar de explicar el fenómeno de inhibición latente. Las más discutidas han sido si la inhibición latente está reflejando un proceso de habituación (Wickelgren, 1967; Davis y Wagner, 1968) o si se trata de una interferencia entre la asociación previa y la formación de una nueva (Miller *et al.*, 1986). Sin embargo, al cambiar ciertas variables en los experimentos se ha demostrado que la inhibición latente está correlacionada con la intensidad del estímulo condicionado (concentración de la solución), frecuencia y duración del tiempo de consumo durante la fase de pre-exposición (Rodríguez y Alonso, 2002; De La Casa y Lubow, 1995; Albert y Ayres, 1989). Estas observaciones no han podido ser explicadas por las teorías antes propuestas. De tal forma, la explicación más aceptada hasta el momento con respecto a la inhibición latente es que es un aprendizaje que ocurre durante la fase de pre-exposición y no una falla en la evocación de la memoria (De La Casa y Lubow, 1995; Rodríguez y Alonso, 2002).

## 2.4 ESTRUCTURAS ANATÓMICAS INVOLUCRADAS EN LA MEMORIA DEL SABOR

Las memorias al sabor tanto seguras como aversivas dependen de substratos neurales trabajando en conjunto en su procesamiento. Esta representación se conoce como la traza de la memoria del sabor (TMS) (Gutierrez *et al.*, 2003).

El procesamiento de los estímulos gustativos inicia en la boca mediante los receptores agrupados en las papilas gustativas localizadas en la lengua, paladar, laringe, faringe y epiglotis. Estos receptores se conocen como células receptoras gustativas (TRC, por sus siglas en inglés) y se han descrito 3 tipos de ellas (tipo 1, 2 y 3). Se pueden encontrar TCR de todos los tipos en cada papila gustativa, de tal forma que todas las papilas tienen la capacidad de procesar los cinco sabores básicos que son: dulce (asociado con carbohidratos), salado (asociado con sales y

minerales), amargo (asociado con alcaloides), agrio (asociado con ácidos) o umami (asociado con aminoácidos) (Chandrashekar *et al.*, 2006).

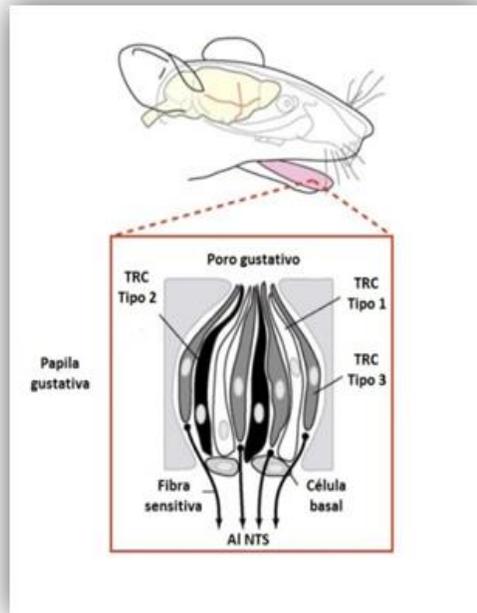


Figura 4. Papila gustativa. Las papilas gustativas están compuestas de receptores que responden particularmente a una modalidad básica de sabor (dulce, amargo, salado, agrio o umami). Células receptoras gustativas (TRC, por sus siglas en inglés); Núcleo del tracto solitario (NTS). Modificado de Carleton *et al.*, 2010.

La molécula sávida se acopla con un receptor de los TRC y la información es transmitida activándose neurotransmisores que excitan fibras nerviosas aferentes. La información gustativa es conducida hacia el nervio facial (VII, inerva la lengua anterior), el glossofaríngeo (IX, inerva las áreas de la lengua posterior y lateral) y el nervio vago (X, inerva los receptores de sabor localizados en la laringe, faringe y epiglotis). El primer relevo sináptico está en la porción rostral del Núcleo del tracto solitario (NTS). Neuronas del NTS proyectan ipsilateralmente al Núcleo Parabraquial (NPB) en su sección posteromedial. Posteriormente, una parte de la información converge al hipotálamo lateral (HL), sustancia innominata, núcleo del lecho de la estría terminal, amígdala (núcleo basolateral, BLA y núcleo central,

NCA)<sup>4</sup>; la otra parte de la información llega al núcleo ventroposterior-medial del tálamo (VPMpc) y de éste a la Corteza Insular (CI) que a su vez proyecta recíprocamente al NPB, al NTS, al NCA, al BLA, a la corteza somato-sensorial primaria (S1) y a la corteza orbito-frontal (COF) (Carleton *et al.*, 2010; Bermúdez-Rattoni *et al.*, 2003).

Adicionalmente, en la vía gustativa están interactuando diversas áreas cerebrales involucradas en la identificación del sabor, la recompensa y la decisión de ingesta como por ejemplo el núcleo acúmbens (NAcc) y la corteza prefrontal (Carleton *et al.*, 2010) además de otras como el Núcleo Basal Magnocelular (NBM) que se detallará más adelante. La corteza perirrinal, el hipocampo y la CI son estructuras que han sido implicadas en la extinción de una memoria aversiva y en la atenuación a la neofobia (García-dela Torre *et al.*, 2010; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2005; De la Cruz *et al.*, 2008)

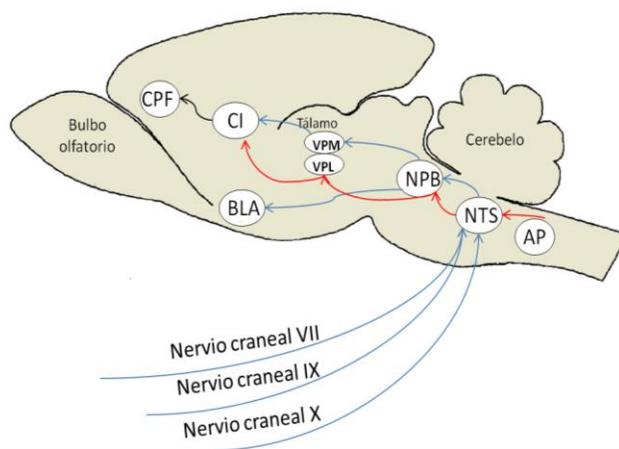


Figura 5. Representación de los principales substratos neurales de las vías gustativa (flechas azules) y visceral (flechas rojas). AP, área postrema; NTS, núcleo del tracto solitario; NPB, núcleo parabraquial; BLA, amígdala basolateral; VPMpc, núcleo ventroposterior-medial del tálamo; VPL, núcleo ventro-posterior lateral del tálamo; CI, corteza insular; CPF, corteza prefrontal.

<sup>4</sup> Existen conexiones recíprocas entre estas estructuras.

Por otra parte, la información visceral llega al sistema nervioso central mediante dos vías, el nervio vago y el área postrema (AP). El estímulo que directamente irrita el sistema gastrointestinal es conducido por el nervio vago mientras que los agentes que inducen malestar que se encuentran en el torrente sanguíneo llegan al AP (Bermúdez-Rattoni, 2004). Ambas vías llegan a la parte caudal del NTS, a diferencia de la información gustativa que llega a la parte rostral. Del NTS salen proyecciones al subnúcleo lateral del NPB y de este hay proyecciones al núcleo ventroposterior-lateral del tálamo (VPL) (Cechetto y Sarper, 1987).

El NPB se ha sugerido como una de las áreas más importantes para el procesamiento de la memoria al sabor, en particular para la adquisición del CAS (Ivanova y Bures, 1990; Bielavska y Bures, 1994; Yamamoto *et al.*, 1995). La CI se ha propuesto como un sitio imprescindible para la asociación del estímulo gustativo y el visceral y, al ser la estructura central de esta tesis, se ahondará más ampliamente acerca de ella en la siguiente sección.

Diferentes sistemas de neurotransmisión están participando en la codificación de la memoria del sabor, entre estos se encuentran el colinérgico<sup>5</sup>, glutamatérgico y gabaérgico.

Se ha probado que tanto los receptores AMPA como los NMDA, activados por el glutamato, son necesarios para la adquisición del CAS pero no así para su evocación; el bloqueo de los AMPA en CI interrumpe la evocación mientras que el bloqueo de los NMDA no lo hace (Berman *et al.*, 2000; Rosenblum *et al.*, 1997). Se ha demostrado que al bloquear receptores NMDA, activados por glutamato, antes de la presentación del sabor, interrumpe la formación de una memoria del sabor a largo plazo (Ferreira *et al.*, 2000), indicando que la actividad glutamatérgica está participando en la consolidación de la memoria del sabor. Además de esto, se ha demostrado que la actividad glutamatérgica está relacionada con la información visceral al mejorar la adquisición del CAS aún utilizando un malestar gástrico débil (Miranda *et al.*, 2002).

---

<sup>5</sup> Ver sección 2.3.

Con lo que respecta a GABA, se ha demostrado que los receptores GABAB(1a) son necesarios para el aprendizaje del CAS y que los receptores GABAB(1b) están relacionados con su extinción, utilizando ratones knock-out que no expresaban dichos receptores (Jacobson *et al.*, 2006).

### 2.4.1 - Corteza insular

Las neuronas en la CI responden a la cualidad y el valor hedónico de los sabores; éstas muestran una organización quimiotópica (diferentes regiones topográficas responden a modalidades de sabor preferentes aunque no se ha podido limitar una región a una modalidad específica) (Carleton *et al.*, 2010) y viscerotópica (Aleksandrov y Fedorova, 2003).

La CI es una estructura imprescindible para la formación y la consolidación de memorias gustativas tanto apetitivas como aversivas ya que también procesa la información concerniente a las consecuencias post-gastrointestinales (Bures *et al.*, 1998). El consumo de un sabor novedoso induce un incremento en la expresión de c-Fos<sup>6</sup> en la CI, mayor que un sabor familiar, lo cual nos habla de que la CI es un sitio clave para el procesamiento de los sabores novedosos y por consiguiente, para el CAS (Koh *et al.*, 2003).

La CI se encuentra localizada en la superficie lateral de los hemisferios cerebrales y en la rata se define por ser el área que abarca desde la corteza frontal lateral hasta la corteza perirrinal en dirección rostro-caudal y de forma dorso-ventral desde la corteza somatomotora hasta la corteza piriforme. La neocorteza gustativa ocupa 1mm de ancho y 3mm de largo, formando así sólo un 15% de la corteza insular (Bures *et al.*, 1998).

---

<sup>6</sup> La expresión de c-Fos se toma en cuenta como un marcador de activación celular.

En la rata es posible identificar 2 subáreas en la CI, la región principal y las subáreas suplementarias:

Región principal: Se compone de una región anterior (AI; corteza insular anterior) y una posterior (PI), ambas siendo agranulares. La capa IV está ausente y las capas II y III se encuentran fusionadas. AI tiene como características poseer la capa V gruesa e uniforme, la capa II delgada y la capa III poco desarrollada. PI posee una capa I más delgada. (Aleksandrov y Fedorova, 2003).

Subárea suplementaria: Consiste en una región dorsal (DI; corteza insular disgranular) y una ventral (VI). La capa IV de la subárea suplementaria es granular. Las capas II y III se encuentran separadas y la capa VI está dividida en 2 subcapas (Aleksandrov y Fedorova, 2003).

Las divisiones anatómicas de la CI (granular, disgranular y agranular), sirven como cortezas sensoriales primarias, secundarias y terciarias, respectivamente (Rosenblum, 2008). La corteza gustativa (CG) se encuentra principalmente en la corteza insular disgranular y la corteza viscerosensorial (caudo-dorsal a la neocorteza gustativa) en la corteza insular granular (Bures *et al.*, 1998). Ver Fig 6.

Estudios electrofisiológicos han demostrado que la estimulación de modalidad gustativa en la lengua, pero no táctil o relacionada con la temperatura, activa el área agranular de la CI (Braun, 1990).

Braun y colaboradores, fueron los primeros de mostrar evidencia de que la CG, localizada en la parte anterior de la CI, tiene un papel de vital importancia en el procesamiento de información gustativa (Braun *et al.*, 1972). En la CG existe una organización topográfica en relación a varios estímulos gustativos (Accolla *et al.*, 2007). Se ha demostrado mediante estudios de imágenes que los mapas del sabor en la CG son plásticos, es decir, que sufren un reacomodo al cambiar el valor hedónico mediante aprendizajes asociativos como el CAS (aprendizaje aversivo) y la extinción (re-aprendizaje apetitivo) (Grinvald *et al.*, 1999).



(lesión CI con pre-exposición) como los sujetos lesionados a los que se les dio acceso por primera vez a la solución de salina (lesión CI sin pre-exposición). Tanto la pre-exposición al sabor como la lesión en la CI están causando un efecto de inhibición latente, esto es, una disminución en la capacidad de asociación de un estímulo gustativo con el malestar gástrico subsecuente. Ellos concluyen con estos resultados que esto se puede deber a que la CI está implicada en el procesamiento de un estímulo novedoso y por tanto, la lesión en la CI inhabilita este reconocimiento.

## 2.5 FUNCIÓN COLINÉRGICA CORTICAL EN LA MEMORIA DEL SABOR

El papel que juega la actividad colinérgica en torno a la memoria del sabor ha sido ampliamente estudiada ya que se sabe que la acetilcolina (ACh) está implicada en procesos de atención, procesamiento de información sensorial y su asociación, modula cambios plásticos en la corteza auditiva y somatosensorial (Mesulam MM, 1990; Inglis *et al.*, 1994; Sarter y Bruno, 1994; Giovannini *et al.*, 2001; Metherate y Ashe, 1993; Dykes *et al.*, 1990).

La acetilcolina (ACh) es una molécula orgánica cuya fórmula es  $C_7NH_{16}O_2^+$  y en diferentes organismos funge como neurotransmisor y neuromodulador. La acetilcolina es sintetizada a partir de la colina y el acetyl-CoA mediante la enzima colina acetiltransferasa (ChAT). La fuente principal de ACh en la corteza proviene de neuronas en el NBM<sup>7</sup> (Mesulam, 1986). Se ha mostrado que lesiones en el NBM impiden la habilidad de adquirir el CAS pero no así la evocación (Miranda y Bermúdez-Rattoni, 1999; Gonzalez *et al.*, 2000).

---

<sup>7</sup> El NBM es un grupo de células localizadas en el Prosencéfalo. Las células colinérgicas en el prosencéfalo basal proveen la mayor cantidad de fibras colinérgicas aferentes a toda la neocorteza, el Hipocampo, la amígdala y el bulbo olfatorio.

