



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“NEUROQUÍMICA DE LA CORTEZA INSULAR DURANTE LA ADQUISICIÓN DEL
CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA AL SABOR”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

KARLA GABRIELA MEDINA MEDINA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Daniel Osorio Gómez
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dra. Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo
[Instituto Nacional de Psiquiatría](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria a cargo del Dr. Federico Bermúdez Rattoni, en el Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México con el apoyo económico otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica DGAPA-PAPIIT (IA202922).

Los recursos para asistir a la 2023 International Conference on Learning and Memory (LEARNMEM2023), en la cual se presentaron los avances del proyecto, fueron facilitados por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

AGRADECIMIENTOS

A la M. V. Z. Claudia V. Rivera Cerecedo, responsable de la Unidad de Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, por su apoyo en el cuidado de los animales utilizados en este proyecto y por sus enseñanzas en el trato digno de dichos animales.

A los miembros del Comité Tutor, la Dra. María de Lourdes Massieu Trigo y la Dra. Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo por contribuir al desarrollo de este proyecto con sus comentarios a lo largo de las diferentes evaluaciones tutorales.

A los miembros del jurado de grado, el Dr. Rudolf Buijs, la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias, la Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes, el Dr. Luis Alberto Téllez Lima y el Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza por haberse tomado el tiempo de revisar el producto final del trabajo y por retroalimentar la conclusión del mismo con sus valiosos comentarios.

Al Dr. Daniel Osorio Gómez, a quien agradezco infinitamente el haber depositado su confianza en mí para continuar con la ejecución de nuevos proyectos y por motivarme todos los días a entender el mundo desde una perspectiva científica.

A mis amigos, Arturo, Gaby y Apolinar por hacer que el laboratorio se sienta más como un hogar que como un espacio de trabajo. Gracias por todas las risas, llantos y enseñanzas que hemos compartido a lo largo del camino.

A mis amigos, Mayer, Nydia, Misael, Fabiola y Concepción, quienes constantemente me recuerdan que tengo el potencial para lograr lo que me proponga. Gracias por creer ciegamente en mí y por regalarme su cariño, sin importar si las cosas salen bien o mal. Su amistad ha sido uno de los pilares más importantes en mi vida. Que nos dure hasta el fin de los tiempos.

A mi madre Claudia y mi hermana Alejandra, por apoyar y acompañarme en cada una de las decisiones que me han traído hasta aquí y por ser el motor que me impulsa a querer ser mejor cada día.

Y, finalmente, a todos los animales de laboratorio, quienes son los verdaderos héroes en el desarrollo del quehacer científico.



ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	8
Aspectos generales del aprendizaje y la memoria	8
Memoria de reconocimiento al sabor	9
Neuroquímica de la memoria de reconocimiento al sabor	10
Señalización glutamatérgica	10
Señalización noradrenérgica	11
Señalización dopaminérgica	12
Establecimiento de preferencia a los sabores	13
Condicionamiento de Preferencia al Sabor	14
Sustratos neurales del CPS	14
Corteza insular	16
Neuroquímica del CPS	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
OBJETIVOS	20
Objetivo general	20
Objetivos particulares	21
HIPÓTESIS	21
METODOLOGÍA	21
Animales	21
EXPERIMENTO 1: Estandarización del protocolo de condicionamiento de preferencia al sabor	22
Privación de agua y línea base	22
Curva dosis-respuesta	22
Condicionamiento de Preferencia al Sabor	23
EXPERIMENTO 2: Monitoreo de la actividad neuroquímica de la CI	25
Implantación de cánulas	25
Privación de agua y línea base	25
Microdiálisis in vivo	26
a) Recolección de muestras	26
b) Protocolo conductual	26



c) Análisis de muestras	28
Extracción de cerebros	28
EXPERIMENTO 3: Evaluación del papel funcional de los sistemas de neurotransmisión mediante el uso de antagonistas específicos	29
Implantación de cánulas	29
Efecto de la administración de AP5, propranolol y SCH en el establecimiento del CPS	29
Efecto de la administración de AP5, propranolol y SCH sobre la consolidación del CPS	31
Presentación de datos y análisis estadístico	32
RESULTADOS	33
Curva dosis respuesta para el establecimiento del CPS	33
La memoria de reconocimiento al sabor está relacionada con las consecuencias posingestivas	34
Cambios en la liberación de glutamato ante la presentación de estímulos gustativos y viscerales	36
Cambios en la liberación de norepinefrina ante la presentación de estímulos gustativos y viscerales	38
Cambios en la liberación de dopamina ante la presentación de estímulos gustativos y viscerales	40
El bloqueo de los receptores NMDA, β -adrenérgicos y dopaminérgicos tipo D1 en la CI antes del estímulo visceral afecta el establecimiento del CPS	42
El bloqueo de los receptores NMDA, β -adrenérgicos y dopaminérgicos tipo D1 en la CI después de la adquisición del CPS impide la consolidación de la memoria a largo plazo	43
DISCUSIÓN	45
La administración intraperitoneal de glucosa induce el establecimiento del CPS en un solo ensayo	45
Neuroquímica del procesamiento de estímulos gustativos y viscerales	47
a) Glutamato	47
b) Norepinefrina	50
c) Dopamina	53
CONCLUSIONES	55
ANEXO	57
REFERENCIAS	59



ABREVIATURAS

AMY	Amígdala	LB	Línea basal
AP5	Ácido 2-amino-5-fosfopentanoico	LiCl	Cloruro de litio
BOLD	Señal neuronal dependiente de nivel de oxígeno en sangre	MCP	Memoria de corto plazo
CI	Corteza Insular	MLP	Memoria de largo plazo
CAS	Condicionamiento de aversión al sabor	NaCl	Cloruro de sodio
CG	Corteza gustativa	NE	Norepinefrina
CPL	Condicionamiento de preferencia al lugar	NMDA	N-metil-D-aspartato
CPS	Condicionamiento de preferencia al sabor	NPB	Núcleo parabraquial
DA	Dopamina	NTS	Núcleo del tracto solitario
EC	Estímulo condicionado	PBS	Buffer de fosfatos salino
EI	Estímulo incondicionado	PROP	Propranolol
GLU	Glutamato	Sac	Sacarina
Gluc	Glucosa	SCH	SCH 233990
GLUT	Transportador de glucosa	SGLT	Transportador de sodio y glucosa
i.c.	Intracortical	SS	Solución salina/NaCl 0.9%
i.p.	Intraperitoneal	VTA	Área tegmental ventral



RESUMEN

El establecimiento de preferencia a los sabores permite a los organismos reconocer aquellos sabores que están relacionados con efectos posingestivos positivos. Actualmente, existe poca información sobre las estructuras cerebrales donde se asocian los inputs sensoriales y las consecuencias posingestivas recompensantes necesarias para el establecimiento del condicionamiento de preferencia al sabor (CPS). Sin embargo, se ha propuesto que la corteza insular (CI) podría tener un papel funcional en la integración de las señales exteroceptivas e interoceptivas, pues trabajos previos han mostrado fluctuaciones en los niveles de catecolaminas y de glutamato durante la presentación de estímulos gustativos y señales posingestivas. Por lo anterior, se evaluó la dinámica de liberación de neurotransmisores en la CI durante la exposición a un sabor novedoso y un estímulo posingestivo positivo necesarios para la adquisición de la CPS. Se realizó una curva dosis-respuesta en ratas Wistar macho en las que se administraron intraperitonealmente (i.p.) diferentes dosis de glucosa para que fueran asociadas al consumo de sacarina (0.3%) y se encontró que la administración de 350 mg/kg de glucosa induce un CPS a largo plazo. Posteriormente, mediante el uso de la técnica de microdiálisis *in vivo*, se monitorearon los cambios en la liberación de glutamato, norepinefrina y dopamina en la CI durante la ingesta de sacarina y la administración i. p. de glucosa. Los resultados muestran que el consumo de sacarina induce una elevación de las catecolaminas, mientras que la inyección de glucosa aumenta la liberación de norepinefrina, dopamina y glutamato. Para evaluar el papel funcional de estos neurotransmisores en la formación y consolidación del CPS, se administraron antagonistas de los receptores NMDA (AP5), β -adrenérgicos (PROP) o dopaminérgicos tipo D1 (SCH) en la CI inmediatamente antes de la glucosa o 30 minutos después de la sesión de adquisición del CPS. Los resultados muestran que el bloqueo farmacológico de los receptores NMDA, β -adrenérgicos y dopaminérgicos tipo D1 en la CI impide el establecimiento del CPS cuando el bloqueo ocurre antes de la administración de la glucosa. No obstante, el bloqueo de los receptores NMDA y D1 en la CI impide la consolidación del CPS, dejando intacta la memoria a corto plazo. Estos resultados sugieren que la señalización glutamatérgica y catecolaminérgica dentro de la CI juega un papel importante en el establecimiento del CPS y demuestran que la activación de los receptores NMDA y dopaminérgicos tipo D1 está relacionada con la consolidación de la memoria de preferencia al sabor.



INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la actualidad, las enfermedades crónicas no transmisibles (ENT) representan la primera causa de muerte en todo el mundo (OMS, 2022). Este tipo de enfermedades, que se distinguen de otras por ser de duración prolongada y por crear una necesidad de tratamiento a largo plazo, incluyen a las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades respiratorias crónicas, el cáncer y la diabetes. Así pues, mientras que en 2022 se reportó que las ENT provocaron alrededor de 41 millones de muertes, lo que equivale al 74% del total de muertes alrededor del mundo, provocaron 5.5 millones de fallecimientos en la región de las Américas (OMS, 2022). Ese mismo año en México, las afecciones cardiovasculares y la diabetes se posicionaron entre las primeras tres causas de muerte con un total de 366,178 fallecidos (Secretaría de Salud, 2022). Al indagar la etiología de estas enfermedades, se identificó que dentro de los factores de riesgo más importantes que contribuyen a su desarrollo se encuentran la mala alimentación y la inactividad física (OMS, 2022). Particularmente, se encontró que existe una estrecha relación entre el consumo de azúcares libres y el riesgo de padecer una enfermedad crónica no transmisibles (OMS, 2015; Vandevijvere et al., 2015).

Conforme a lo establecido por la OMS (2015), los azúcares libres se definen como los monosacáridos y disacáridos que el fabricante, cocinero o consumidor añaden a los alimentos y bebidas (p. ej. azúcar de mesa o sacarosa, jarabe de maíz, dextrosa, fructuosa, glucosa, maltosa, jarabe de malta, etc.). Actualmente, el consumo elevado de estos azúcares representa uno de los problemas de salud pública más serios para la sociedad, pues promueven un incremento en la ingesta de calorías que rebasa los requerimientos nutricionales recomendados (25 g o 96 kcal por día) (OMS, 2016; Secretaría de Salud, 2015). Aunque la OMS ha recomendado disminuir el



consumo de azúcares libres a menos del 10% de la ingesta calórica total (OMS, 2016), los gobiernos de diferentes países han implementado políticas de aumento en los impuestos para desalentar su compra y las empresas han optado por utilizar edulcorantes artificiales con un menor contenido calórico, está proyectado que la ingesta de azúcar seguirá en aumento en los próximos 30 años (Pizzorno, 2015). Si bien esta tendencia se explica parcialmente por el aumento en la producción y la subsecuente disponibilidad en los alimentos (Swinburn et al., 2011; Tan et al., 2020), de manera reciente se ha planteado que las propiedades recompensantes de los azúcares, que derivan tanto de su sabor dulce como de su valor nutricional, promueven su ingesta, favoreciendo el sobreconsumo con relación a otros macronutrientes (De Araujo et al., 2020); incrementando el factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades no transmisibles.

Así pues, con el fin de comprender los procesos que favorecen el establecimiento de preferencias gustativas hacia los alimentos con una alta densidad calórica, el cerebro ha sido propuesto como uno de los actores principales pues participa en el reconocimiento del sabor dulce y del valor nutricional de los azúcares (De Araujo et al., 2020). Aunque la mayoría de las investigaciones han hecho énfasis en que las estructuras del sistema límbico (p. ej. área tegmental ventral, núcleo accumbens) (Mela, 2006; Rossi y Stuber, 2018; Small, 2012) y de control homeostático de la ingesta (p. ej. hipotálamo) (Beutler et al., 2017; Rossi y Stuber, 2018) son los responsables del procesamiento de las señales que permiten el aprendizaje de preferencias; de manera reciente se ha propuesto que la corteza insular participa en el establecimiento de preferencias alimentarias, pues recibe información de los diferentes órganos de los sentidos, del contenido calórico de un alimento (Oliveira-Maia et al., 2012) e integra señales gustativas y viscerales necesarias para el establecimiento de memorias gustativas por medio de la fluctuación en la dinámica de liberación de neurotransmisores (Osorio-Gómez et al., 2021). Debido a lo anterior, el presente proyecto se



planteó como objetivo evaluar los cambios en la concentración extracelular de diferentes neurotransmisores en la CI durante la adquisición del CPS con el fin de comprender las bases neurobiológicas de la preferencia por el azúcar.



ANTECEDENTES

Aspectos generales del aprendizaje y la memoria

El aprendizaje es definido como el proceso mediante el cual se adquiere el conocimiento sobre el mundo (Goelet et al, 1986) y se conocen al menos dos formas básicas: aprendizaje asociativo y no asociativo. El *aprendizaje no asociativo* resulta de la experiencia con un solo estímulo; son ejemplos de este tipo de aprendizaje la habituación (decremento en la respuesta debido a la estimulación constante) y la sensibilización (incremento de la respuesta después de una estimulación intensa) (Squire, 1986). Por otro lado, el *aprendizaje asociativo* deriva de la conjunción entre dos o más estímulos (condicionamiento clásico) o de la asociación entre un estímulo, la emisión de una conducta y una consecuencia (condicionamiento instrumental) (Fiarovante, Antzoulatos y Byrne, 2008). De manera particular, el paradigma de *condicionamiento clásico* ha sido ampliamente utilizado en la ciencia para entender el aprendizaje asociativo. En dicho paradigma, un estímulo inicialmente neutro (estímulo condicionado o EC) que precede a un evento significativo (estímulo incondicionado o EI) adquiere la función de predictor del EI. Al generar esta asociación entre EC y EI, el animal producirá una conducta anticipatoria (respuesta condicionada o RC) cuando se presente el EC (Baxter y Byrne, 2006).