Se ha observado que la acetilcolina en la corteza insular tiene la función de señalar un estímulo gustativo novedoso (Miranda *et al.*, 2000). Un estímulo gustativo novedoso induce una rápida y elevada actividad colinérgica en la corteza insular que decrece a medida que el estímulo, luego de varias presentaciones, se vuelve familiar (Fig. 8)

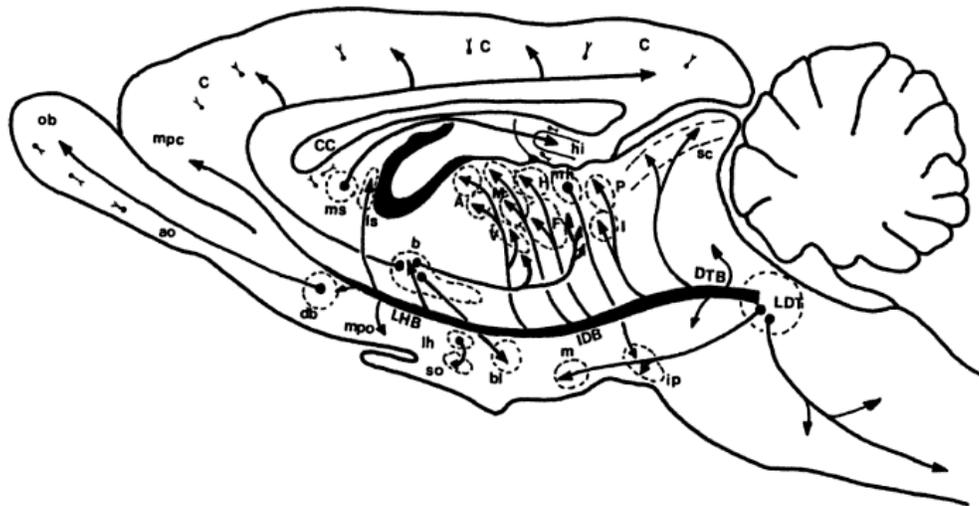


Figura 7. Vista sagital de los principales grupos de células colinérgicas y sus proyecciones en el SNC de la ratona. Abreviaciones: A, núcleo anterior del tálamo; ao, núcleo anterior olfatorio; b, núcleo basal; bl, amígdala basolateral; C, corteza cerebral; CC, cuerpo calloso; db, banda diagonal; DTB, núcleo tegmental dorsal; F, núcleo parafascicular del tálamo; H, núcleo lateral habenuar; hi, hipocampo; I, núcleo interestital magnocelular de la comisura posterior; IDB, núcleo diencefálico intermedio; ip, núcleo interpeduncular; LDT, núcleo tegmental laterodorsolateral; lh, hipotálamo lateral; LHB, núcleo hipotalámico lateral; Is, séptum lateral; m, núcleo mamilar lateral; M, núcleo talámico medial; mpc, corteza prefrontal medial; mpo, núcleo preóptico magnocelular; ms, septum medial; ob, bulbo olfatorio; P, área pretectal anterior; sc, colículo superior; so, núcleo supraóptico; V, núcleo talámico ventromedial. Martínez-Murillo y Rodrigo, 1995.

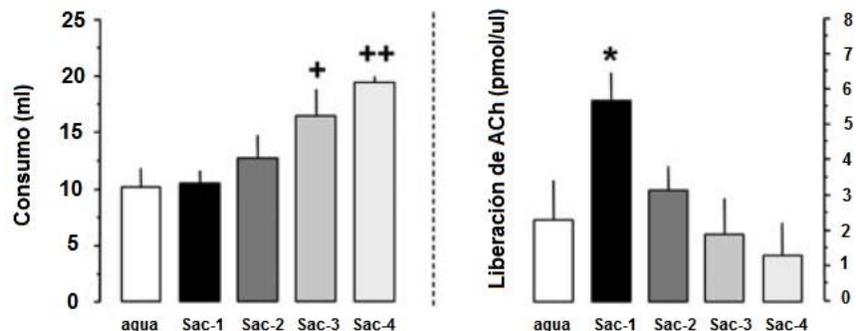


Figura 8. Efecto de la presentación sucesiva de una solución de sacarina (0.1%) sobre la liberación de acetilcolina en la corteza insular. En la gráfica de la izquierda se observa cómo el consumo de la solución de sacarina aumenta al paso de los días por un efecto de atenuación a la neofobia. En la gráfica de la derecha se puede apreciar un aumento significativo en la liberación de ACh en la corteza insular durante el primer día en el cuál las ratas tienen acceso a la sacarina. A medida en que el sabor se hace familiar para los sujetos esta liberación disminuye (Modificado de Miranda *et al.*, 2000).

En base a su selectividad farmacológica, se han identificado dos clases principales de receptores a ACh: los receptores nicotínicos (nAChR) y los muscarínicos (mAChR). Los nicotínicos son receptores de tipo ionotrópico mientras que los muscarínicos son metabotrópicos. Ambos tipos se encuentran en el sistema nervioso central (SNC) y en el sistema autónomo. Los receptores nicotínicos además se pueden encontrar en la placa neuromuscular (receptores N1). Los nAChR es un complejo de proteína transmembranal que se compone de 5 subunidades. En el SNC se ha logrado clonar e identificar 12 subunidades (a2-a10 y b2-b4) (Corringer *et al.*, 2000). Los receptores muscarínicos son pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Hasta el momento, se han logrado identificar, tanto para la rata como para el humano, un total de 5 subtipos de receptores muscarínicos (M1 al M5).

Los receptores muscarínicos de ACh son muy importantes para el procesamiento del estímulo novedoso o relevante, particularmente los receptores post-sinápticos (M1 y M3). En 2009, Lin y colaboradores (Lin *et al.*, 2009) demostraron que

lesiones en la CI atenúan la magnitud de la neofobia al sabor pero a medida que se vuelve familiar no se observa un efecto en el consumo. Por otra parte, se ha demostrado con la inyección bilateral de un antagonista muscarínico como la escopolamina<sup>8</sup> en la CI de ratas, que los receptores para ACh son necesarios para el CAS y la atenuación a la neofobia (Naor y Dudai, 1996; Gutierrez *et al.*, 2003). Se ha demostrado también que el bloqueo de los receptores muscarínicos utilizando escopolamina y pirenzepina<sup>9</sup> en la corteza insular antes, pero no después, de la presentación del sabor interrumpe el CAS (Ramírez-Lugo *et al.*, 2003). Esto nos sugiere que los receptores muscarínicos están involucrados en la formación de la memoria del sabor pero no en su evocación.

También se ha mostrado que inyecciones de escopolamina tanto antes como después de la primera presentación de un estímulo gustativo, impiden que se observe este efecto (Naor y Dudai 1996; Gutierrez *et al.*, 2003). En este sentido, se ha mostrado que las inyecciones de escopolamina no interfieren con el CAS si un sabor familiar es utilizado (Berman y Dudai, 2001). Por lo anterior se observa que los receptores muscarínicos parecen tener un papel tanto en la adquisición y como en la consolidación de la memoria del sabor.

Se ha demostrado que la inyección del agonista colinérgico carbacol en la CI promueve una fosforilación de los receptores NR2B, que responde a glutamato, de manera similar a lo observado mediante un sabor novedoso (Rosenblum *et al.*, 1996), lo cual suma evidencia al papel que juega la actividad colinérgica cortical en la detección y codificación de los estímulos gustativos novedosos. Esta fosforilación podría estar mediando la asociación del estímulo gustativo con el visceral al preparar al receptor NR2B para la activación glutamatérgica proveniente de la amígdala (Miranda *et al.*, 2003). Como ya habíamos notado previamente, la actividad glutamatérgica está relacionada con la información visceral y la amígdala proporciona el valor emocional al integrar información gustativa, visceral y del estado interno del organismo.

---

<sup>8</sup> La escopolamina es antagonista para los receptores M<sub>1</sub> al M<sub>4</sub>.

<sup>9</sup> La pirenzepina es antagonista muscarínico para los receptores M1 y M3.

### 2.5.1 - Agonista colinérgico Carbacol

El carbacol (también conocido como carbamilcolina) es una molécula agonista del sistema colinérgico, activa tanto receptores muscarínicos (M1 a M5) como nicotínicos. Su fórmula química es C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El carbacol es un análogo de la acetilcolina no metabolizable, es decir que es resistente a la acción de la acetilcolinesterasa, enzima que degrada la acetilcolina y la transforman en colina y ácido acético (Lau y Haganir, 2006).

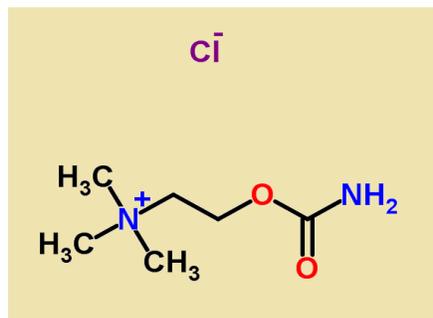


Figura 9. Estructura del agonista colinérgico carbacol.

Si la ACh participa durante la discriminación entre un estímulo novedoso y uno familiar, la inyección de un agonista colinérgico como el carbacol debería emular este efecto. En este sentido, Clark y Bernstein (2009) demostraron que las inyecciones de carbacol en la CI de ratas inducen un condicionamiento aversivo a la sacarina aún cuando el sabor es familiar. Para el estudio se utilizaron ratas Long-Evans macho adultas y el sabor utilizado fue sacarina al 0.5% que se dio por 2 días, 30 minutos solamente.

La interpretación que le dan a los resultados obtenidos es que el carbacol permitió que los animales adquirieran CAS sin importar que fueron pre-expuestas (2 días) a la sacarina. Debido a que el índice de reconocimiento de sabor para los 4 grupos

no sobrepasó de los 4 minutos, descartan que el carbacol pudiera bloquear la evocación de la memoria de la sacarina en vez de imitar la señal colinérgica cortical asociada con el procesamiento de un estímulo novedoso. Los investigadores concluyen que el sistema colinérgico cortical tiene un efecto significativo en la formación de las asociaciones entre estímulos condicionados e incondicionados (Clark y Bernstein, 2009).

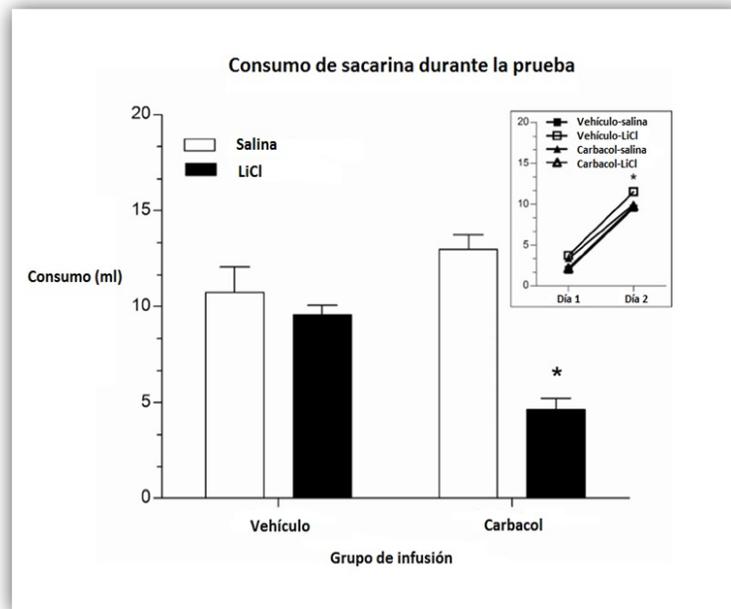


Figura 10. Consumo de sacarina después de la inyección de carbacol. El grupo Carbacol-LiCl disminuyó significativamente el consumo de sacarina (0.5%) con respecto a los otros tres grupos. A pesar de dos días de pre-exposición, el efecto de la inhibición latente no fue observado en el grupo carbacol-LiCl. Este resultado indica que el carbacol, al ser un agonista colinérgico, emuló los efectos de la ACh que está guiando la novedad, interfiriendo con la memoria formada durante la pre-exposición al mismo estímulo (Modificado de Clark y Bernstein, 2009).

### 3- JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que los sabores dulces debido a su valor hedónico positivo generan una mayor preferencia de consumo, y en particular, se sabe que las ratas aprenden a preferir aquellos que conllevan un aporte energético (Capaldi, 1992; Sclafani 1990; Ackroff y Sclafani, 1991; Myers y Sclafani, 2006). A pesar de estas evidencias, poco se conoce acerca del papel que juega un consumo crónico y prolongado de sabores altamente apetitivos en la memoria de preferencia al sabor y su efecto en posteriores y nuevos aprendizajes con los mismos estímulos gustativos. De tal forma, buscamos evaluar el consumo crónico de dos soluciones dulces con y sin contenido calórico (sacarosa y sacarina) y determinar si el aporte energético tiene un efecto diferencial en la forma en cómo los animales aprenden una condición aversiva y posteriormente re-aprenden durante la extinción de la aversión adquirida.

Por otra parte, la corteza insular (CI) es una estructura que ha sido relacionada con la memoria del sabor al estar localizada en ella la corteza gustativa (CG) pero también está involucrada con las otras modalidades sensoriales. Se sabe que durante la formación de la memoria gustativa, el sistema colinérgico en la CI está guiando la señalización de la relevancia del estímulo; se ha observado que el nivel de ACh en la CI se incrementa en respuesta a un sabor novedoso y disminuye gradualmente a medida de que el estímulo se vuelve familiar (Miranda *et al.*, 2000).

Los receptores muscarínicos parecen tener un papel tanto en la adquisición y como en la consolidación de la memoria del sabor (Naor y Dudai 1996; Gutierrez *et al.*, 2003; Berman y Dudai, 2001). La activación de los receptores muscarínicos es capaz de emular el señalamiento como novedoso de un estímulo gustativo

hedónico pero sin contenido calórico que ha sido pre-expuesto (Clark y Bernstein 2009). De tal forma, consideramos que es relevante evaluar el impacto que tienen diferentes grados de pre-exposición a un sabor altamente apetitoso como la sacarosa, para conocer si el consumo crónico cambia de forma significativa la actividad colinérgica cortical y la regulación de la novedad y familiaridad de los estímulos.

## 4- HIPÓTESIS

1. Los sabores dulces con aporte energético (sacarosa) inducen mayor preferencia de consumo que aquellos que no lo tienen (sacarina).

2. El consumo crónico (14 días) de sacarosa inducirá una mayor inhibición latente del CAS y acelerará el proceso de extinción de la aversión.

3. La inyección del agonista colinérgico carbacol, antes de la adquisición de un nuevo aprendizaje aversivo (CAS), disminuirá la inhibición latente producida por el consumo crónico previo (14 días).

4. Posterior a un consumo crónico (14 días) de sacarosa, la inyección del agonista colinérgico carbacol antes de la adquisición del CAS modificará el re-aprendizaje durante la extinción.

## 5- OBJETIVOS

1. Comparar la preferencia del consumo entre sabores dulces con diferente contenido calórico.

2. Evaluar la intensidad de la inhibición latente del CAS inducida por el consumo crónico de sabores dulces con diferente contenido calórico así como evaluar la extinción de la aversión.

3. Inyectar el agonista colinérgico carbacol en la CI antes de la adquisición del CAS y evaluar su efecto en esta prueba luego de un consumo crónico de sacarosa.

4. Inyectar el agonista colinérgico carbacol en la CI antes de la adquisición del CAS y evaluar su efecto durante la extinción.

## 6- SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 – SUJETOS

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con pesos entre 270-320 g para el Experimento 1 (objetivos 1 y 2) y entre 340-360 g para los Experimentos 2 (objetivos 3 y 4) y 3 (objetivo adicional, estudio de ansiedad). Los animales se colocaron en cajas individuales dentro de *vivarium* del laboratorio a una temperatura de 22.5°C y bajo un ciclo de luz invertida (12 h luz, 12 h oscuridad) por un período de 7-8 días<sup>10</sup>. Todas las manipulaciones se realizaron durante el período de oscuridad del ciclo. Los métodos usados en los animales han sido aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM; siguiendo los lineamientos del buen manejo y ética experimental aplicados internacionalmente y lo establecido en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Los sujetos tuvieron acceso *ad libitum* al alimento sólido (pellets) durante todos los experimentos. Los sujetos estuvieron en privación de líquido por 24 h para poder observar el aspecto motivacional del consumo (respuesta a un déficit), esto durante todas las fases del experimento salvo por las etapas de Aclimatación, Consumo Crónico y Recuperación de la cirugía, esto debido a los objetivos particulares que se detallarán en su sección correspondiente.

### 6.2 – MÉTODOS

A continuación se detallan los métodos generales que se utilizaron durante todo el proyecto, los detalles acerca de los grupos y dosis de las sustancias se pueden encontrar en la sección correspondiente a cada Experimento.

---

<sup>10</sup> Período de Aclimatación.

### 6.2.1 - Línea base

La línea base de consumo de agua tuvo como objetivo estabilizar el consumo de líquido de las dos probetas. Luego del período de aclimatación y una privación de líquido de 24 h, a cada sujeto se le presentaron dos probetas graduadas de 50 ml con 20 ml de agua, las cuáles fueron intercambiadas de posición (derecha-izquierda) cada 2 min en un tiempo total de acceso de 20 min (único período de acceso a líquidos por día). El objetivo de este intercambio constante de probetas es para garantizar que los sujetos se familiaricen con este método de “probeteo” y que en la fase de Preferencia el consumo de cada probeta refleje verdaderamente la preferencia de un sabor sobre otro. Se registraron los consumos correspondientes a cada probeta en la bitácora (con incertidumbre de  $\pm 0.5$  ml).