En lo que refiere a la memoria, esta ha sido definida como el proceso por el cual el conocimiento adquirido durante el aprendizaje es codificado, almacenado y posteriormente recuperado (Kandel et al., 2014). Al ser un fenómeno complejo, se han generado diferentes clasificaciones de la memoria dependiendo de la temporalidad en el almacenamiento y de la naturaleza de la información. En cuanto a la temporalidad, la memoria se divide en tres tipos; el primero de éstos, la *memoria inmediata*, define la capacidad de los organismos para mantener en la mente



experiencias sensoriales durante fracciones de segundo. El segundo tipo, la *memoria de corto plazo* (MCP) hace referencia a la capacidad de retener la información durante un periodo de tiempo que va de los segundos a los minutos. La tercera categoría temporal es la *memoria a largo plazo* (MLP), la cual implica la retención de información en una forma más permanente de almacenamiento que va desde los días hasta años de vida (Kandel et al., 2014). En lo que refiere al tipo de información, la memoria es categorizada en declarativa y no declarativa; la *memoria declarativa* o *explícita* involucra el almacenamiento de material relacionado a identificar características de los eventos como el “¿qué?”, el “¿dónde?” y “¿cuándo?” (Brozek, 1997), e incluye la memoria semántica, episódica, espacial y de reconocimiento. En contraparte, la *memoria no declarativa* o *de procedimiento* implica el aprendizaje de habilidades o asociaciones entre las que destacan el aprendizaje perceptivo, motor y asociativo (Reber, 2008).

Memoria de reconocimiento al sabor

Dentro del repertorio conductual de los animales, la memoria de reconocimiento favorece la identificación de la novedad/familiaridad y las características específicas de los eventos (Aggleton y Brown, 1999) y tiene variantes dependiendo de los diferentes tipos de información experimentados. En el caso particular del alimento, la memoria de reconocimiento al sabor constituye una de las habilidades evolutivas más importantes empleadas por los animales, pues refiere la capacidad para recordar la familiaridad del sabor y las consecuencias de ingerir alimentos (Bermúdez-Rattoni, 2004). Gracias a la investigación realizada en este campo, se ha identificado que cuando un organismo se encuentra con un nuevo sabor, este disminuye su consumo, lo que se conoce como respuesta neofóbica. Sin embargo, si este nuevo estímulo es asociado con una consecuencia negativa como el malestar gástrico, el consumo del estímulo gustativo disminuye en encuentros posteriores, formando un trazo mnémico de aversión



(Bermúdez-Rattoni, 2004). Por el contrario, si el nuevo estímulo carece de una consecuencia negativa, el estímulo se reconoce como seguro, lo cual incrementa su consumo, reflejando un aprendizaje similar a la habituación y que se denomina atenuación de la neofobia (Domjan, 1976).

Neuroquímica de la memoria de reconocimiento al sabor

Señalización glutamatérgica

Entre la gran cantidad de moléculas que ejercen efecto sobre la actividad neuronal, el glutamato representa el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso en mamíferos (Zhou y Danbolt, 2014). Este neurotransmisor se almacena en las vesículas sinápticas de las terminales nerviosas hasta que es liberado por exocitosis al espacio extracelular y ejerce su actividad a través de dos tipos de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos. En lo que refiere a los receptores ionotrópicos, los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y kainato son los representantes de este grupo. Por otro lado, los receptores metabotrópicos se encuentran conformados por los mGluR, los cuales están asociados a proteínas G de naturaleza excitatoria y se subdividen en tres grupos (Glu I, II y III) de acuerdo con la similitud de su secuencia de aminoácidos, farmacología y vías de señalización (Reznikov et al., 2011; Zhou y Danbolt, 2014).

Al ser el neurotransmisor excitador más abundante en el sistema nervioso, el glutamato se ha relacionado con diversos procesos cognitivos entre los que se encuentran el aprendizaje y la memoria (Zhou y Danbolt, 2014). En lo que refiere a la memoria de reconocimiento al sabor, los antecedentes muestran que el sistema glutamatérgico comprende el actor principal en la señalización de estímulos viscerales de naturaleza aversiva, pues se ha observado un incremento



en la actividad glutamatérgica en estructuras como la amígdala y la CI después de administrar un inductor de malestar gástrico por vía intraperitoneal (Miranda et al., 2002; Guzmán-Ramos et al., 2010; Osorio-Gómez et al., 2021). Asimismo, el incremento en la concentración extracelular de glutamato es relevante para la consolidación de memorias gustativas aversivas, ya que su bloqueo farmacológico por una antagonista de los receptores NMDA impide la consolidación de un condicionamiento de aversión al sabor (CAS) cuando se administra minutos después de la inducción del aprendizaje (Guzmán-Ramos et al., 2010).

Señalización noradrenérgica

Descubierta inicialmente en los nervios simpáticos de los mamíferos, la norepinefrina o noradrenalina es un neurotransmisor del sistema nervioso central involucrado en procesos como la regulación de la atención, la función cognitiva, la respuesta al estrés, entre otras (España et al., 2016). Aunque la norepinefrina puede provenir de dos proyecciones ascendentes primarias que se originan en el tronco encefálico, el locus coeruleus comprende el sitio predominante de producción de norepinefrina con proyecciones adrenérgicas hacia estructuras como la corteza, el hipocampo, el cerebelo, la amígdala, el hipotálamo, entre otras (Berridge y Waterhouse, 2003). Debido a que su función es principalmente moduladora, la norepinefrina ejerce sus efectos a través de su afinidad con receptores metabotrópicos asociados a proteínas G de naturaleza excitatoria (β -adrenérgicos y α -adrenérgicos tipo 1) e inhibitoria (α -adrenérgicos tipo 2) (España et al., 2016).

En lo que respecta a su papel en la memoria de reconocimiento, las investigaciones muestran que la norepinefrina incrementa su liberación basal en la CI y la amígdala durante la presentación de un estímulo gustativo novedoso y la administración de una solución por vía intraperitoneal (i. p.) independientemente de su valencia (Guzmán-Ramos et al., 2010; Osorio-Gómez et al., 2021). Ya



que la norepinefrina participa en la señalización tanto de información exteroceptiva como interoceptiva, se ha propuesto que juega un papel modulador en el establecimiento de la memoria gustativa de aversión (Osorio-Gómez et al., 2021).

Señalización dopaminérgica

Al igual que la norepinefrina, la dopamina es uno de los principales neuromoduladores en el sistema nervioso central de mamíferos que ha sido relacionado con procesos cognitivos entre los que destacan la señalización de la recompensa, la motivación, el control motor y el aprendizaje y la memoria (Bromberg-Martin et al., 2010). Los principales núcleos dopaminérgicos se encuentran en la región del mesencéfalo ventral, particularmente en la sustancia pars compacta y el área tegmental ventral (VTA), los cuales liberan dopamina de manera tónica y fásica (Grace et al., 2007). Así pues, mientras que la liberación tónica de dopamina mantiene un nivel basal constante de este neurotransmisor para permitir las funciones normales de los circuitos neuronales, la liberación fásica provoca grandes cambios en las concentraciones de dopamina en las estructuras blanco cuando se presenta un estímulo relevante (Schultz, 2007). Es importante mencionar que la dopamina ejerce sus efectos a través de 5 tipos de receptores, clasificados en dos familias. Por un lado, la familia de los receptores D1 se encuentra asociada a proteínas Gs excitatorias y está representada por los receptores D1 y D5. En cuanto a la familia de los receptores D2, estos actúan a través de proteínas Gi inhibitorias e incluye a los receptores D2, D3 y D4 (Beaulieu y Gainetdinov, 2011).

Se ha identificado que, al igual que la norepinefrina, la dopamina muestra un incremento en sus niveles en la CI y la amígdala ante la presentación de un estímulo novedoso, sin importar su valor positivo o negativo (valencia) (Osorio-Gómez et al., 2021). Asimismo, se ha encontrado que, si bien no participa en la señalización de una consecuencia posingestiva aversiva o inocua,



es relevante para la consolidación de memorias gustativas, pues el bloqueo farmacológico de los receptores tipo D1 en conjunto con el bloqueo de receptores glutamatérgicos tipo NMDA impide la consolidación del CAS (Guzmán-Ramos et al., 2010).

Con base en lo anterior, resulta evidente que recordar las consecuencias de ingerir alimentos es un factor determinante para el establecimiento de una memoria de reconocimiento gustativa, pues dota a los animales de la habilidad para discriminar entre sustancias que son seguras o tóxicas para el organismo. Sin embargo, aunque de manera experimental se ha observado la formación de trazos mnémicos de seguridad y aversión, también existen reportes que demuestran que los animales exhiben una preferencia hacia los alimentos cuando estos se encuentran asociados a efectos posingestivos positivos como la presencia de nutrientes (Berthoud et al., 2021). En términos adaptativos, el establecimiento de preferencia a los sabores es útil dentro del repertorio conductual de los organismos pues orienta la conducta de ingesta hacia el consumo de estímulos que representan un beneficio como el aporte de energía.

Establecimiento de preferencia a los sabores

De manera natural, algunos animales cuentan con reacciones innatas para guiar la ingesta de alimentos (ej. aceptación hacia la comida dulce o rechazo por sustancias amargas) (Touzani, Bodnar y Sclafani, 2010b). Aunado a ello se ha descrito que, con el paso del tiempo, los animales refinan estas respuestas y aprenden a reconocer los sabores de alimentos específicos que predicen la llegada de efectos posingestivos positivos (Touzani, Bodnar y Sclafani, 2010b; Galindo et al, 2012). Como evidencia se ha observado que algunas especies muestran preferencia hacia los alimentos cuando son asociados con consecuencias orales o post-orales positivas a través de un procedimiento de condicionamiento clásico denominado condicionamiento de preferencia al sabor (CPS) (Holman, 1975).



Condicionamiento de Preferencia al Sabor

El primer antecedente reportado sobre el establecimiento de preferencias fue realizado por Holman en 1975; este autor fue pionero al demostrar que el aprendizaje asociativo puede producir fuertes reacciones positivas a los sabores y que un sabor es preferido cuando es seguido por el consumo de glucosa (dulce y nutritivo), en comparación a un sabor asociado con la presentación de sacarina (dulce pero no nutritivo) (Myers, 2018). Si bien existen múltiples estrategias experimentales para generar preferencia hacia un alimento en particular, el CPS fue concebido como un protocolo de condicionamiento clásico en el que un sabor en particular (estímulo condicionado; EC) es asociado con una solución con efectos posingestivos positivos (estímulo incondicionado; EI) para generar preferencia hacia un estímulo gustativo (Touzani, Bodnar y Sclafani, 2010b).

Sustratos neurales del CPS

Aunque algunas de las estructuras neurales asociadas al establecimiento de preferencia al sabor han sido descritas de manera reciente (Berthoud et al., 2021; Shechter y Schwartz, 2018; Gutiérrez, Fonseca y Simon, 2020; Tan et al., 2020), para comprender la adquisición del CPS es necesario conocer tanto las vías asociadas al reconocimiento de sabores como las de señalización interoceptiva. En lo que refiere a la identificación del sabor, la codificación del trazo de memoria gustativa inicia con la transducción química de un nuevo sabor en la cavidad oral, donde las moléculas de los alimentos son detectadas por las papilas gustativas. Una vez que el estímulo gustativo ha sido identificado en la boca, la información sensorial llega a la porción rostral del núcleo del tracto solitario (NTS) a través de diferentes nervios craneales. Las neuronas del NTS activadas por el estímulo gustativo proyectan ipsilateralmente al núcleo parabraquial posteromedial (NPB), el cual envía la información hacia el hipotálamo, la amígdala, núcleo



accumbens y algunos núcleos del tálamo para llegar finalmente a estructuras corticales como la CI (Bermúdez-Rattoni, 2004; Gutiérrez, Fonseca y Simon, 2020). Por otro lado, en lo referente a la estimulación visceral (p. ej. gástrica e intestinal) y, de manera específica a la estimulación visceral con carbohidratos, se ha descrito que tanto la liberación de hormonas (ej. incremento en la concentración de insulina debida a la fluctuación en los niveles sanguíneos de glucosa) como la estimulación del décimo par craneal participan en la señalización de esta información hacia el encéfalo para permitir el desarrollo de preferencias. Con respecto a este último, se sabe que cuando los carbohidratos llegan al intestino después de su infusión por vía intragástrica o intestinal, los transportadores (ej. SGLT1 y GLUT-5) del sistema entérico estimulan las aferentes del ganglio nodoso del nervio vago para señalar esa información hacia la porción caudal del NTS (Gutiérrez, Fonseca y Simon, 2020; Tan et al., 2020). A partir de la transmisión hacia el NTS, poco se sabe sobre las estructuras cerebrales responsables del procesamiento de los carbohidratos como señal interoceptiva para el establecimiento de preferencia al sabor; sin embargo, mediante el uso de técnicas de imagenología, algunos estudios han reportado que las infusiones intestinal e intragástrica de glucosa aumentan la actividad BOLD (Señal neuronal dependiente de nivel de oxígeno en sangre) en estructuras como el núcleo accumbens, la amígdala y la CI (Tsurugizawa et al., 2009; Tsurugizawa y Unemaya, 2014).