### 6.2.2 – Preferencia

Se realizó la prueba de preferencia al sabor para poder comparar y evaluar la diferencia entre el consumo de sabores dulces y el del agua. Se les presentaron dos probetas graduadas de 50 ml, una con 20 ml de la solución de sabor (sacarina o sacarosa) y la otra con 20 ml de agua. Las probetas fueron intercambiadas de posición (derecha-izquierda) cada dos minutos en un tiempo total de 20 min. Se registraron los consumos de cada probeta en la bitácora (con incertidumbre de  $\pm 0.5$  ml).

### 6.2.3 – Consumo crónico

Durante 14 días los animales pudieron consumir *ad libitum* líquido (agua, solución de sacarosa al 10% o solución de sacarina al 0.1%) dependiendo de su grupo. Se midió diariamente la masa correspondiente al volumen de líquido ingerido y la masa de las ratas. Con respecto al alimento, los sujetos tenían acceso a 50g de alimento sólido (pellets), cada 24 h se tomaba registro del alimento sólido

consumido y nuevamente se reajustaba a 50g, esto para facilitar el control del volumen de alimento al que tenían acceso todos los sujetos. Todas las mediciones se realizaron en un intervalo de tiempo entre las 12 y las 13 h todos los días.

#### 6.2.4 – Cirugía

El día 14 del consumo crónico los animales fueron anestesiados con una solución de ketamina (70 mg/kg) y xilacina (6 mg/kg), de la cual se aplicó 1 ml/kg de peso i.p. Una vez anestesiados los animales se procedió a implantar cánulas bilaterales en la CI. Las coordenadas utilizadas fueron AP = 1.2 mm, L=  $\pm 5.5$  mm y V= -3mm desde bregma (Paxinos y Watson, 2004). Las cánulas fueron fijadas al cráneo con dos tornillos y cemento acrílico dental.

Se dejó pasar un período de recuperación de 3 días después de la cirugía. Durante el período de recuperación, a los animales que recibieron la solución de sacarosa durante el consumo crónico se les colocaron dos bebederos (uno con agua y otro con solución de sacarosa) con el objetivo de que no interrumpieran su consumo.

#### 6.2.5 – Inyección intracerebral

Se inyectó a los sujetos con una solución de carbacol o salina<sup>11</sup> utilizando una bomba de inyección durante 1 min. El día de la adquisición del CAS, las inyecciones se administraron 20 min antes de la presentación de las probetas (agua y solución de sacarosa).

---

<sup>11</sup> Dependiendo del grupo experimental (ver 6.4.1).

## 6.2.6 – CAS

Para evaluar la capacidad de formar una nueva memoria del sabor dulce altamente habituado, se realizó un nuevo aprendizaje asociativo-aversivo mediante el CAS.

### 6.2.6.1 CAS con una probeta

El día de la adquisición del CAS, se presentó una probeta graduada de 50 ml con 40 ml<sup>12</sup> de la solución de sabor dulce (sacarina o sacarosa) por 20 min. Treinta minutos después del consumo, se inyectaron 3 ml de solución de LiCl 0.3 M, i.p., para simular un efecto de irritación gástrica aversiva. Veinticuatro horas después se realizó la prueba de evocación del CAS, presentando nuevamente la solución de sabor por 20 min. Debido a que el consumo crónico del sabor dulce produce inhibición latente, se procedió con varias sesiones de re-aprendizaje del CAS hasta que los animales presentaron una disminución menor a los 4 ml. De tal forma, si 24 h después (prueba del CAS) los animales aún presentaban un consumo mayor a 4 ml del sabor dulce, se les inyectó nuevamente 3 ml de solución de LiCl al 0.3 M. Se continúa procedimiento de re-aprendizaje hasta que los animales presenten consumos menores o iguales a 4 ml. En total, las ratas recibieron un máximo de 3 ensayos de CAS.

El protocolo de CAS con una probeta es utilizado para discriminar aversiones fuertes (Batsell y Best, 1993). Este protocolo de CAS con una probeta se utilizó para el Objetivo 2 (Experimento 1) ya que se buscaba comparar la inhibición latente entre las dos soluciones (con y sin contenido calórico) y así determinar con qué sabor realizar las manipulaciones farmacológicas con carbacol (Experimento 2).

---

<sup>12</sup> Al ser sólo una probeta durante este protocolo, se incrementó el volumen de agua para igualar la cantidad presentada en la línea base y la fase de preferencia (20 ml en cada probeta, 40 ml en total).

### 6.2.6.2 CAS con dos probetas

El protocolo de CAS a dos probetas se utilizó para los objetivos 3 y 4 (Experimento 2) debido a que se consideró que se debería dar a los sujetos la posibilidad de elegir entre el agua y la solución de sacarosa. El día de la adquisición del CAS, a cada sujeto se le presentaron dos probetas graduadas (capacidad de 50 ml), una de ellas con un volumen de 30 ml de agua y la otra con el mismo volumen pero de la solución de sacarosa. Las probetas fueron intercambiadas (derecha/izquierda) cada dos minutos, teniendo un consumo total de 20 min. Treinta minutos después del consumo, se inyectaron 3 ml de solución de LiCl 0.3 M, i.p., para simular un efecto de irritación gástrica aversiva. Veinticuatro horas después se realizó la prueba de evocación del CAS, se presentaron nuevamente las dos probetas durante 20 minutos (utilizando el mismo protocolo de intercambio de probetas). Se repitió este procedimiento de re-aprendizaje por dos días más (el número total ensayos de CAS fue de tres).

### 6.2.7 – Extinción

Los sujetos continuaron con la privación de líquido se les presentó una probeta con el sabor (solución de sacarosa o de sacarina) durante un período de 20 min después de 24, 48 y 72 h de su último ensayo del CAS. Se registraron los consumos de las soluciones durante los tres días de esta fase de extinción.

### 6.2.8 – Histología

Los animales de los grupos de farmacología fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital (113 mg/kg) y perfundidos intracardialmente con una solución salina isotónica (0.9%). Los cerebros fueron removidos y colocados en una

solución de formaldehído al 10% por una semana. Posteriormente, se cambiaron a una solución de sacarosa al 60% durante una semana. Finalmente, fueron cortados en secciones coronales de 50  $\mu\text{m}$  usando un crióstato.

### 6.2.9 – Prueba de ansiedad

Se ha propuesto que una dieta de soluciones dulces produce un efecto de dependencia y cuando se tiene un acceso intermitente a estas soluciones dulces se observa un efecto de abstinencia similar a la registrada con opiáceos (Colantuoni *et al.*, 2002). Una forma como Colantuoni y colaboradores observan estos síntomas de abstinencia en ratas con un consumo crónico de glucosa es utilizando una prueba de laberinto en cruz elevado. A menor tiempo que los animales pasan en el brazo abierto se piensa que mayor es su ansiedad, componente importante del síndrome de abstinencia (Colantuoni *et al.*, 2002; Avena *et al.*, 2008)

Debido a que estas evidencias indican que la restricción del consumo de sabores con componentes hedónicos puede inducir un aumento en la ansiedad, como un objetivo adicional se decidió realizar un experimento extra para evaluar el efecto que producía nuestro protocolo al tener un consumo crónico de la solución de sacarosa por 14 días y posteriormente restringiendo su consumo de esta a sólo 20 min diarios (*i.e.* etapa de preferencia, CAS y extinción).

La prueba de laberinto en cruz consistió en colocar a los animales individualmente en el centro del laberinto y tomar el tiempo que pasaron en los brazos abiertos con sus 4 patas. El tiempo total de exploración fue de 5 min. Se contabilizaron el número de cruces, caídas y si se presenta micción o defecación como observaciones cualitativas de ansiedad.

## 6.3 – EXPERIMENTO 1, OBJETIVOS 1 Y 2: CONSUMO DE SABORES DULCES CON DIFERENTE CONTENIDO CALÓRICO

El protocolo se muestra en la Figura 11. Este protocolo contempla los Objetivos 1 y 2: Se compara la preferencia del consumo entre sabores dulces con diferente aporte energético (Objetivo 1) y se evalúa la intensidad de la inhibición latente del CAS así como la extinción de la aversión después del consumo crónico de los sabores (Objetivo 2).

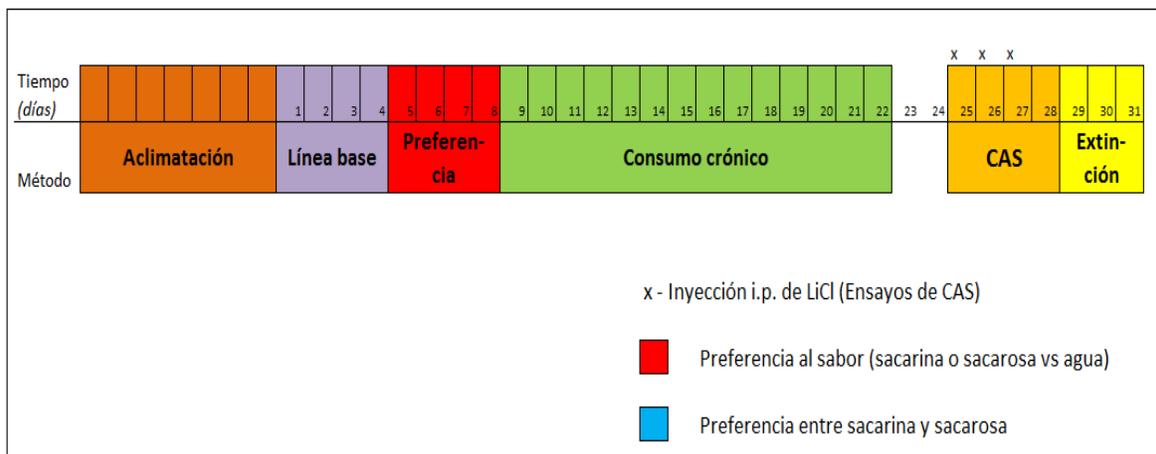


Figura 11. Protocolo general del estudio del efecto del consumo crónico de sacarina y sacarosa (Objetivos 1 y 2). Inicio del período de **aclimatación** donde los animales se habitúan al ciclo invertido de luz del *vivarium* del laboratorio. Posteriormente inicia la **línea base** para la estabilización de los consumos de agua; después se evalúa la **preferencia al sabor** (entre agua y la solución de sabor). La fase de **consumo crónico** tiene una duración de 14 días y cada día se evalúa el consumo de líquido, comida sólida y la masa de los sujetos. Por último se realiza el **CAS** y finalmente la prueba de **extinción** de la aversión.

### 6.3.1 - Grupos experimentales

El protocolo se realizó con dos sabores de diferente contenido calórico (dos grupos independientes):

*Sacarina*: Edulcorante sin carga calórica, se utilizó en todos los experimentos a una concentración de al 0.1% (Sigma, St. Louis, MO).

*Sacarosa*: Disacárido (glucosa-fructosa) altamente disponible en alimentos naturales (aporte energético de 3.9 kcal/gr), se utilizó en todos los experimentos a una concentración de 10% (Sigma, St. Louis, MO).

Los animales de cada grupo (sacarina o sacarosa) fueron divididos a su vez en los siguientes grupos: Control, agudo y crónico.

1. El *grupo control* se mantuvo con agua durante la preferencia al sabor y durante los 14 días de consumo crónico.
2. El *grupo agudo* durante la fase de preferencia al sabor recibió exclusivamente la solución de sacarina o sacarosa en una probeta y en la otra agua. Se mantuvo con agua *ad libitum* durante el consumo crónico.
3. El *grupo crónico* durante la preferencia al sabor recibió exclusivamente la solución de sacarina o sacarosa en una probeta y en la otra agua. Durante el consumo crónico recibió exclusivamente la solución de sacarina o sacarosa *ad libitum*.

Las fases de CAS y Extinción fueron iguales para los tres grupos.

MÉTODO	GRUPOS					
	SACARINA			SACAROSA		
	Control	Agudo	Crónico	Control	Agudo	Crónico
<b>Aclimatación</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Línea base</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Preferencia al sabor</b>	No	Si	Si	No	Si	Si
<b>Consumo crónico</b>	Agua	Agua	Solución de sacarina	Agua	Agua	Solución de sacarosa
<b>CAS</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Extinción</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si

Tabla 1. Resumen de los grupos experimentales del protocolo de los Objetivos 1 y 2 y sus métodos particulares.

#### 6.4 – EXPERIMENTO 2, OBJETIVOS 3 Y 4: EFECTO DE LA INYECCIÓN DE CARBACOL EN LA CORTEZA INSULAR SOBRE LA CONDUCTA

Una vez establecidos los efectos conductuales del consumo crónico de sabores dulces (sacarina y sacarosa) y haber determinado que el contenido calórico tiene un impacto mayor, se evaluó el efecto del carbacol (agonista colinérgico) utilizando solamente un consumo crónico de la solución de sacarosa.

El protocolo farmacológico se muestra en la Figura 12. Este protocolo contempla los Objetivos 3 y 4: Después de un consumo crónico de una solución de sacarosa, se inyectó el agonista colinérgico carbacol antes de la adquisición del CAS y se evaluó su efecto en esta prueba (Objetivo 3) y durante la extinción (Objetivo 4). Los experimentos conductual (Experimento 1) y farmacológico (Experimento 2) se llevaron a cabo con grupos independientes.

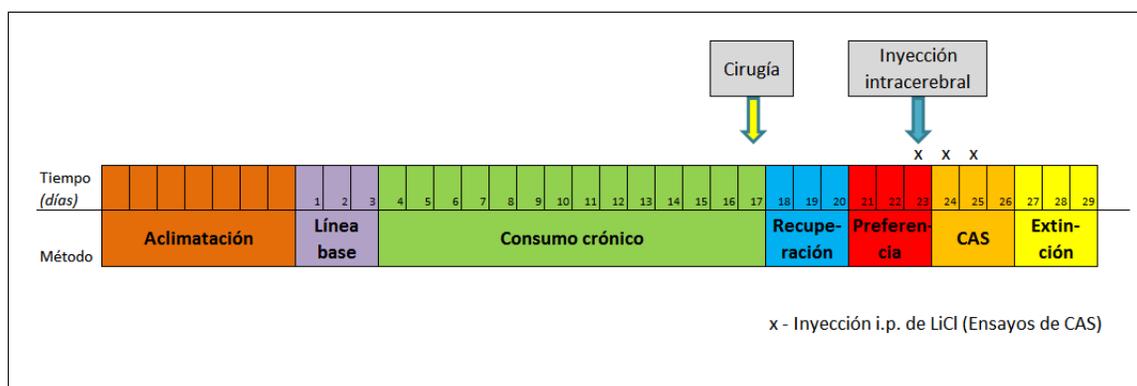


Figura 12. Protocolo farmacológico general (Objetivos 3 y 4). Inicio del período de aclimatación donde los animales se habitúan al ciclo invertido de luz del *vivarium* del laboratorio. Se inicia con la **línea base** para que los animales establezcan sus consumos de agua. Posteriormente continúa el **consumo crónico**. El día 14 del consumo crónico se realiza la **cirugía** a todos los animales canulando bilateralmente en CI. Tras tres días de recuperación se evalúa la **preferencia** entre agua y la sacarosa durante 3 días. En el día 3 de la preferencia al sabor se realiza la **inyección** intracerebral (carbacol o vehículo) 20 min antes de la tercera presentación de las dos probetas (agua/sacarosa). Se continúa con la adquisición del **CAS** a través de una inyección i.p. de LiCl, 30 minutos después de haber terminado el consumo. El protocolo de CAS se repite por dos días más (3 ensayos de CAS en total). Posteriormente se realiza el protocolo de extinción de la aversión (3 días).

### 6.4.1 - Grupos experimentales

La concentración de sacarosa utilizada durante todo el protocolo es de 10% (Golden Bell reactivos, Mex).

Al principio del experimento, los animales fueron divididos en tres grupos: control, agudo y crónico.