Si bien los antecedentes muestran la participación de algunas estructuras cerebrales en la detección de señales gustativas y viscerales positivas, es preciso señalar que en la actualidad se sabe poco sobre las estructuras responsables de la integración de estas señales para el establecimiento de preferencia a los sabores. Al respecto, parece que los trabajos en torno a dilucidar los mecanismos neuronales del CPS se han concentrado en describir el papel funcional del eje que va desde el intestino hasta el NTS (Han et al., 2018; Tan et al., 2020), dejando de



lado la participación de estructuras corticales como la CI que, además de estar involucrada en procesos cognitivos como la memoria de reconocimiento (Bermúdez-Rattoni, 2004), ha demostrado ser un punto clave en la convergencia tanto de señales exteroceptivas como de señales interoceptivas (Simmons et al, 2013).

Corteza insular

En términos anatómicos, la CI es descrita como una estructura del sistema nervioso central que se localiza en el lóbulo temporal de primates y humanos (Jones et al., 2010), mientras que en roedores se encuentra ubicada a lo largo de la confluencia del surco rinal y la arteria cerebral medial (Bermúdez-Rattoni, 2014). En lo que refiere a sus funciones, la actividad de la CI ha sido relacionada con diversos procesos cognitivos, entre los que se encuentran la regulación emocional (Etkin et al., 2015), el aprendizaje y la memoria (Bermúdez-Rattoni et al., 2005), la interacción social (Rogers-Carter et al., 2018), el procesamiento del dolor (Starr et al., 2009) e información proveniente de los sentidos de la vista, tacto, olfato y gusto (Bermúdez-Rattoni, 2014).

Considerando su participación en la función del gusto y en el sistema de reconocimiento de sabores, la investigación generada en torno a la CI ha revelado que, anatómicamente se encuentra dispuesta en dos regiones que se encargan de codificar a los estímulos gustativos (Jezzini et al., 2010). La primera porción se restringe a la región anterior de la CI; esta porción constituye la corteza gustativa (CG), la cual se encarga de codificar la identidad de los estímulos (Yiannakas & Rosenblum, 2017; Wang et al., 2018). La principal evidencia que se tiene sobre este argumento proviene de los estudios realizados con electrofisiología e imagenología *in vivo* en los que se ha demostrado que poblaciones de neuronas entremezcladas responden a las cinco



cualidades básicas del gusto (Jones et al., 2007; Peng et al., 2015; Samuelson y Fontanini, 2017; Wang et al., 2018, Avery et al., 2020).

Si bien cada sabor posee una representación gustotópica en la corteza, también se ha encontrado que los sabores con la misma valencia (apetitivo o aversivo) activan áreas comunes con mayor frecuencia que dos sabores de valencia opuesta, lo que probablemente facilita la discriminación entre estímulos (Accolla et al., 2007). Asimismo, se sabe que la estimulación optogenética de los campos que representan los sabores dulces o amargos en la CG tiene efectos opuestos en pruebas de preferencia a lugar, generando aversión al contexto cuando las vías de lo amargo son activadas y preferencia al contexto cuando se estimulan las vías asociadas a la detección de sabores dulces (Peng et al., 2015). Con esto se mostró que, además de identificar el sabor, la CI participa en la codificación del valor hedónico de los estímulos.

La segunda porción de la CI, es decir, la porción posterior, ha sido relacionada con la identificación de estados internos del organismo (Frank, Kullman y Veit, 2013) pues su actividad se ve influenciada por la ingesta de grasa (Frank et al., 2012) o calorías (Wang et al., 2008). Estos resultados son acordes con otros trabajos en los que se ha reportado que la estimulación visceral, tanto con glucosa como con sacarina (edulcorante que no cuenta con una consecuencia calórica), aumentan la señal BOLD en la CI (Tsurugizawa y Unemaya, 2014). Si bien los hallazgos mencionados indican que las distintas porciones de la CI tienen una participación específica en el procesamiento de señales viscerales y gustativas (Schier, Blonde y Spector, 2016), existen trabajos que reportan cambios en la actividad de la CI anterior ante la entrega de estímulos en la cavidad oral y la presentación de estímulos viscerales (ej. malestar gástrico) (Guzmán-Ramos et al., 2010; Osorio-Gómez et al., 2021); esto demuestra el papel de la CI como un centro de integración para este tipo de señales (Jezzini et al., 2013).



Neuroquímica del CPS

Aunque se conocen algunas de las estructuras asociadas al establecimiento de preferencia a los sabores, los primeros trabajos enfocados en dilucidar los mecanismos que subyacen a la adquisición de preferencias se centraron en los procesos neuroquímicos. Los resultados principales muestran que la señalización de una consecuencia posingestiva nutritiva depende de la señalización de dopamina (DA), específicamente de los receptores tipo 1 (D1) (Sclafani et al., 2011, Touzani et al., 2010a, Touzani et al., 2010b) en estructuras como la amígdala (Touzani, Bodnar y Sclafani, 2009), el núcleo accumbens (Touzani, Bodnar y Sclafani, 2008) y la corteza prefrontal (Touzani et al., 2010a). Si bien la evidencia en torno a la participación de la dopamina en el aprendizaje de preferencias está altamente reportada, es importante mencionar que los cambios en las concentraciones extracelulares de este neurotransmisor se relacionan principalmente con los aspectos recompensantes de los estímulos (Touzani, Bodnar y Sclafani, 2010b). Como ejemplo de ello se puede mencionar la participación de los circuitos dopaminérgicos en el establecimiento de tareas de preferencia al lugar (Ågmo et al., 1995; Koo et al., 2012) y condicionamiento instrumental apetitivo (Smith-Roe y Kelley, 2000).

Tomando en cuenta estos antecedentes, se hace evidente que existe poca información sobre los sistemas de neurotransmisión encargados de señalar la asociación entre un estímulo gustativo y las consecuencias posingestivas positivas. Sin embargo, existen antecedentes en los que se demuestra que la neuroquímica de la CI anterior es relevante para la detección y asociación de señales extero- e interoceptivas (Guzmán-Ramos et al., 2010; Osorio-Gómez et al., 2021). Mediante el uso de microdiálisis *in vivo*, se ha encontrado que la presentación de un estímulo gustativo novedoso, independientemente de su valencia innata (apetitivo o aversivo), incrementa los niveles extracelulares de norepinefrina (NE) y dopamina (DA) en la CI; por otro lado, se



reporta que la administración intraperitoneal de un agente inductor de malestar gástrico (LiCl), que es considerado como una consecuencia posingestiva aversiva, promueve un incremento en la liberación de glutamato (GLU) que no se observa cuando se inyecta una solución isotónica o hipertónica de cloruro de sodio (NaCl) (Osorio-Gómez et al., 2021). Los datos anteriores sugieren que los sistemas de neurotransmisión catecolaminérgicos y glutamatérgicos en la porción anterior de la CI participan en la señalización de señales gustativas y viscerales, respectivamente.