1. El *grupo control* consumió agua *ad libitum* durante el consumo crónico y durante la fase de preferencia al sabor recibieron solamente agua.
2. El *grupo agudo* consumió agua *ad libitum* durante el consumo crónico y durante la fase de preferencia al sabor recibió una solución de sacarosa en una probeta y en la otra agua.
3. El *grupo crónico* recibió una solución de sacarosa durante la fase de consumo crónico y durante la fase de preferencia al sabor recibió una solución de sacarosa en una probeta y en la otra agua.

### *Inyecciones*

Para las inyecciones intracerebrales los animales fueron divididos en 6 grupos; control-salina (Control-VEH), control-carbacol (Control-CARB), agudo-salina (Agudo-VEH), agudo-carbacol (Agudo-CARB), crónico-salina (Crónico-VEH) y crónico-carbacol (Crónico-CARB).

1. Grupo control-salina, agudo-salina y grupo crónico-salina: Recibieron 0.5  $\mu$ l de solución salina isotónica (0.9%) durante 1 min.
2. Grupo control-carbacol, agudo-carbacol y crónico-carbacol: Recibieron 0.5  $\mu$ l de solución de carbacol (disuelta en salina isotónica a una concentración de 50  $\mu$ M) durante 1 min.

Los seis grupos tuvieron el mismo tratamiento durante el protocolo de CAS (inyección i.p. de LiCl 0.3M) y la extinción.

MÉTODO	GRUPOS					
	Control		Agudo		Crónico	
	VEH	CARB	VEH	CARB	VEH	CARB
<b>Aclimatación</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Línea base</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Consumo crónico de sacarosa</b>	No	No	No	No	Si	Si
<b>Preferencia a la sacarosa</b>	No	No	Si	Si	Si	Si
<b>Inyección intracraneal</b>	Vehículo	Carba- col	Vehícu- lo	Carba- col	Vehícu- lo	Carba- col
<b>CAS</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Extinción</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si

Tabla 2. Resumen de los grupos experimentales del protocolo de los Objetivos 3 y 4 y sus métodos particulares. VEH: Vehículo, CARB: Carbacol.

## 6.5 – EXPERIMENTO 3, OBJETIVO ADICIONAL: ESTUDIO DE ANSIEDAD

Este estudio tuvo como finalidad evaluar si el retiro de un consumo de sacarosa aumentó la ansiedad de los animales durante el protocolo del Experimento 2. Se utilizó el mismo protocolo que el de los Objetivos 3 y 4 con la variante de que los animales no fueron canulados. La Figura 13 muestra el protocolo general para este experimento.

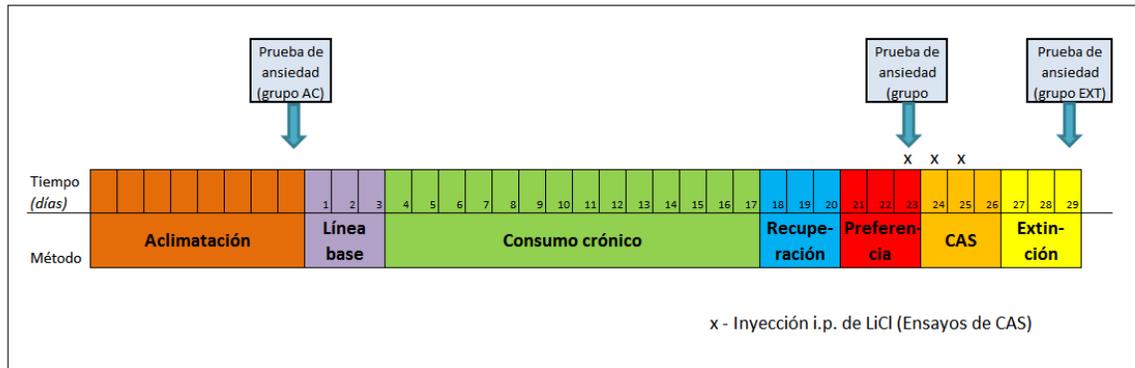


Figura 13. Protocolo general del estudio de ansiedad. El protocolo es el mismo que el utilizado para el experimento 2 con la diferencia de que a estos grupos no se les canuló por medio de una cirugía y por tanto tampoco recibieron inyección intracerebral. Durante la aclimatación los sujetos se habitúan al ciclo invertido de luz del *vivarium* del laboratorio. Se inicia con la **línea base** para que los animales establezcan sus consumos de agua. Posteriormente continúa el **consumo crónico**. En la fase correspondiente a recuperación de la cirugía (Experimento 2), a los grupos control se les mantiene con un bebedero con agua *ad libitum* y a los del grupo crónico se les presentan dos bebederos (agua y solución de sacarosa), esto con el objetivo de mantener el mismo número de días que en el protocolo del Experimento 2. Tras este período de tres días se evaluó la **preferencia** entre agua y la solución de sacarosa durante 3 días. En el día 3 de la preferencia al sabor se les administró una inyección i.p. de LiCl, 30 minutos después de haber terminado el consumo (Adquisición del CAS). El protocolo de CAS se repite por dos días más (3 ensayos de CAS en total). Posteriormente se realiza el protocolo de extinción de la aversión (3 días). Las pruebas de ansiedad (laberinto en cruz elevado) se realizaron en grupos independientes, al Grupo AC se le realizó la prueba el día 8 de aclimatación, al Grupo ADQ se le realizó la prueba el día 3 de

la fase de Preferencia y al Grupo EX se le realizó la prueba al término del experimento, i.e., el día que se evaluó la tercera extinción. Exp 2: Experimento 2.

### 6.5.1 - Grupos experimentales

Las pruebas de ansiedad se realizaron en grupos independientes durante tres tiempos del protocolo:

- Día 8 de aclimatación (grupo AC).
- Día de adquisición del CAS (grupo ADQ): Se realiza la prueba una hora antes de la presentación de las probetas (agua/sacarosa).
- Día 3 de extinción (grupo EXT): Se realiza la prueba una hora antes de la presentación de la probeta con sacarosa.

Cada uno de estos grupos a su vez se divide dependiendo de su consumo en la fase crónica (control: agua, crónico: solución de sacarosa).

1. Control: No tiene pre-exposición a la sacarosa. Recibe por primera vez la sacarosa el día de la adquisición del CAS.
2. Crónico: Sigue el protocolo general de los grupo crónico del Experimento 2. Se mantiene con solución de sacarosa *ad libitum* durante el período de consumo crónico. En el período de recuperación se les proporcionan 2 bebederos (agua y solución de sacarosa) para replicar el protocolo del Experimento 2 aunque estas ratas no fueron canuladas. En el período de preferencia reciben dos probetas (agua/ solución de sacarosa) durante un período de 20 minutos (intercambiando las probetas cada 2 min).

MÉTODO	GRUPOS					
	AC		ADQ		EXT	
	Control	Crónico	Control	Crónico	Control	Crónico
<b>Línea base</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Consumo crónico</b>	Agua	Sacarosa	Agua	Sacarosa	Agua	Sacarosa
<b>Preferencia a la sacarosa</b>	-	-	No	Si	No	Si
<b>CAS</b>	-	-	-	-	Si	Si
<b>Extinción</b>	-	-	-	-	Si	Si

Tabla 3. Resumen de los grupos experimentales del estudio de ansiedad y sus métodos particulares. AC: grupo al que se le realizó la prueba de ansiedad el día 8 de aclimatación. ADQ: grupo al que se le realizó la prueba de ansiedad el día de la adquisición del CAS. EXT: grupo al que se le realizó la prueba de ansiedad el día 3 de extinción (día final).

## 7- RESULTADOS

### 7.1 – OBJETIVO 1: COMPARACIÓN DE LA PREFERENCIA DE CONSUMO ENTRE SABORES DULCES CON CONTENIDO CALÓRICO

#### 7.1.1 – Preferencia al sabor dulce

En la Figura 14 se muestra el porcentaje de consumo del sabor (sacarina o sacarosa) con respecto al total consumido (consumo de agua más consumo del sabor). Los datos se analizaron utilizando una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas y la prueba de comparaciones múltiples *Holm-Sidak*. El ANOVA mostró un efecto significativo de las interacciones entre los grupos y los días ( $F_{3,138} = 30.97$ ,  $p < 0.001$ ), un efecto debido a la sesión ( $F_{3,138} = 37.82$ ,  $p < 0.001$ ) pero no se encontró efecto significativo en el tratamiento ( $F_{1,46} = 11.029$ ,  $p = 0.002$ ). La prueba post hoc reveló que en los días 2 y 3 del protocolo de preferencia, el grupo al que se le dio a preferir entre una solución con sacarosa y agua consumieron un porcentaje mayor de esta solución con respecto a los sujetos a quienes se les dio a preferir entre una solución de sacarina y agua. En los días 3 y 4 no se encontraron diferencias en el porcentaje de consumo del sabor dulce.

## Preferencia al sabor dulce

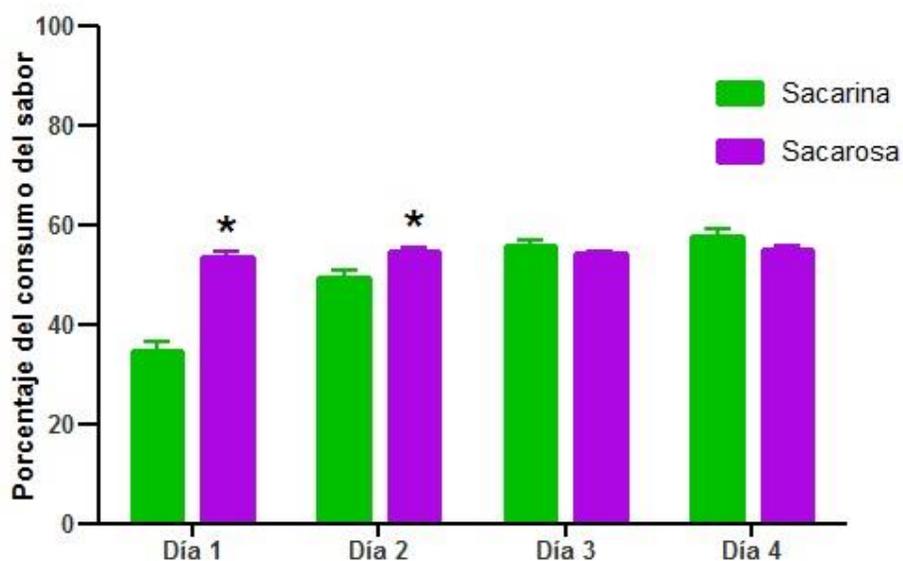


Figura 14. Fase de preferencia al sabor (sacarina o sacarosa). En el eje de las ordenadas se muestra la media + SEM del consumo de los grupos en forma de porcentaje de consumo del sabor (sacarina o sacarosa) con respecto al total consumido (consumo de agua más consumo del sabor). Los días 1 y 2 de preferencia al sabor dulce, el grupo al que se le dio a preferir entre la solución de sacarosa y agua consumieron un porcentaje mayor de la solución de sacarosa con respecto al grupo al que se le dio a preferir entre la solución de sacarina y agua. \* $p < 0.001$ . ANOVA de dos vías de medidas repetidas, prueba post hoc Holm-Sidak.

### 7.1.2 – Consumo crónico

#### 7.1.2.1 – Efecto en el consumo de líquido

En la Figura 15 se muestra el consumo del sabor (sacarina o sacarosa) durante la fase de consumo crónico. Los datos se analizaron utilizando una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas y la prueba de comparaciones múltiples *Holm-Sidak*. El ANOVA mostró un efecto significativo de las interacciones entre los grupos y los días ( $F_{65,858} = 4.74$ ,  $p < 0.001$ ), un efecto debido a la sesión ( $F_{13,858} = 7.50$ ,  $p < 0.001$ ) y efecto significativo en el tratamiento ( $F_{5,66} = 17.76$ ,  $p < 0.001$ ). La

prueba post hoc reveló que el grupo con sacarosa (Crónico-Suc) aumentó gradual y significativamente su consumo a partir del día tres.

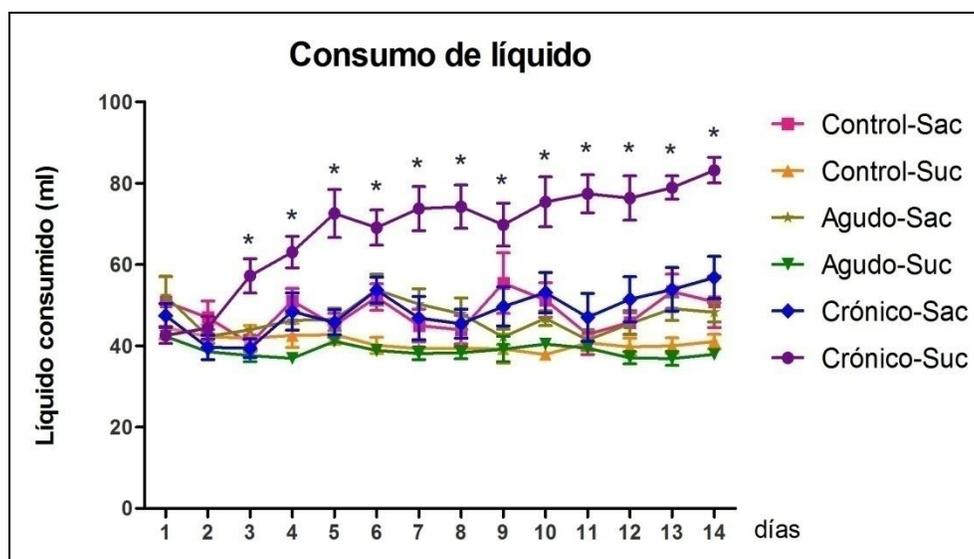


Figura 15. Consumo de líquido durante la etapa de consumo crónico. En el eje de las ordenadas se muestra la media  $\pm$  SEM del consumo de líquido de los grupos. Consumo de agua: Control-Sac, Agudo-Sac, Control-Suc y Agudo-Suc. Consumo de sacarina al 0.1% (Crónico-Sac) y de sacarosa al 10% (Crónico-Suc). El grupo Crónico-Suc incrementó su consumo significativamente a partir del día 3. \* $p < 0.001$ . ANOVA de dos vías de medidas repetidas, prueba *post hoc* Holm-Sidak.

### 7.1.2.2 – Efecto en el consumo de alimento

En la Figura 16 se muestra el consumo alimento sólido cuando se encuentran en un régimen *ad libitum* de un sabor dulce (sacarina o sacarosa). Los datos se analizaron utilizando una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas y la prueba de comparaciones múltiples *Holm-Sidak*. El ANOVA mostró un efecto significativo de las interacciones entre los grupos y los días ( $F_{65,858} = 2.23$ ,  $p < 0.001$ ), un efecto debido a la sesión ( $F_{13,858} = 10.02$ ,  $p < 0.001$ ) y efecto significativo en el tratamiento ( $F_{5,66} = 19.68$ ,  $p < 0.001$ ). Los animales que tenían la solución de sacarosa *ad libitum*, disminuyeron significativamente su consumo de

alimento sólido (pellets) durante todo el período de consumo crónico. No se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento para los animales con agua o sacarina *ad libitum*.

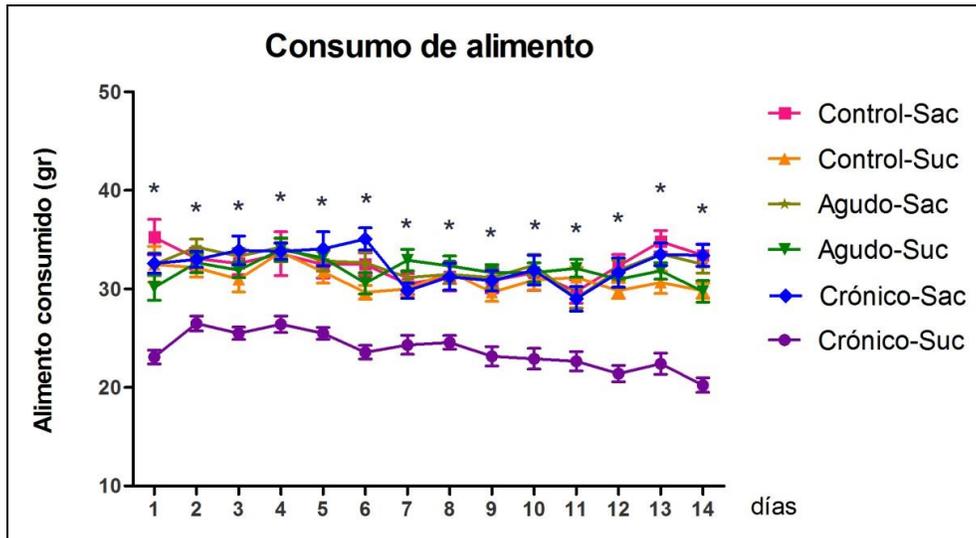


Figura 16. Consumo de alimento sólido (pellets) durante la etapa de consumo crónico. En el eje de las ordenadas se muestra la media  $\pm$  SEM del consumo de alimento sólido (pellets) de los grupos. El grupo Crónico-Suc disminuyó significativamente su consumo de alimento sólido. \*  $p < 0.001$ . ANOVA de dos vías de medidas repetidas, prueba *post hoc* Holm-Sidak. Consumo de agua: Control-Sac, Agudo-Sac, Control-Suc y Agudo-Suc. Consumo de sacarina al 0.1% (Crónico-Sac) y de sacarosa al 10% (Crónico-Suc).

### 7.1.2.3 – Efecto en la ingesta calórica diaria

La Figura 17 muestra la ingesta calórica diaria durante la etapa de consumo crónico. Las calorías ingeridas fueron calculadas como una suma entre las calorías provenientes del alimento y del líquido. El alimento sólido (pellets) aporta 3.36 kcal/gr. Con lo que respecta al líquido, para los grupos que consumieron tanto agua como sacarina se considera solamente el aporte energético provisto por la comida sólida ya que el agua y la sacarina, edulcorante si contenido

calórico, tienen un aporte nulo. Para el grupo Crónico-Sacarosa (Crónico-Suc), además del aporte energético de la comida sólida se calculó el aporte energético provisto por la solución de sacarosa. El aporte energético de la sacarosa es de 3.9 kcal/gr y al ser una solución al 10%, cada ml de la solución contenía 0.1 gr de sacarosa. A partir del día dos no se encontraron diferencias significativas entre el grupo crónico-sacarosa y los otros grupos.

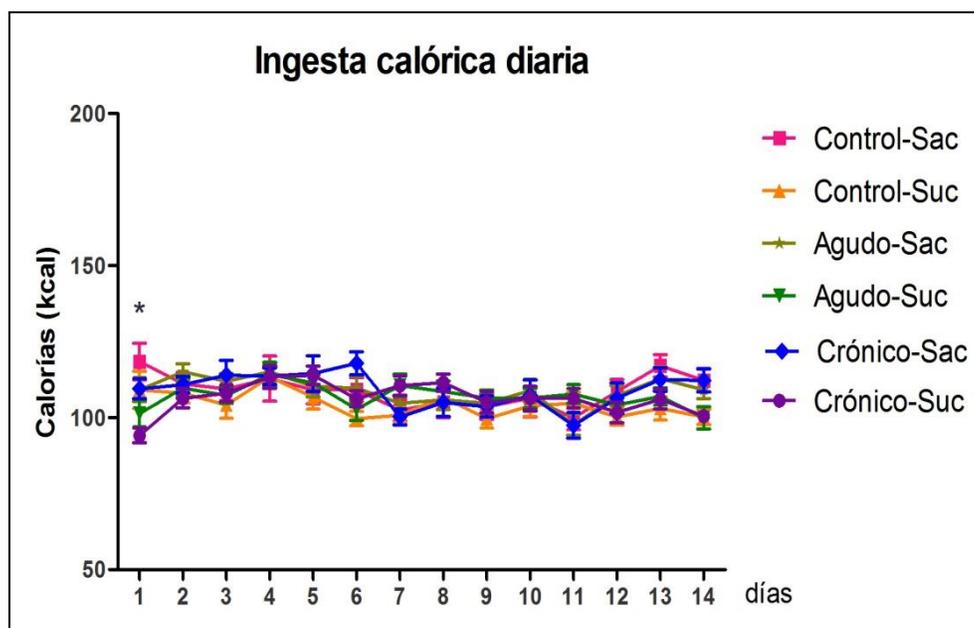


Figura 17. Ingesta calórica diaria durante la etapa de consumo crónico. En el eje de las ordenadas se muestra la media  $\pm$  SEM las calorías ingeridas durante el consumo crónico. Durante el primer día se observan diferencias significativas entre los grupos Control-Sac vs. Crónico-Suc pero a partir del siguiente día la ingesta calórica diaria de todos los grupos es equivalente. \*  $p < 0.001$ . ANOVA de dos vías de medidas repetidas, prueba *post hoc* Holm-Sidak. Consumo de agua: Control-Sac, Agudo-Sac, Control-Suc y Agudo-Suc. Consumo de sacarina al 0.1% (Crónico-Sac) y de sacarosa al 10% (Crónico-Suc).

Los datos se analizaron utilizando una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas y la prueba de comparaciones múltiples *Holm-Sidak*. El ANOVA mostró un efecto significativo de las interacciones entre los grupos y los días ( $F_{65,858} = 2.34$ ,  $p < 0.001$ ), un efecto debido a la sesión ( $F_{13,858} = 7.89$ ,  $p < 0.001$ ) pero no en lo

que respecta al tratamiento ( $F_{5,66} = 0.50$ .  $p=0.77$ ). Durante el primer día se observan diferencias significativas entre los grupos Control-Sac vs. Crónico-Suc pero a partir del siguiente día, la ingesta calórica diaria de todos los grupos es equivalente.

#### 7.1.2.4 – Efecto en el peso

La Figura 18 muestra la ganancia de peso durante la fase de consumo crónico con respecto al día 4 de preferencia (día previo al comienzo de la etapa de consumo crónico). Se observa que aunque los animales con acceso a la sacarosa *ad libitum* (Crónico-Suc) mantuvieron su ingesta calórica diaria de forma similar a los otros grupos, aumentaron de peso significativamente.

Los datos se analizaron utilizando una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas y la prueba de comparaciones múltiples *Holm-Sidak*. El ANOVA mostró un efecto significativo de las interacciones entre los grupos y los días ( $F_{65,858} = 6.97$ ,  $p<0.001$ ), un efecto debido a la sesión ( $F_{13,858} = 741.36$ ,  $p<0.001$ ) y al tratamiento ( $F_{5,66} = 11.39$ .  $p=0.77$ ).

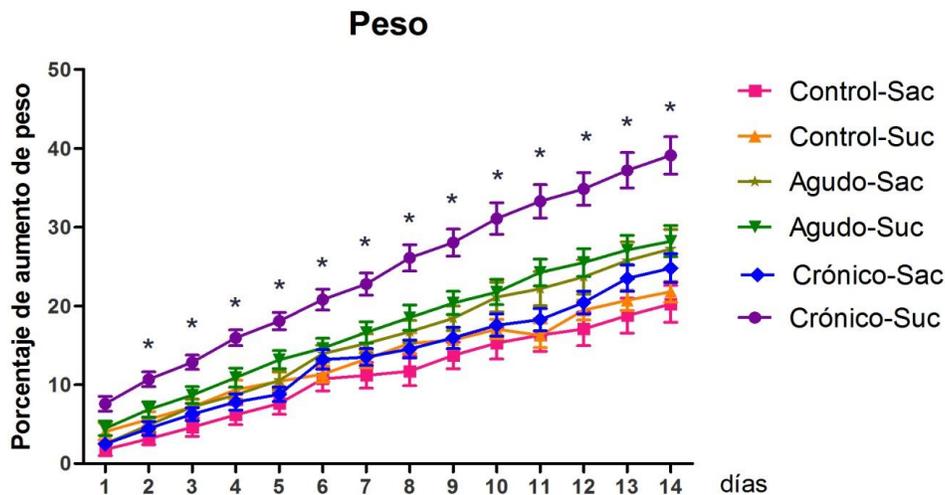


Figura 18. Ganancia de peso durante la etapa de consumo crónico. En el eje de las ordenadas se muestra la media  $\pm$  SEM del porcentaje de aumento de peso con respecto al día 4 de preferencia

(día previo al comienzo de la etapa de consumo crónico). Se observa un aumento en el peso corporal de los animales que consumieron la solución de sacarosa *ad libitum*. \*  $p < 0.001$ . ANOVA de dos vías de medidas repetidas, prueba *post hoc* Holm-Sidak. Consumo de agua: Control-Sac, Agudo-Sac, Control-Suc y Agudo-Suc. Consumo de sacarina al 0.1% (Crónico-Sac) y de sacarosa al 10% (Crónico-Suc).

## 7.2 – OBJETIVO 2: EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN LATENTE DEL CAS Y LA EXTINCIÓN DE LA AVERSIÓN DESPUÉS DE UN CONSUMO CRÓNICO DE SABORES DULCES CON DIFERENTE CONTENIDO CALÓRICO

Se evaluó la inhibición latente del CAS, así como la extinción de la aversión producidas por grupos con diferente grado de familiaridad (grupo control: 0 días de pre-exposición, agudo: 4 días de pre-exposición y crónico 18 días de pre-exposición). Si el día de la prueba del CAS el sujeto no disminuía su consumo de la solución del sabor por debajo de los 4 ml, 30 minutos después del consumo se le volvía a inyectar LiCl y 24 h después era probado nuevamente. El número máximo de ensayos para asegurar el CAS fue de tres.

La figura 19 muestra la primera asociación entre la solución de sabor (sacarina o sacarosa, estímulos condicionados) y la inyección i.p. de LiCl (estímulo incondicionado), esto para los seis grupos. Los datos se analizaron utilizando una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas y la prueba de comparaciones múltiples *Holm-Sidak*. El ANOVA mostró un efecto significativo de la interacción entre los grupos y los días ( $F_{5,132} = 5.410$ ,  $p < 0.001$ ), al tratamiento ( $F_{5,132} = 18.547$ ,  $p < 0.001$ ) y al tiempo ( $F_{1,132} = 185.283$ ,  $p < 0.001$ ).

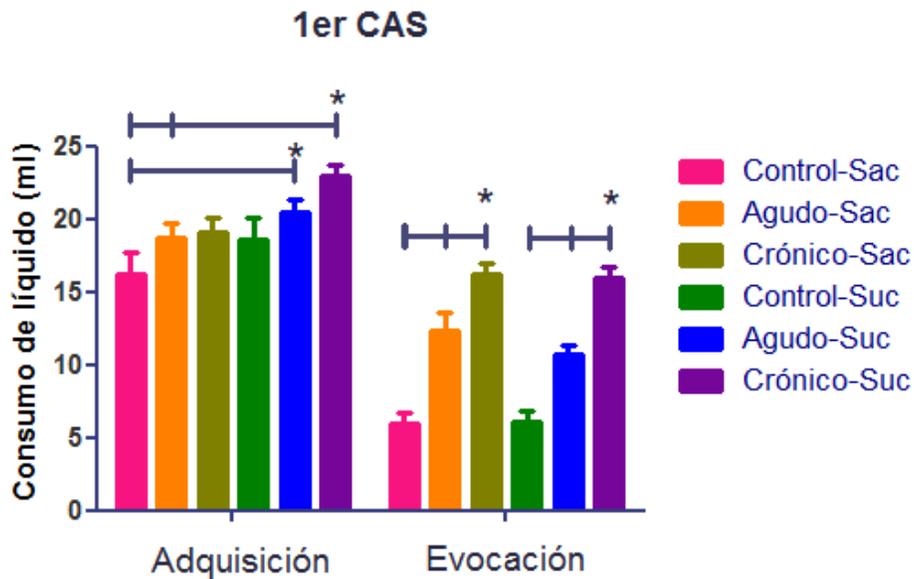


Figura 19. Primer CAS. En el eje de las ordenadas se muestra la media  $\pm$  SEM del consumo de solución de sacarina (Control-Sac n=12, Agudo-Sac n=12, Crónico-Sac n=12) y de sacarosa (Control-Suc=12, Agudo-Suc n=12, Crónico-Suc n=12) durante la primera asociación entre el sabor y la inyección de LiCl. \*  $p < 0.001$ . ANOVA de dos, prueba *post hoc* Holm-Sidak.

Los grupos que requirieron de tres ensayos para reducir el efecto de inhibición latente fueron Agudo-Sac (n=8), Agudo-Suc(n=8), Crónico-Sac (n=12) y Crónico-Suc (n=12). Los datos se analizaron utilizando una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas y la prueba de comparaciones múltiples *Holm-Sidak*. El ANOVA mostró un efecto significativo de la interacción entre los grupos y los días ( $F_{18,216} = 1.95$ ,  $p=0.0135$ ), al tratamiento ( $F_{5,66} = 11.39$ ,  $p=0.77$ ) y al tiempo ( $F = 741.36$ ,  $p<0.001$ ). La prueba *post hoc* reveló que en el día de adquisición del CAS, los consumos de los grupos Crónico-Suc y Crónico-Sac fueron diferentes. En el día dos (prueba 1) se encontraron diferencias significativas entre los grupos Agudo-Suc y Crónico-Suc, y Crónico-Suc y Agudo-Suc. En la Extinción 1 se volvieron a encontrar diferencias ente el grupo crónico-suc y el agudo-sac. Estas diferencias significativas se observaron nuevamente en la tercera extinción.

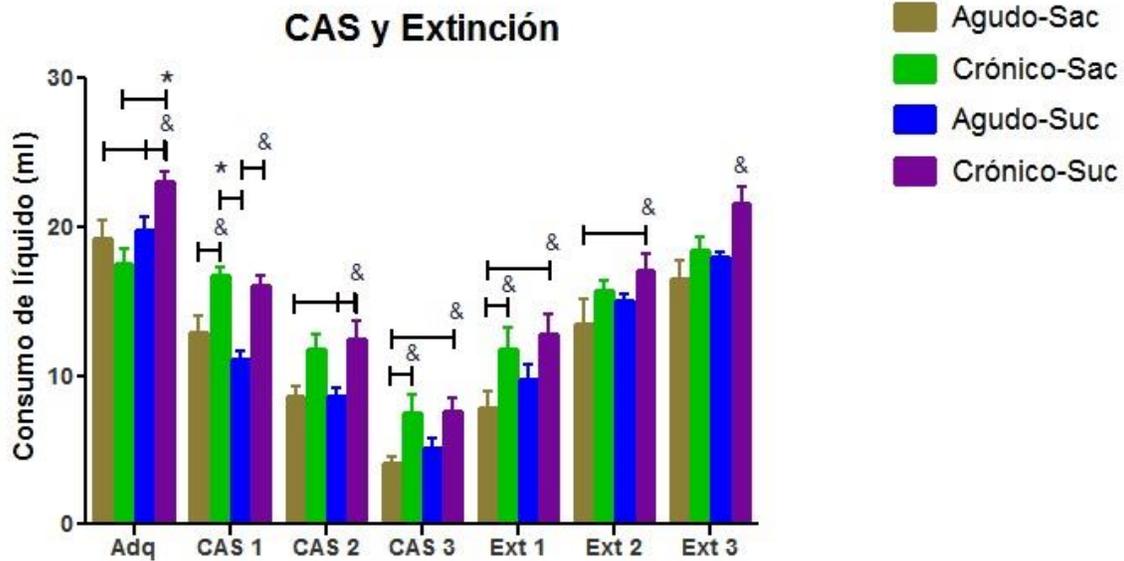


Figura 20. Condicionamiento de aversión al sabor y extinción para la sacarina y sacarosa. (Experimento 1). En el eje de las ordenadas se muestra la media  $\pm$  SEM del consumo de solución de sacarina (Agudo-Sac  $n=8$ , Crónico-Sac  $n=12$ ) y de sacarosa (Agudo-Suc  $n=8$ , Crónico-Suc  $n=12$ ) de los sujetos que recibieron tres ensayos de CAS. \*  $p < 0.001$ . ANOVA de dos vías de medidas repetidas, prueba *post hoc* Holm-Sidak. Adq: Adquisición. CAS: Condicionamiento de aversión al sabor. Ext: Extinción.