Es importante mencionar que, además de su participación en el procesamiento de la estimulación gustativa y visceral, la norepinefrina, la dopamina y el glutamato intervienen en la formación de memorias de reconocimiento al sabor. Al respecto, se ha reportado que el bloqueo de los receptores glutamatérgicos NMDA en la CI 30 minutos después de la asociación entre una solución de sacarina y una inyección intraperitoneal de LiCl impide la consolidación de una memoria aversiva de largo plazo (MLP) sin afectar la memoria a corto plazo (MCP) (Guzmán-Ramos et al., 2010). De manera similar, aunque el bloqueo de los receptores dopaminérgicos deja intacto el establecimiento del trazo de aversión, cuando se administra de manera conjunta con antagonistas de los receptores NMDA 30 minutos después de la adquisición del CAS, potencia su efecto amnésico sobre la consolidación de la memoria, impidiendo que los animales muestren aversión al sabor durante la prueba de MLP (Guzmán-Ramos et al., 2010). Por otro lado, se sabe que la administración de un antagonista de los receptores NMDA (AP5) en la CI antes o después de la presentación del EC genera déficits en la memoria a corto y largo plazo de aversión, respectivamente. Asimismo, el bloqueo de los receptores corticales tipo D1 antes de la presentación del estímulo gustativo impide la consolidación de la MLP (Osorio-Gómez et al., 2021). Estos resultados sugieren que los sistemas de neurotransmisión glutamatérgicos, a través



de los receptores NMDA, y catecolaminérgicos D1 son requeridos durante la adquisición y consolidación de la memoria de reconocimiento al sabor aversiva.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque en la literatura se reporta que el establecimiento de preferencia a los sabores tiene un importante rol adaptativo, actualmente existe poca información sobre la neuroquímica asociada a la señalización de los estímulos gustativos y los efectos posingestivos positivos necesarios para el establecimiento del CPS. Debido a que se ha propuesto que los cambios en los niveles de DA y NE en la CI se encargan de señalar la presentación de un estímulo gustativo y que la fluctuación en la concentración extracelular de glutamato cortical interviene tanto en la señalización de las consecuencias viscerales como en el establecimiento del trazo de memoria, resulta necesario evaluar la dinámica de liberación de neurotransmisores en la CI durante la adquisición del CPS para determinar su participación en el establecimiento de preferencias. Comprender los sistemas de neurotransmisión asociados al establecimiento de preferencias hacia los alimentos resulta relevante para entender la neurobiología de conductas como el sobreconsumo de comida con alto contenido energético que se relacionan a su vez con enfermedades como la obesidad, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar los cambios en los niveles extracelulares de glutamato, norepinefrina y dopamina de la corteza insular durante la adquisición del CPS y su participación funcional en el establecimiento de dicha memoria.



Objetivos particulares

1. Estandarizar un protocolo de condicionamiento de preferencia al sabor inducido por la administración intraperitoneal de glucosa.
2. Monitorear, por medio de la técnica de microdiálisis en libre movimiento, los cambios en los niveles extracelulares de glutamato, norepinefrina y dopamina en la corteza insular ante la presentación de sacarina y una inyección intraperitoneal de glucosa durante la adquisición del condicionamiento de preferencia al sabor.
3. Evaluar el papel funcional de los neurotransmisores glutamato, norepinefrina y dopamina en el establecimiento de preferencia al sabor mediante el uso de antagonistas específicos.

HIPÓTESIS

1. La presentación de un sabor novedoso (sacarina) y un estímulo posingestivo positivo (glucosa) generarán cambios en los niveles extracelulares de glutamato, norepinefrina y dopamina en la corteza insular, los cuales serán relevantes para el establecimiento del CPS.

METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular con un peso de entre 280-320 gramos. Los animales se mantuvieron individualizados en cajas de acrílico en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con agua y comida *ad libitum*, excepto cuando se indique lo contrario. Todas las manipulaciones experimentales que se describen en este apartado se realizaron durante el periodo de luz (CICUAL DOG159-20).



EXPERIMENTO 1: Estandarización del protocolo de condicionamiento de preferencia al sabor

Privación de agua y línea base

Durante el primer día del protocolo los animales fueron privados de agua. Después de un periodo de 24 horas, se les colocó un bebedero con 30 ml de agua en la caja de cada rata durante 15 minutos y se registró el consumo de líquido total. Este procedimiento se realizó durante 3 días para obtener una línea basal de consumo (ver figura 1). Cabe mencionar que, por las tardes, a los animales también se les proporcionó un bebedero con 30 ml de agua durante 15 minutos con el fin de evitar su deshidratación.

Curva dosis-respuesta

Para determinar la dosis de glucosa que fue empleada como EI, se realizó una curva dosis - respuesta. La evaluación de dicha curva consistió en lo siguiente: durante 15 minutos, los animales fueron expuestos a dos bebederos de sacarina (Sac) 0.3%, cada uno con un volumen de 30 ml de la solución. 15 minutos después de la retirada de los bebederos, los animales recibieron 7.5 ml/kg de NaCl 0.9% (n=11) o distintas dosis de glucosa [37.5 mg/kg (n=3); 75 mg/kg (n=6); 150 mg/kg (n=6); 350 mg/kg (n=8)] de manera intraperitoneal dependiendo del grupo. Los dos días siguientes se tomaron las líneas base de consumo de agua y durante el tercer día (72 hrs después), a los animales se les presentó nuevamente un bebedero con 30 ml de Sac 0.3% y un bebedero con 30 ml de agua con el fin de calcular el índice de preferencia ($IP = \frac{\text{Consumo de sacarina}}{\text{Consumo de sacarina} + \text{consumo de agua}}$) (ver figura 1).

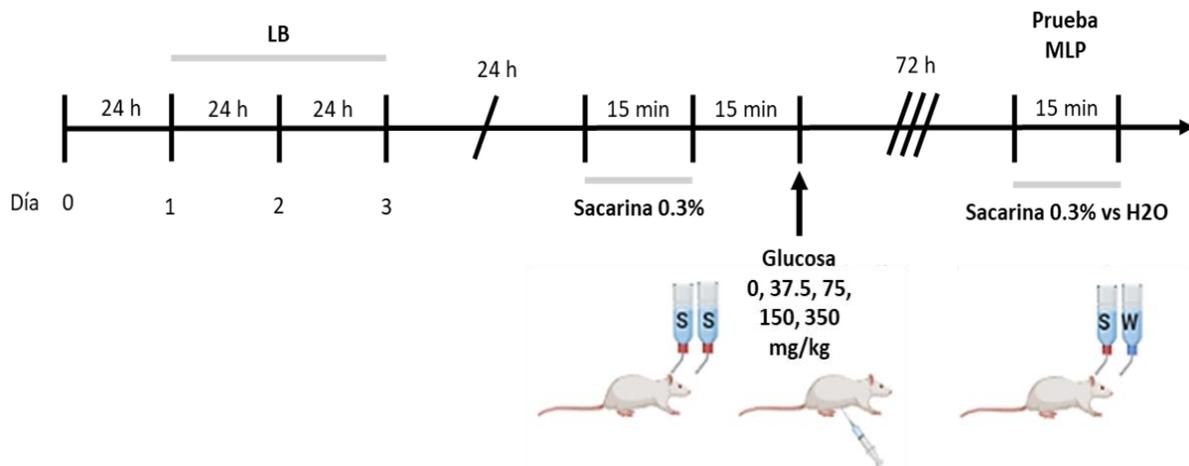


Figura 1. Protocolo curva dosis-respuesta. Después de 24 horas de privación de agua, se estableció una línea basal (LB) de consumo. Para ello, a los animales se les presentaron 2 botellas con 30 ml de agua por tres días consecutivos. El día de la adquisición, los animales fueron expuestos a dos botellas con sacarina (Sac) 0.3% durante 15 minutos y 15 minutos después del término de consumo, fueron inyectados con diferentes dosis (0, 37.5, 75, 150 o 350 mg/kg) de glucosa. 72 horas más tarde se realizó la prueba de memoria a largo plazo (MLP) en la que se evaluó la preferencia de los animales al presentar un bebedero con agua y otro con sacarina 0.3% por un lapso de 15 minutos. La S en las botellas representa a la sacarina, mientras que la W hace referencia al agua.

Condicionamiento de Preferencia al Sabor

Una vez que se estableció la dosis de glucosa empleada como EI, se evaluó la robustez de la memoria de preferencia al sabor. Para ello, se privó a los animales de agua durante 24 horas y durante los siguientes tres días se estableció una línea basal de consumo. El día de la adquisición, se presentaron dos bebederos, cada uno con 30 ml de sacarina 0.3%, y 15 minutos después del término de consumo se administró una inyección de glucosa con la dosis elegida (n=5). Setenta y dos horas posteriores al entrenamiento se realizó una prueba (Test 1) mediante la presentación de una botella con sacarina 0.3% y agua y este procedimiento se repitió 24 horas después (Test 2)

para obtener un registro del índice de preferencia de las soluciones a lo largo del tiempo (ver figura 2).

Es importante mencionar que, con el fin de comparar el efecto de las consecuencias posingestivas sobre el consumo de una nueva solución, el día de la adquisición dos grupos diferentes de animales recibieron dos bebederos con sacarina 0.3% y 15 minutos después recibieron una inyección i. p. de NaCl 0.15 M (n=5) o LiCl 0.4 M (n=5), los cuales se consideran efectos posingestivos inocuos o aversivos, respectivamente. 72 horas después (Test 1) se realizó una prueba de dos botellas para calcular el índice de preferencia hacia la solución condicionada. Este procedimiento se repitió 24 horas después (Test 2)

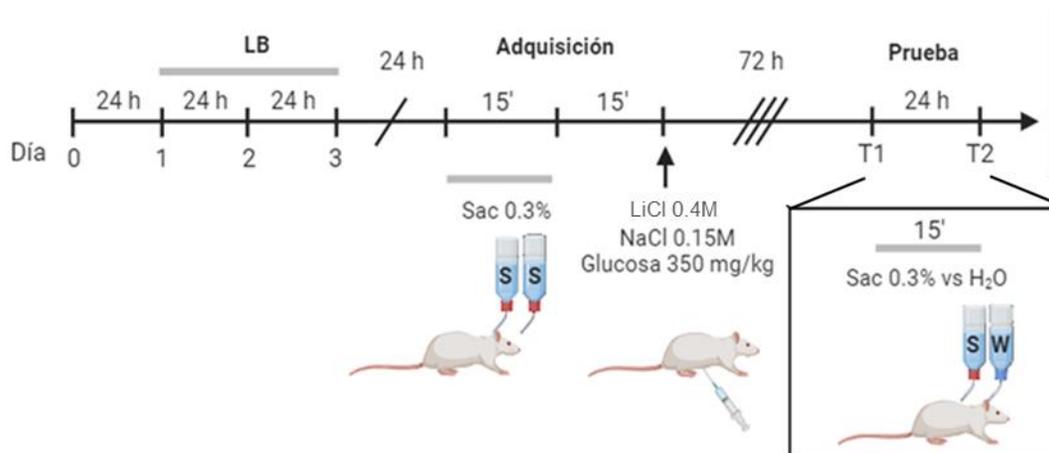


Figura 2. Protocolo consecuencias posingestivas. Se estableció una línea basal (LB) de consumo después de 24 horas de privación de agua. Para ello, se presentaron 2 botellas con 30 ml de agua por tres días consecutivos. En el día de la adquisición, los animales fueron expuestos a dos botellas con sacarina (Sac) 0.3% durante 15 minutos y 15 minutos después del término de consumo, fueron inyectados i. p. con LiCl 0.4M, NaCl 0.15M o glucosa 350 mg/kg. 72 horas más tarde, se evaluó la preferencia de los animales en una prueba de dos botellas en la que se presentó un bebedero con agua y otro con sacarina 0.3%. La S en las botellas representa a la sacarina, mientras que la W hace referencia al agua.



EXPERIMENTO 2: Monitoreo de la actividad neuroquímica de la CI

Implantación de cánulas

Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con una mezcla de ketamina (70 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg), para ser colocados posteriormente en un estereotáxico donde se les implantaron cánulas guía de manera unilateral en la corteza insular (CI) (*AP*: +1.2, *ML*: ± 5 , *DV*: -4.5 con respecto a Bregma) (Paxinos y Watson, 1998). Las cánulas fueron fijadas al cráneo con dos tornillos, cemento dental acrílico y pegamento. Con el fin de evitar posibles infecciones, al término de la cirugía se administró antibiótico, antimicótico y yodo por vía tópica alrededor de la lesión y se permitió un periodo de recuperación postquirúrgico de una semana. En la Figura 1 del Anexo se muestra una imagen representativa de la implantación unilateral de la cánula guía de microdiálisis en la CI.

Privación de agua y línea base

Una vez concluida la semana de recuperación, los animales fueron privados de agua por un periodo de 24 horas y, durante los siguientes tres días, fueron habituados en una cámara de microdiálisis (Bioanalytical System Inc., E. U. A.) donde se les colocó un solo bebedero con 30 ml de agua durante 15 minutos con el fin de asegurar la especificidad del estímulo. Cada día se registró el consumo de líquido total para establecer una línea basal de ingesta (ver figura 3) y, por las tardes, a los animales se les proporcionó un segundo bebedero con 30 ml de agua para evitar su deshidratación.



Microdiálisis in vivo

a) Recolección de muestras

El día del entrenamiento, se conectó una sonda de diálisis con una membrana de 3 mm de largo (CMA, Suecia) a una bomba de microinfusión (CMA, Suecia) mediante un sistema de tuberías que permitió el flujo de líquido cerebrospinal artificial (solución Ringer) (NaCl 125 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄H₂O 1.25 mM, MgSO₄7H₂O 1.5 mM, NaHCO₃ 26 mM, CaCl₂ 2.5 mM, glucosa 10 mM) a una velocidad de 1 µl/min. Después de comprobar la funcionalidad del sistema, la sonda fue insertada dentro de la cánula guía y se dejó un periodo de estabilización de una hora en el que se descartó la muestra dializada. Concluido el periodo de estabilización, los dializados fueron recolectados cada 4 minutos en tubos eppendorfs que contenían 1.0 µl de mezcla antioxidante (ácido ascórbico 0.25 mM, Na₂EDTA 0.27 mM, ácido acético 0.1 M) para después ser congelados a una temperatura de -80°C, para su posterior análisis. Las primeras tres muestras recolectadas fueron consideradas como línea basal de concentración de neurotransmisores y, a partir de la cuarta muestra, se dio inicio a la presentación de estímulos como se describe en el siguiente apartado (ver figura 3).

b) Protocolo conductual

El día del condicionamiento, a los animales se les presentaron diferentes estímulos dependiendo del grupo (ver figura 3).