En el día de adquisición, cuando se les presentó el sabor y 30 min después se les inyecta el LiCl por primera vez, se observó que el grupo que consumió la solución de sacarosa durante el período crónico (crónico-suc) tiene mayor consumo que el grupo que consumió la de sacarina *ad libitum* durante la etapa crónica (crónico-sac). Si en las pruebas del CAS (CAS 1, CAS 2, CAS 3), los consumos estaban por arriba del 50% del consumo en el día de adquisición, se presenta un efecto de inhibición latente debido a las pre-exposiciones con el sabor y se considera que el sujeto no aprendió. En la primera prueba del CAS (CAS 1) se observó que todos los grupos muestran una inhibición latente pero ésta es más marcada para los grupos crónico (tanto con sacarina como con sacarosa). En la segunda prueba del CAS (CAS 2), se observó que los grupos agudo tanto con sacarina como con sacarosa (agudo-sac y agudo-suc) ya mostraron consumos por debajo de sus

líneas de 50% aunque aún están muy cercanas a ellas (por lo que se realizó una tercera asociación). En las pruebas 2 y 3 (CAS 2 y CAS 3), se observó una tendencia de que los grupos crónicos consumen por arriba de los grupos agudos, de forma similar al CAS 1, pero no se encontraron diferencias significativas. En el período de extinciones, al dejarse de presentar el estímulo aversivo (inyección de LiCl) se espera un aumento gradual en los consumos. En la Extinción 1 (Ext 1), se observó la misma tendencia (consumo mayor de los grupos crónico en comparación a los grupos agudo) pero sólo se observaron diferencias significativas entre el grupo crónico-suc y el agudo-sac. En la Extinción 2 (Ext 2) se mantuvo la tendencia pero no se observó significancia. En la Extinción 3 (Ext 3) se observó que el grupo crónico-suc tuvo un consumo mayor que los otros grupos, alcanzando un valor significativo sólo con el grupo agudo-sac.

### 7.3 – OBJETIVO 3: EFECTO DE LA INYECCIÓN DE CARBACOL EN LA CORTEZA INSULAR DURANTE EL CAS

A diferencia de la prueba de CAS para sacarina y para sacarosa del objetivo 2, en esta ocasión se utilizó un protocolo a dos probetas (una con la solución de sacarosa y otra con agua), por lo que el consumo se presenta en la Figura 21 como porcentaje del consumo de sacarosa con respecto al consumo total (consumo de la solución de sacarosa más el consumo de agua). Los datos se analizaron utilizando una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas y la prueba de comparaciones múltiples *Holm-Sidak*. El ANOVA mostró un efecto significativo de la interacción entre los grupos y los días ( $F_{15,186} = 2.15$ ,  $p=0.0095$ ), al tratamiento ( $F_{5,62} = 11.84$ ,  $p<0.001$ ) y al tiempo ( $F_{3,186} = 110.31$ ,  $p<0.001$ ). La prueba *post hoc* reveló que en el día de adquisición del CAS todos los consumos fueron equivalentes.

Las líneas en la Figura 21 corresponden al 50% del consumo del día de la adquisición y sus colores corresponden a los grupos experimentales

respectivamente. Si en las pruebas del CAS (CAS 1, CAS 2, CAS 3), los consumos están por arriba del 50% del consumo en el día de adquisición, se observa un efecto de inhibición latente debido a las pre-exposiciones con el sabor y se considera que el sujeto no aprendió.

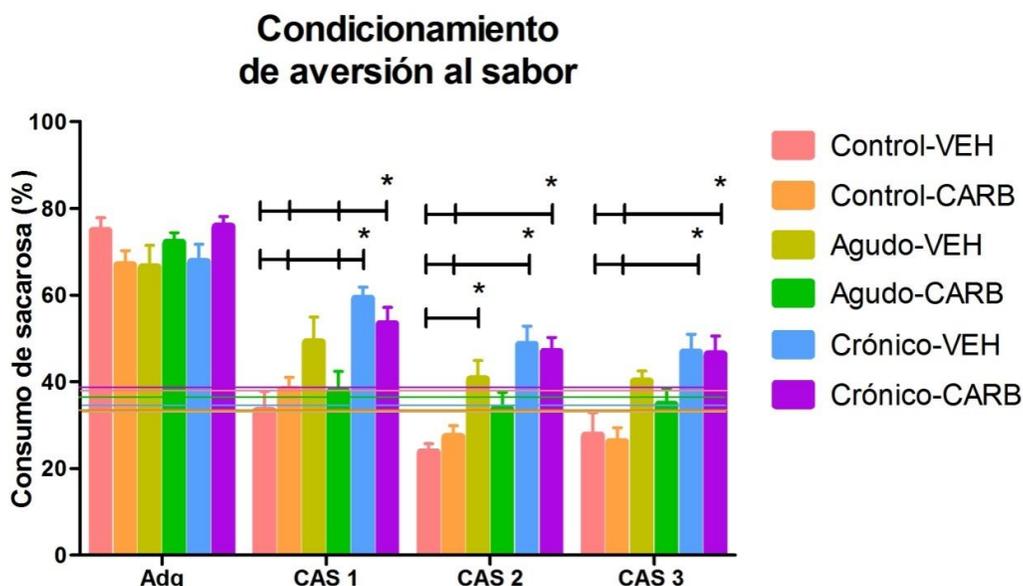


Figura 21. CAS después de la inyección intercerebral de carbacol. En el eje de las ordenadas se muestra la media  $\pm$  SEM del porcentaje de consumo de la solución de sacarosa con respecto al consumo total (consumo de agua más consumo de sacarosa). Las líneas representan el 50% con respecto al día de adquisición y su color corresponde a su grupo. \* $p < 0.001$ . ANOVA de dos vías de medidas repetidas, prueba post hoc Holm-Sidak. Adq: Adquisición. CAS: Condicionamiento de aversión al sabor.

En el día 2 (prueba 1) se encontraron diferencias significativas de los grupos con un consumo crónico de sacarosa: Crónico-Suc (vs Agudo-Carb, Control-Carb y control-veh) y Crónico-veh (vs. Agudo-Carb, Control-Carb y Control-veh). Todos los grupos muestran una inhibición latente pero ésta es más marcada para los grupos crónico, El día de la prueba 1 se observa que los animales de los grupos vehículo (agudo y crónico) consumen más sacarosa que sus grupos carbacol,

aunque esta diferencia no alcanza niveles significativos (no se observa un claro efecto farmacológico). Los dos grupos que tuvieron un consumo crónico de la solución de sacarosa (crónico-VEH y crónico-CARB) presentan consumos mayores en todos los días aunque la significancia aumenta en la prueba del CAS 3. En la prueba del CAS 2 los grupos Crónico-Carb (vs. Control-carb y control-veh), Crónico-veh (vs control-carb y control-veh) y agudo veh (vs control-veh) tuvieron diferencias significativas. Los grupos que recibieron sacarosa durante el consumo crónico (crónico-VEH y crónico-CARB) muestran una mayor inhibición latente que los otros grupos. Se observa una tendencia de disminución de porcentaje de consumo en los grupos infundidos con carbacol tanto agudos como crónicos. Sin embargo, esta diferencia nunca fue significativa.

Con este protocolo de dos probetas se observa que los consumos de los animales de los grupos crónicos nunca están por debajo de sus líneas de 50% ni a la tercera asociación con el estímulo aversivo (a diferencia de lo observado para los grupos crónico-sac y crónico-suc). Los animales de los grupos Agudo-VEH, Crónico-VEH y Crónico-CARB no aprendieron durante este protocolo de CAS.

#### 7.4 – OBJETIVO 4: EFECTO DE LA INYECCIÓN DE CARBACOL EN LA CORTEZA INSULAR DURANTE LA EXTINCIÓN DE LA AVERSIÓN

En la Figura 22 se muestran los consumos en ml de los grupos durante el protocolo de extinción. Los consumos se presentan en ml debido a que realizamos una extinción de tipo forzada.

Los datos se analizaron utilizando una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas y la prueba de comparaciones múltiples *Holm-Sidak*. El ANOVA mostró

un efecto significativo debido al tratamiento, ( $F_{5,62} = 15.25, p < 0.001$ ), al tiempo ( $F_{2,124} = 41.49, p < 0.001$ ) pero no a su interacción ( $F_{10,124} = 1.09, p = 0.37$ ).

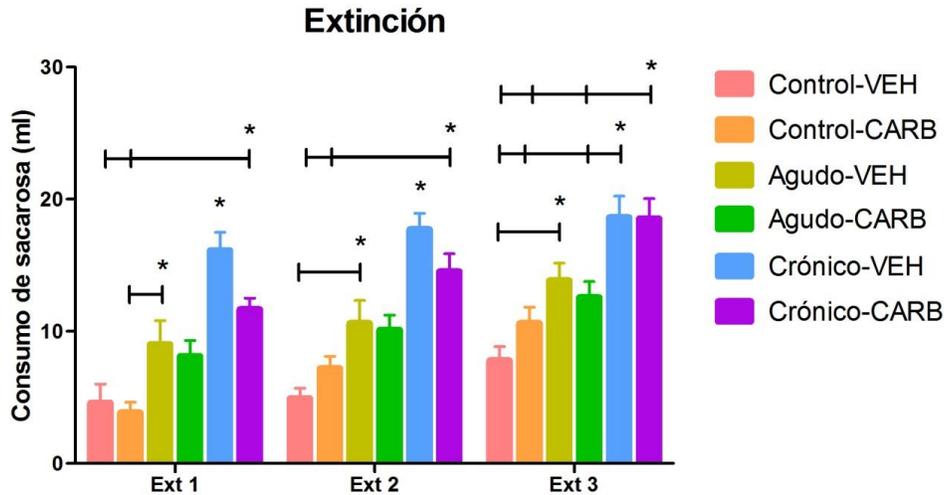


Figura 22. Extinción después de la inyección intercerebral de carbacol. En el eje de las ordenadas se muestra la media  $\pm$  SEM del consumo de la solución de sacarosa. Se observa que el grupo crónico-veh extingue más rápidamente. En los días 1 y 2, el consumo del grupo crónico-CARB está significativamente por debajo del consumo de crónico-VEH. \*  $p < 0.001$ . ANOVA de dos vía de medidas repetidas, prueba *post hoc* Holm-Sidak. Ext: Extinción.

En la primera prueba de extinción (Ext 1) se observa que los grupos infundidos con carbacol muestran consumos menores que sus controles vehículo. Entre el grupo crónico-VEH y el Crónico-CARB se observaron diferencias significativas en la Extinción 1 y 2. En el día de Extinción 3 esta diferencia entre los grupos carbacol y los infundidos con salina ya no es observada para ninguna de las tres condiciones (control, agudo y crónico). Si observamos el comportamiento del grupo crónico-VEH podemos hacer notar que sus consumos durante toda la etapa de extinción se mantienen muy parecidos, a diferencia de los del grupo crónico-CARB, que en el día de la Extinción 1 tiene un consumo significativamente por debajo del grupo vehículo pero para el día 3 sus consumos son similares.

## 7.5 – EXPERIMENTO ADICIONAL: ESTUDIO DE ANSIEDAD

### 7.5.1 – Tiempo en brazo abierto en el día 8 de aclimatación

La Figura 23 muestra el tiempo que pasaron los animales del grupo al que se le realizó la prueba el día 8 de aclimatación (grupo AC) en el brazo abierto del laberinto en cruz (4 patas). Los datos fueron analizados con la prueba U de Mann-Whitney ( $U= 71$ ,  $p=0.977$ ), no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos.

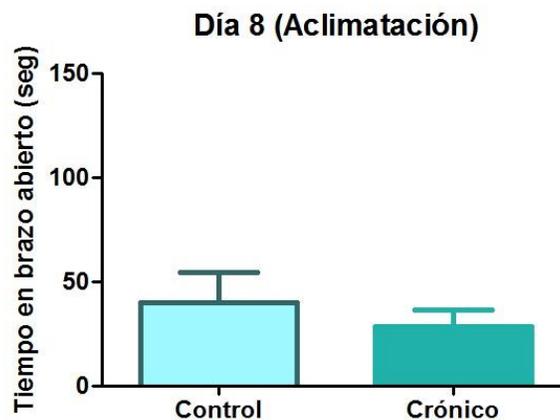


Figura 23. Tiempo que pasaron los animales en el brazo abierto del laberinto en cruz en el día 8 de aclimatación.

En este punto del protocolo ambos grupos sólo habían recibido agua por lo que se esperaba que sus tiempos en el brazo abierto fueran equivalentes.

### 7.5.2 - Tiempo en brazo abierto en el día de la adquisición del CAS

La Figura 24 muestra el tiempo que pasaron los animales del grupo al que se le realizó la prueba el día de la adquisición del CAS (grupo ADQ) en el brazo abierto del laberinto en cruz (con las 4 patas en uno de los dos brazos abiertos). Los datos fueron analizados con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney ( $U= 37$ ,  $p=0.046$ ), el grupo crónico disminuyó significativamente su tiempo en el brazo abierto con respecto al grupo control (Control  $n=12$ , Crónico  $n=12$ ).

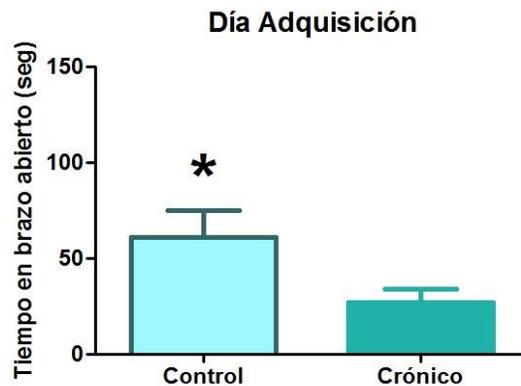


Figura 24. Tiempo que pasaron los animales en el brazo abierto del laberinto en cruz en el día de la adquisición del CAS. \*  $p < 0.050$ . U de Mann-Whitney.

### 7.5.3 Tiempo en brazo abierto en el día de la tercera prueba de extinción

La Figura 25 muestra el tiempo que pasaron los animales del grupo al que se le realizó la prueba el día de 3 de extinción en el brazo abierto del laberinto en cruz (con las 4 patas en uno de los dos brazos abiertos). No se encontraron diferencias

entre los dos grupos (Control n=12, Crónico n=11). Los datos fueron analizados con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney ( $U= 58$ ,  $p=0.644$ ), no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos.

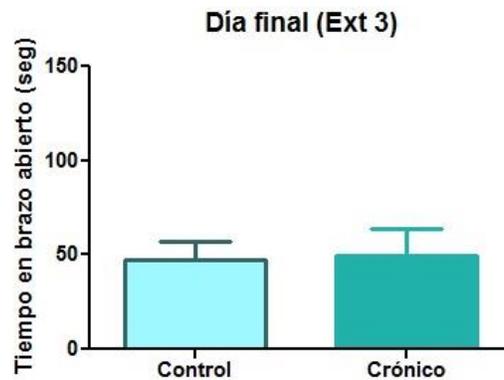


Figura 25. Tiempo que pasaron los animales en el brazo abierto del laberinto en cruz en el día 3 de las extinciones.

Los resultados encontrados en la prueba el día de la adquisición y en el día final nos sugieren que el nivel de ansiedad es mayor mientras más cercana esté la prueba a la culminación del período de consumo crónico.

## 8 - DISCUSIÓN

El primer objetivo de esta tesis fue conocer si el contenido calórico del sabor dulce tiene algún efecto sobre la conducta de ingesta, es decir, si los sabores dulces con aporte energético como la sacarosa inducen mayor preferencia de consumo que aquellos que no lo tienen, como es el caso del edulcorante sacarina.

En este sentido, primero se buscó determinar si los sujetos mostraban una mayor preferencia por la sacarosa o por la sacarina antes del consumo crónico, por lo cual, se evaluó el consumo de sacarosa o sacarina con respecto al total consumido (solución de sabor dulce más agua). Durante los dos primeros días del protocolo de preferencia, el grupo al que se le dio a elegir entre agua y la solución de sacarosa consumió un porcentaje mayor de ésta con respecto al porcentaje de consumo de la solución de sacarina del grupo al que se le dio solamente a elegir entre la solución de sacarina y agua (Figura 14). Para los días 3 y 4 esta diferencia ya no fue significativa. Por lo anterior, podemos concluir que los sujetos prefieren por igual una solución de sacarina que una de sacarosa y que el consumo diferencial de los primeros días se debe a un efecto de neofobia. El efecto de neofobia a la sacarina se ha reportado en numerosas ocasiones (Fitzgerald y Burton, 1983; Neath *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012), se cree que es debido a que la sacarina es un edulcorante que, aunque es dulce, tiene un componente amargo, a diferencia de la sacarosa. En días posteriores a este primer contacto con la sacarina, se observa una atenuación a la neofobia reflejada en un aumento creciente del porcentaje de consumo de la solución de sacarina lo que revela una memoria incidental apetitiva. El hecho de que para los días 3 y 4 no se observasen diferencias entre el consumo de ambas soluciones dulces con respecto al consumo total nos sugiere que el contenido calórico no juega un papel determinante cuando la preferencia se prueba después de consumos cortos (20 min) a lo largo de pocos días.

Siguiendo con el primer objetivo que era evaluar la preferencia de consumo entre sabores dulces con diferente contenido calórico, se evaluaron los parámetros de líquido y alimento consumido, ingesta calórica diaria y peso corporal de los sujetos durante un período de 14 días. Con lo que respecta al consumo de líquido, se observa que los sujetos con acceso *ad libitum* incrementa el consumo de la solución de sacarosa a lo largo de los 14 días a diferencia de los sujetos con acceso a la solución de sacarina o agua *ad libitum* que presentaron consumos similares y estables (Figura 15). La diferencia entre el consumo de sacarosa y sacarina sugiere que el contenido calórico, no el sabor dulce, es el que puede estar desencadenando el consumo exacerbado.

El grupo que tuvo acceso a la solución de sacarosa *ad libitum* consumió significativamente menos alimento sólido que los grupos con acceso a la solución de sacarina o agua (Figura 16). Esta disminución en el consumo de alimento sólido consumido se puede interpretar como un efecto compensatorio por las calorías que los sujetos ya estaban consumiendo por medio de la solución de sacarosa. Lo anterior también se sustenta en el hecho de que la ingesta calórica total diaria se mantuvo para todos los sujetos (Figura 17); los que consumieron la solución de sacarosa lo hicieron en gran cantidad pero al mismo tiempo disminuyeron su consumo de alimento sólido, lo que concuerda con lo previamente reportado por Avena y colaboradores (2008).

Con lo que respecta al peso corporal, se observó que los animales que consumieron la solución de sacarosa aumentaron significativamente su peso. Esto se contrapone con trabajos de Avena *et al.* (2008) y Martínez-Moreno *et al.* (2009) donde reportan que los animales no difieren en peso, gracias a un correcto balance en su ingesta calórica. En nuestro caso, también se observa un balance en la ingesta calórica diaria y sin embargo, se observó un aumento de peso. Probablemente esta observación se deba a un desbalance metabólico al convertirse estos azúcares en grasa y por ende, incrementar el peso corporal. La sacarosa es desdoblada por la enzima sacarasa en sus monosacáridos constitutivos, glucosa y fructosa. Se han reportado también elevados niveles de

triglicéridos en ratas que han sobrellevado una dieta de sacarosa (Fukuchi *et al.*, 2004). Estamos en espera de análisis del nivel de triglicéridos en ratas que han realizado este consumo crónico para poder ampliar esta discusión.

Los resultados obtenidos al medir el consumo de líquido, consumo de alimento sólido y peso corporal reflejan que el contenido calórico si juega un rol importante cuando se considera un tiempo prolongado. Los sujetos incrementan su consumo de la solución de sacarosa (con contenido calórico) a lo largo de los días lo cual tiene un efecto directo en el consumo de alimento sólido haciendo que este disminuya y se ve reflejado en el aumento de peso corporal.

El segundo objetivo de esta tesis era evaluar la intensidad de la inhibición latente a través del CAS inducida por el consumo crónico de sabores dulces con diferente contenido calórico así como evaluar la extinción de la aversión. En la Figura 19 se puede observar cómo en la primer prueba de CAS hay un efecto diferencial en el aprendizaje que es dependiente del grado de pre-exposición a los sabores dulces. Tanto los sujetos agudos como crónicos (4 y 18 días de pre-exposición respectivamente) de los grupos de sacarina y sacarosa muestran una inhibición latente, mientras que los sujetos control de ambos grupos (sin pre-exposición al sabor) claramente están aprendiendo a asociar el sabor con la consecuencia post-ingestional negativa, esto se puede observar debido a que su consumo de sabor el día de la prueba está por debajo del 50% con respecto al día de la adquisición (criterio utilizado por nuestro laboratorio). Aunque los grupos agudos también mostraron el efecto de inhibición latente, se observa que su nivel de consumo el día de la prueba está por debajo significativamente con respecto a los grupos crónicos, esto se observa de forma similar tanto para los grupos de sacarina y sacarosa. Lo anterior nos puede estar indicando que el grado pre-exposición a estos sabores positivamente hedónicos se ve reflejado en la capacidad de asociación con el estímulo aversivo y que el contenido calórico no está jugando un papel importante en este punto. Por criterio, se decidió no realizar una nueva asociación con el estímulo si los sujetos llegaban a 4ml de consumo del sabor el día de la prueba, siendo un máximo de 3 asociaciones con el estímulo aversivo

para posteriormente comenzar con el protocolo de extinción de la aversión. De tal forma, el total de sujetos que tuvieron acceso *ad libitum* ya sea a la solución de sacarosa o a la de sacarina requirieron el número máximo de ensayos de entrenamiento para aprender (Figura 20). Los sujetos de los grupos agudos (4 días de pre-exposición) aprendieron a asociar el sabor con el estímulo aversivo desde la segunda asociación. Lo anterior se puede interpretar en el sentido de que durante un consumo crónico de una solución altamente preferida como la sacarina y la sacarosa, se forma una memoria apetitiva robusta y por tanto una sola asociación posterior con un estímulo aversivo no produce un nuevo aprendizaje. Se requieren un número mayor de asociaciones para que los sujetos lleguen a aprender.

Por otro lado, lo que sucedió en la extinción nos pareció muy interesante. Durante el re-aprendizaje, *i.e.* la extinción de la aversión, se observó que los sujetos que tuvieron acceso a la solución de sacarosa durante el período de consumo crónico extinguieron la memoria aversiva más rápidamente con respecto a los que tuvieron acceso a la solución de sacarina. La recuperación de la memoria segura asociada con la solución de sacarosa se produjo más rápidamente. Lo anterior nos sugiere que el contenido calórico tiene un efecto diferencial en los procesos de formación de nuevas memorias gustativas y el re-aprendizaje.

La evidencia recolectada en los objetivos 1 y 2, en particular lo encontrado con respecto al re-aprendizaje seguro, sugiere que más allá del sabor dulce, el contenido calórico va a estar guiando la conducta de ingesta a largo plazo y la forma en cómo los sujetos re-aprenden y obtienen nuevos aprendizajes. Debido a lo anterior, para los objetivos 3 y 4 optamos por observar el efecto del consumo crónico de sacarosa en el CAS y durante la extinción de la memoria de aversión sobre el sistema colinérgico, a través del agonista colinérgico carbacol.

Para el objetivo 3 se evaluó la inhibición latente producida por un consumo crónico de una solución de sacarosa y el efecto del agonista carbacol antes de la

adquisición del CAS. Los resultados (Figura 21) mostraron que el consumo crónico de 14 días de la solución de sacarosa induce una representación robusta de la memoria apetitiva, que altera la respuesta colinérgica en la corteza insular. Estos resultados sólo muestran un efecto de los grados de pre-exposición que ya se habían discutido previamente pero no se observa un efecto de carbacol en ninguna de las tres condiciones de pre-exposición (control=0 días, agudo=3 días y crónico=20 días). Nosotros esperábamos observar un efecto del carbacol al menos en el grupo control. Clark y Bernstein en 2009 demostraron que el carbacol podía remedar la señal colinérgica y aunque las ratas tuvieran una pre-exposición a la sacarina, de tal forma que el sistema colinérgico estaba reemplazando la señal de familiar-seguro por la de novedoso. Lo anterior nos sugiere que probablemente el contenido calórico está interviniendo con este procesamiento aunque para obtener una conclusión más clara se debería variar la dosis de carbacol. La dosis que utilizamos nosotros de carbacol fue la misma que la descrita en el protocolo de Clark y Bernstein. En retrospectiva, consideramos que hubiera sido importante realizar una curva dosis respuesta para nuestras manipulaciones farmacológicas.

Es importante también tomara consideración los resultados del estudio de ansiedad que realizamos en las ratas después del consumo crónico de sacarosa con respecto a sus consumos elevados durante las pruebas del CAS. Se ha demostrado que el estrés tiene influencia en los aspectos tanto hedónico como homeostático de la ingesta de alimentos (Lu *et al.*, 2006; Lutter *et al.*, 2008). En el experimento adicional para conocer si nuestro protocolo de privación de un consumo crónico de sacarosa estaría elevando el nivel de ansiedad de nuestros sujetos, se encontró que los sujetos que consumieron la solución de sacarosa durante el período crónico disminuyeron significativamente su tiempo en el brazo abierto del laberinto elevado cuando la prueba se realizó en el día de adquisición del CAS, lo cual se puede interpretar como ansiedad (Figura 24). Lo encontrado nos sugiere que los niveles de ansiedad son alterados por un consumo crónico de sabores apetitosos posterior a su interrupción inmediata; la elevación en la

ansiedad, sin embargo, al parecer disminuye con el paso del tiempo ya que no se volvieron a encontrar estas diferencias cuando la prueba se realizó en días posteriores (prueba en día de la tercer prueba de extinción, ver Figura 25). Aún queda por describir los efectos de consumos intermitentes y el retiro total de sabores apetitosos en la ansiedad. Aunado al estrés por la privación del consumo crónico de sacarosa, también la inyección de LiCl induce un aumento en la ansiedad, esto sin embargo puede minimizarse debido a que todos los grupos fueron igualmente inyectados.

Los resultados del efecto del carbacol durante la extinción de la memoria aversiva indican que aunque el consumo crónico de sacarosa induce una representación robusta de la memoria apetitiva del sabor, la manipulación colinérgica cortical si modifica el re-aprendizaje durante la extinción. Se ha mostrado que el consumo crónico acelera el proceso de extinción ya que la memoria apetitiva está sumamente consolidada. En este protocolo fueron necesarias tres sesiones de extinción para que los sujetos tratados con carbacol equilibraran sus consumos con respecto a los sujetos control.

En conjunto, los resultados sugieren que la actividad colinérgica en la corteza insular cambia tras haberse formado una representación robusta a un sabor altamente apetitoso y con contenido calórico como la sacarosa; asimismo, la actividad colinérgica es diferente durante la formación de un nuevo aprendizaje aversivo en comparación con la actividad colinérgica durante el re-aprendizaje donde el sabor no tienen consecuencias post-ingestionales negativas.

## 9 - CONCLUSIONES

1. El contenido calórico, más que el sabor dulce, juega un rol importante que va a guiar la conducta de incremento de la ingesta durante un consumo crónico.
2. El consumo crónico (14 días) de una solución de sacarosa induce una mayor inhibición latente del CAS y acelera el proceso de extinción de la aversión con respecto a un consumo crónico de solución de sacarina (14 días).
3. El consumo crónico de sacarosa induce una representación robusta de la memoria apetitiva del sabor e impide que la manipulación farmacológica con el agonista colinérgico carbacol remede en el sistema la señal de novedad.
4. Posterior a un consumo crónico (14 días) de sacarosa, la inyección del agonista colinérgico carbacol antes de la adquisición del CAS modifica el re-aprendizaje durante la extinción.
5. La privación del consumo crónico de sacarosa produce un incremento en el nivel de ansiedad pero conforme el tiempo avanza este efecto disminuye.

## IV - REFERENCIAS

Accolla R, Bathellier B, Petersen CC, Carleton A. 2007. Differential spatial representation of taste modalities in the rat gustatory cortex. *J Neurosci* 27(6), 1396-1404.

Ackroff K y Sclafani A. 1991. Flavor preferences conditioned by sugars: Rats learn to prefer glucose over fructose. *Physiol Behav* 50, 815-824.

Aleksandrov VG, Fedorova KP. 2003. Structure of the insular region of the rat neocortex. *Neurosci Behav Physiol* 33(3), 199-202.

Albert M y Ayres JB. 1989. With number of preexposures constant latent inhibition increases with preexposure CS duration or total CS exposure. *Learn Motiv* 20, 278-294.

Avena NM, Rada P, Moise N. 2006. Sucrose feeding on a binge Schedule releases accumbens dopamine repeatedly and eliminates the acetylcholine satiety response. *Neurosci* 139, 813-820.

Avena NM. 2007. Examining the addictive-like properties of binge eating using an animal model of sugar dependence. *Exp Clin Psychopharmacol* 15(5), 481-491.

Avena NM, Bocarsly ME, Rada P, Kim A, Hoebel B.G. 2008. After daily bingeing on a sucrose solution, food deprivation induces anxiety and accumbens dopamine/acetylcholine imbalance. *Physiol Behav* 94(3), 309-315.

Avena NM, Rada, P, Hoebel, BG. 2009. Sugar and fat bingeing have notable differences in addictive-like behavior. *J Nutr* 139(3), 623-628.

Avena NM. 2010. The study of food addiction using animal models of binge eating. *Appetite* 55(3), 734-737.

Batsell WR Jr y Best MR. 1993. One bottle too many? Method of testing determines the detection of overshadowing

Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y. 2000. The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J Neurosci* 20(18), 7017-7023

Bermúdez-Rattoni F. 2004. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 5(3), 209-217.

Bermúdez-Rattoni F, Ramírez-Lugo L, Gutiérrez R, Miranda MI. 2003. Molecular signals into the insular cortex and amigdala during aversive gustatory memory formation. *Cell Mol Neurob* 24(1), 25-36.

Bielavska E y Bures J. 1994. Universality of parabrachial mediation of conditioned taste aversion. *Behav Brain Res* 60, 35-42.

Blass EM y Hoffmeyer LB. 1991. Sucrose as an analgesic for newborn infants. *Pediatrics* 87(2), 215-218.

Braun JJ, Slick TB y Lorden JF. 1972. Involvement of the gustatory neocortex in the learning of taste aversions. *Physiol Behav.* 9(4), 637-641.

Braun JJ. 1990. Gustatory cortex: definition and function. En: B. Kolb B y RC. Tees (Eds.), *The cerebral cortex of the rat.* (pp.125-132) Cambridge, MA: The MIT press.

Bures J, Bermúdez-Rattoni F y Yamamoto T. 1998. Conditioned taste aversion. Memory of a special kind. Oxford Psychology Series No. 31, Publications OS, Oxford University Press.

Capaldi ED, Campbell DH, Sheffer JD, Bradford JP. 1987. Conditioned flavor preferences based on delayed caloric consequences. *J Exp Psych* 13(2), 150-155.

Capaldi ED. 1992. Conditioned food preferences. En DL. Medin (Ed), *Psychology of Learning and Motivation: Advances in research and theory.* (pp 1-15)San Diego, CA: Academic Press.

Carleton A, Accolla R y Simon SA. 2010. Coding in the mammalian gustatory system. *Cell* 33(7), 326-334.

Cechetto D F y Saper, CB. 1987 Evidence for a viscerotopic sensory representation in the cortex and thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 262, 27-45.

Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJP y Zuker CS. 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444(7117), 288-294.

Clark EW y Bernstein IL. 2009. Boosting cholinergic activity in gustatory cortex enhances the salience of a familiar conditioned stimulus in taste aversion learning. *Behav Neurosci* 123(4), 764-771.

Colantuoni C, Rada P, McCarthy J, Patten C, Avena NM, Chadeayne A, Hoebel BG. 2002. Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioide dependence. *Obesity* 10(6), 478-488.

Court JA, Perry EK. 1995. Distribution of nicotinic receptors in the CNS. En Stone TW (Ed), *CNS Neurotransmitters and Neuromodulators: Acetylcholine.* (pp.10) CRC Press.

Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. 2000. Nicotine receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 431-458.

Davis M, Wagner Ar. 1968. Startle responsiveness after habituation to different intensities of tone. *Psychonomic Sci* 12, 337-338.

De la Casa LG y Lubow RE. 1995. Latent inhibition in Conditioned Taste Aversion: The roles of stimulus frequency and duration and the amount of fluid ingested during preexposure. *Neurobiol Learn Mem* 64, 125-132.

De la Cruz V, Rodríguez-Ortiz CJ, Balderas I, Bermúdez-Rattoni F. 2008. Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. *Eur J Neurosci* 28, 1377-1381.

De la Torre-Vacas L y Agüero-Zapata A. 2006. Bases neurales del aprendizaje aversivo gustativo: Formación de las representaciones gustativas hedónicas adquiridas. *Rev Neurol* 43(1), 25-31.

Domjan M. 1976. Determinants of the enhancement of flavored-water intake by prior exposure. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 2(1), 17-27.

Dudai Y. 1989. *The neurobiology of memory*. Oxford University Press.

Dykes R, Metherate R, Temblay N. 1990. Transient and prolonged effects of acetylcholine on responsiveness of cat somatosensory cortical neurons. *J Neurophys* 43, 223.

Ferreira G, Gutierrez R, De la Cruz V, Bermudez-Rattoni F. 2002. Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Euro J Neurosci* 16, 1139-1145.

Fitzgerald RE y Burton MJ. 1983. Neophobia and conditioned taste aversion deficits in the rat produced by undercutting temporal cortex. *Physiol Behav* 30(2), 203-206.

Fortuna JL. 2010. Sweet preference, sugar addiction and the familiar history of alcohol dependence: shared neural pathways and genes. *J Psychoact Drugs* 42(2), 147-151.

Fukuchi S, Hamaguchi K, Seike M, Himeno K, Sakata T, Yoshimatsu H. 2004. Role of fatty acid composition in the development of metabolic disorders in sucrose-induced obese rats.

García J, Kimeldorf DJ, Koelling RA. 1955. Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science* 122(3160), 157-158.

García-dela Torre P, Rodríguez-Ortiz J, Balderas I, Bermúdez-Rattoni F. 2010. Differential participation of temporal structures in the consolidation and reconsolidation of taste aversion extinction. *Euro J Neurosci* 32, 1018-1023.

Giovannini MG, Rakovska A, Benton RS, Pazzagli M, Bianchi L, Pepeu G. 2001. Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neurosci* 106(1), 43-53.

Gonzalez CL, Miranda MI, Gutierrez H, Ormsby C, Bermudez-Rattoni F. 2000. Differential participation of the NBM in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion and Morris water maze. *Behav Brain Res* 116, 89–98.

Grinvald A, Shoham D, Shmuel A, Glaser D, Vanzetta I, Shtoyerman E, *et al.* 1999. In-vivo optical imaging of cortical architecture and dynamics. In: Windhorst W, Johansson H (Eds) en *Modern techniques in neuroscience research*. Springer (p. 1325).

Gutiérrez R, Rodríguez-Ortiz CJ, de la Cruz V y Núñez-Jaramillo L, Bermúdez-Rattoni F. 2003. Cholinergic dependence of taste memory formation: Evidence of two distinct processes. *Neurobiol Learn Mem* 80(3), 223-331.

Inglis FM, Day JC, Fibiger HC. 1994. Enhanced acetylcholine release in hippocampus and cortex during the anticipation and consumption of a palatable meal. *Neurosci* 62(4), 1049-1056.

Ivanova SF, Bures J. 1990. Conditioned taste aversion is disrupted by prolonged retrograde effects of intracerebral injection of tetrodotoxin in rats. *Behav Neurosci* 104, 948–954.

Jacobson LH, Kelly PH, Bettler B, Kaupmann K y Cryan JF. 2006. GABA (B(1)) receptor isoforms differentially mediate the acquisition and extinction of aversive taste memories. *J Neurosci* 26(34), 8800-8803.

Johnson L, Mander AP, Jones LR, Emmett PM y Jebb SA. 2007. Is sugar sweetened beverage consumption associated with increased fatness in children? *Am J Clin Nutr* 23(7-8), 557 – 563.

Jurdak N y Kanarek RB. 2009. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiol Behav* 96(1), 1-5.

Koh MT, Wilkins EE y Bernstein IL. 2003. Novel tastes elevate c-fos expression in the central amygdala and insular cortex: implication for taste aversion learning. *Behav Neurosci* 117(6), 1416-1422.

Lau LF y Haganir R. 2006. Tyrosine Phosphorylation. En Siegel G, Albers RW, Brady S y Price D (Eds), *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects* (7ed) (pp. 432) Elsevier Academic Press.

Lin J-Y, Roman C, St Andre J, Reilly S. 2009. Forebrain lesions and taste, olfactory and trigeminal neophobia in the rat. *Bran Res* 1251, 195-203.

Lin J-Y, Amodeo RL, Arthurs J, Reilly S. 2012. Anisomycin infusions in the parabrachial nucleus and taste neophobia. *Neurobiol Learn Mem* 98, 348-353.

López García JC, Bermúdez-Rattoni F, Tapia R. 1990. Release of acetylcholine, gama-aminobutyrate, dopamine and glutamate, and activity of some related enzymes, in rat gustatory neocortex. *Brain Res* 523, 100-104.

Lu XY, Kim CS, Frazer A, Zhang W. 2006. Leptin: a potential novel antidepressant. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 1593-1598.

Lundy RF. 2008. Gustatory hedonic value: Potential function for forebrain control of brainstem taste processing. *Neurosci Biobehav R* 32(8), 1601-1606.

Lutter M, Krishnan V, Russo SJ, Jung S, McClung CA, Nestler EJ. 2008. Orexin signaling mediates antidepressant-like effect of calorie restriction. *J Neurosci* 28, 3071-3075.

Martínez-Murillo R y Rodrigo J. 1995. The localization of cholinergic neurons and markers in the CNS. En Stone TW (Ed), *CNS Neurotransmitters and Neuromodulators: Acetylcholine*. (pp.10) CRC Press.

Martínez-Moreno AG, López-Espinoza A, Díaz-Reséndiz FJ y Valdés-Miramontes E. 2009. Consumo de soluciones endulzadas en ratas albinas; sabor vs calorías. *Psicothema* 21(2), 191-198.

Mercer ME y Holder MD. 1997. Food cravings, endogenous opioid peptides, and food intake: a review. *Appetite* 29, 325-352.

Mesulam MM, Volicer L, Marquis JK, Mufson EJ, Green RC. 1986. Systematic regional differences in the cholinergic innervations of the primate cerebral cortex:

Distribution of enzyme activities and some behavioral implications. *Ann Neuro* 19, 144-151.

Mesulam MM. 1990. Large-scale neurocognitive networks and distributed processing for attention, language, and memory, *Ann Neuro* 28, 597–613.

Metherate R y Ashe JH. 1993. Nucleus basalis stimulation facilitates thalamocortical synaptic transmission in the rat auditory cortex. *Synapse* 14, 132-143.

Miller RR, Kasrow WJ, Schachtman TR. 1986. Retrieval variability: sources and consequences. *Ame J Psych* 99, 145-218.

Miranda MI y Bermúdez-Rattoni. 1999. Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 6478-6482.

Miranda MI, Ramírez-Lugo L y Bermúdez-Rattoni F. 2000. Cortical Cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res* 882, 230-235.

Miranda MI, Ferreira G, Ramírez L, Bermúdez-Rattoni F. 2002. Glutamatergic activity in the amígdala signals visceral input during taste memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11417-11422.

Miranda MI, LaLumiere RT, Buen TV, Bermudez-Rattoni F y McGaugh JL. 2003. Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amígdala impairs taste memory. *Eur J Neurosci* 18, 2650-2610

Miranda MI, Rodríguez-García G, Reyes-Lopez JV, Ferry B y Ferreira G. 2008. Differential effects of beta-adrenergic receptor blockade in basolateral amígdala or insular cortex on incidental and associative taste learning. *Neurobiol Learn Mem* 90, 54-61.

Miranda MI. 2011. El sabor de los recuerdos: Formación de la memoria gustativa. *Revista digital universitaria* 12(3).

Myers KP y Sclafani A. 2006. Development of learned flavor preferences. *Dev Psychobiol* 48(5), 380-388.

Moraga-Amaro R, Cortés-Rojas A, Simon F, Stehberg J. 2014. Role of insular cortex in taste familiarity. *Neurobiol Learn Mem* 109, 37-45.

Naor C y Dudai Y. 1996. Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behav Brain Res* 79, 61-67.

Neath KN, Limebeer CL, Reilly S, Parker LA. 2010. Increased liking for a solution is not necessary for the attenuation of neophobia in rats. *Behav Neurosci* 124(3), 398-404.

Núñez-Jaramillo L, Ramírez-Lugo L, Herrera-Morales W y Miranda MI. 2009 "Taste memory formation: Latest advances and challenges". *Behav Brain Res* 207(2), 232-248.

Pelchat ML. 2002. Of human bondage: Food craving, obsession, compulsion and addiction. *Physiol Behav* 76, 347-352.

Rodríguez-Ortiz CJ, De la Cruz V, Gutiérrez R, Bermúdez-Rattoni F. 2005. Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn Mem* 12, 533-537.

Rodríguez G y Alonso G. 2002. Latent inhibition as a function of CS intensity in taste aversion learning. *Behav Proc* 60, 61-67.

Rosenblum K, Berman DE, Hazvi S, Lamprecht R y Dudai Y. 1997. NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J Neurosci* 17, 5129-5135.

Rosenblum K. 2008. Conditioned taste aversion and taste learning: Molecular mechanisms. En Byrne J.H (Ed.), *Concise Learning and Memory: The Editor's Selection*. (pp.214-221), London: Academic press.

Sarter M y Bruno JP.1994. Cognitive functions of cortical acetylcholine: lessons from studies on the transsynaptic modulation of activated efflux, *Trends Neurosci.*, 17, 17–221.

Squire LR y Kandel ER. 2000. *Memory: From mind to molecules*. New York, Scientific American Library.

Touzani K y Sclafani A. 2007. Insular cortex lesions fail to block flavor and taste preference learning in rats. *Eur J Neurosci* 26(6), 1692–1700.

Volkow ND y Roy Wise. 2005. How can drug addiction help us understand obesity? *Nat Neurosci* 8(5), 555-60

Wickelgren BG. 1967. Habituation of spinal motoneurons. *J Neurophys* 30, 1404-1423.

Wise RA, Leone P, Rivest R y Leeb K. 1995. Elevations of nucleus accumbens dopamine and DOPAC levels during intravenous heroin self-administration. *Synapse* 21(2), 140-148

Wurtman RJ, Wurtman JJ. 1998. Do carbohydrates affect food intake via neurotransmitter activity? *Appetite* 11(Suppl), 42-47

Yamamoto T, Matsuo R, y Kawamura Y. 1980. Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination. J Neurophysiol 44, 440-455.

Yamamoto T, Fujimoto Y, Shimura T, Sakai N. 1995. Conditioned taste aversion in the rat with ecitotoxic brain lesions. Res 22, 31-49.

## V - ÍNDICE DE FIGURAS

### Figura

1	Molécula de sacarina y molécula de sacarosa	7
2	Ejemplo del aprendizaje aversivo (Prueba) tras la adquisición del CAS y la posterior extinción de la aversión gustativa.	12
3	Ejemplo de inhibición latente.	13
4	Papila gustativa.	15
5	Representación de los principales substratos neurales de las vías gustativa (flechas azules) y visceral (flechas rojas).	16
6	Corte coronal del cerebro de la rata mostrando la corteza insular disgranular (violeta) y la granular (color verde)	20
7	Vista sagital de los principales grupos de células colinérgicas y sus proyecciones en el SNC de la rata.	22
8	Efecto de la presentación sucesiva de una solución de sacarina (0.1%) sobre la liberación de acetilcolina en la corteza insular.	23
9	Estructura del agonista colinérgico carbacol.	25
10	Consumo de sacarina después de la inyección de carbacol.	26
11	Protocolo general del estudio del efecto del consumo crónico de sacarina y sacarosa (Objetivos 1 y 2).	37
12	Protocolo farmacológico general (Objetivos 3 y 4).	40
13	Protocolo general del estudio de ansiedad.	43
14	Fase de preferencia al sabor (sacarina o sacarosa).	47

<b>15</b>	Consumo de líquido durante la etapa de consumo crónico.	48
<b>16</b>	Consumo de alimento sólido (pellets) durante la etapa de consumo crónico.	49
<b>17</b>	Ingesta calórica diaria durante la etapa de consumo crónico.	50
<b>18</b>	Ganancia de peso durante la etapa de consumo crónico.	51
<b>19</b>	Primer CAS	53
<b>20</b>	Condicionamiento de aversión al sabor y extinción para la sacarina y sacarosa (Experimento 1).	54
<b>21</b>	CAS después de la inyección intercerebral de carbacol.	56
<b>22</b>	Extinción después de la inyección intercerebral de carbacol.	58
<b>23</b>	Tiempo que pasaron los animales en el brazo abierto del laberinto en cruz en el día 8 de aclimatación.	59
<b>24</b>	Tiempo que pasaron los animales en el brazo abierto del laberinto en cruz el día de la adquisición del CAS.	60
<b>25</b>	Tiempo que pasaron los animales en el brazo abierto del laberinto en cruz el día 3 del protocolo de extinción.	61

## **Tabla**

<b>1</b>	Resumen de los grupos experimentales del protocolo de los objetivos 1 y 2 y sus métodos particulares.	39
<b>2</b>	Resumen de los grupos experimentales del protocolo de los objetivos 3 y 4 y sus métodos particulares.	42
<b>3</b>	Resumen de los grupos experimentales del estudio de ansiedad y sus métodos particulares	45

## VI – ABREVIATURAS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AI</b>	Corteza insular anterior
<b>AP</b>	Área Postrema
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>BLA</b>	Núcleo basolateral de la amígdala
<b>CAS</b>	Condicionamiento de aversión al sabor
<b>CARB</b>	Carbacol
<b>CI</b>	Corteza insular
<b>CG</b>	Corteza gustativa
<b>COF</b>	Corteza orbito frontal
<b>CPF</b>	Corteza prefrontal
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DI</b>	Corteza insular disgranular
<b>Ext</b>	Extinción
<b>HL</b>	Hipotálamo lateral
<b>LiCl</b>	Cloruro de Litio
<b>mAChR</b>	Receptores muscarínicos
<b>Nacc</b>	Núcleo Acúmbens

<b>nAChR</b>	Receptores nicotínicos
<b>NBM</b>	Núcleo basal magnocelular
<b>NCA</b>	Núcleo central de la Amígdala
<b>NPB</b>	Núcleo parabraquial
<b>NTS</b>	Núcleo del tracto solitario
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>PI</b>	Corteza insular posterior
<b>S1</b>	Corteza somatosensorial primaria
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SAC</b>	Sacarina
<b>SUC</b>	Sacarosa
<b>TRC</b>	Células receptoras gustativas
<b>VEH</b>	Vehículo
<b>VI</b>	Corteza insular ventral
<b>VPMpc</b>	Núcleo ventroposterior-medial del tálamo
<b>VPL</b>	Núcleo ventroposterior-lateral del tálamo