- Al grupo condicionado (Sacarina-Glucosa) se le presentó un bebedero con 30 ml de sacarina 0.3% (Sigma – Aldrich) durante 15 minutos, el cual fue seguido por una inyección intraperitoneal de glucosa (350 mg/kg, 7.5 ml/kg) 15 minutos después del término del consumo.

- A los animales del grupo no condicionado (Sacarina-NaCl) se les presentó un bebedero con 30 ml de sacarina 0.3% durante 15 minutos y 15 minutos después recibieron una inyección i. p. de NaCl (0.9%, 7.5 ml/kg) (Sigma – Aldrich, E. U. A.) que no genera preferencia hacia el estímulo gustativo.
- En el último grupo (H₂O-Glucosa), los animales tuvieron acceso por 15 minutos a un bebedero con agua y 15 minutos después fueron inyectados i. p. con glucosa (350 mg/kg, 7.5 ml/kg).

24 horas después del entrenamiento se realizó la prueba de memoria a largo plazo para cada grupo, en la que se presentó un bebedero con 30 ml de Sac 0.3% por un periodo de 15 minutos y durante la cual se registró el consumo.

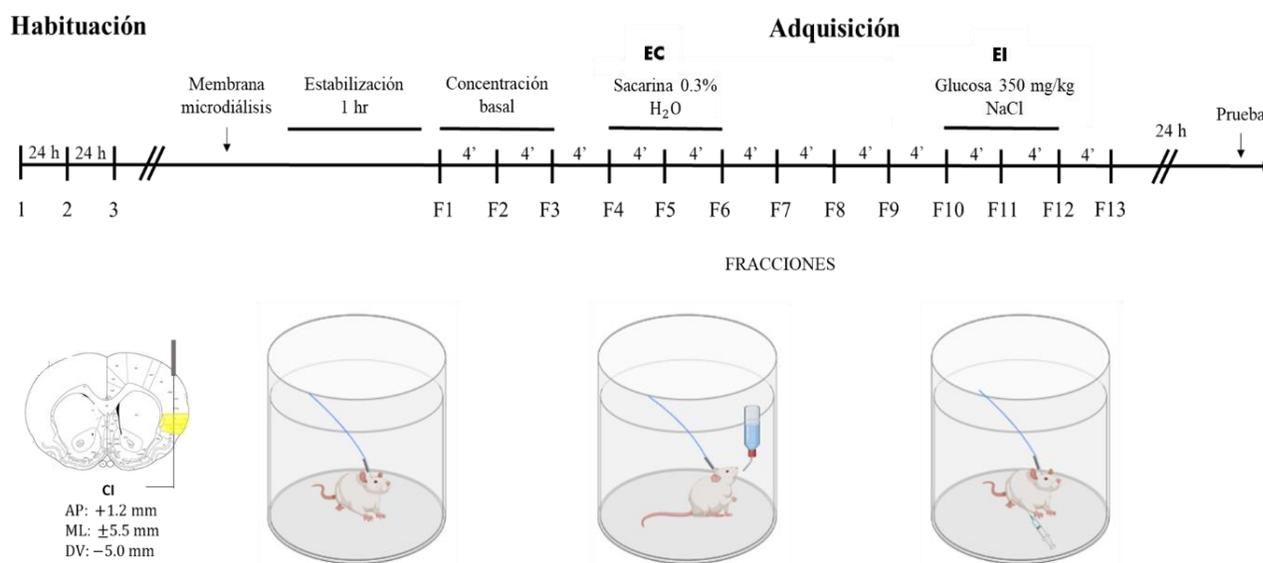


Figura 3. Protocolo de microdiálisis en libre movimiento. Después de 24 horas de privación de agua, a los animales se les presentó 1 botella con 30 ml de agua durante el plazo de tres días para establecer una línea basal de consumo (LB). El día de la adquisición, se colocó la membrana de microdiálisis en las cánulas guía de los animales operados y, posteriormente, se permitió un periodo de estabilización de una hora. Al término de dicho periodo, se inició la recolección de muestras de dializado cada 4 minutos. Después de recolectar las tres primeras, se presentó un bebedero con 30 ml de Sac 0.3% durante 15



minutos y 15 minutos después del término de consumo, los animales recibieron una inyección i. p. de glucosa 350 mg/kg. 24 horas después se realizó la prueba de dos botellas para evaluar el índice de preferencia.

c) Análisis de muestras

El análisis de los dializados se realizó utilizando el equipo de electroforesis capilar micelar por detección de fluorescencia inducida por láser. Para ello, las muestras fueron procesadas por derivatización de la siguiente manera: en primer lugar, se secaron alícuotas con 10 μ l de FQ ((3-(2-furoil)quinolina-2-carboxaldehído, Moléculas Probes Invitrogen, E. U. A.) 10 mM en una cámara de vacío; una vez secas, se añadieron 6 μ l de metanol, 4.5 μ l de muestra, 2 μ l de KCN 25 mM y 1 μ l de estándar interno (O-metil-L-treonina) 7.5 mM a las alícuotas y se permitió que los componentes reaccionaran por 15 minutos bajo condiciones de oscuridad a 65°C en un baño termostático.

Extracción de cerebros

El día después la prueba, los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico y perfundidos transcárdialmente con solución salina (SS o NaCl 0.9%) durante 5 minutos para limpiar el tejido. Posteriormente, se extrajeron los cerebros y se depositaron en frascos con paraformaldehído 4% en buffer de fosfatos salino (PBS; pH=7.4). En los días siguientes, los cerebros fueron transferidos a un gradiente de soluciones crioprotectoras de sacarosa al 10%, 20% y 30% en PBS y, finalmente, se obtuvieron secciones coronales de 40 μ m de grosor de cada cerebro para verificar la correcta implantación de las cánulas de microdiálisis mediante la tinción con violeta de cresilo.



EXPERIMENTO 3: Evaluación del papel funcional de los sistemas de neurotransmisión mediante el uso de antagonistas específicos

Implantación de cánulas

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (70 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) administrada por vía intraperitoneal para después ser colocados en un aparato estereotáxico. Tras la aplicación de lidocaína como anestésico local (20mg/mL, 0.3mL), se realizó una incisión en el cuero cabelludo para exponer el cráneo y, posteriormente, se implantaron, de manera bilateral, cánulas guía de acero inoxidable de 9 mm en la CI (AP: +1.2 mm; ML: \pm 5.5 mm; DV: -3.0 mm respecto a Bregma) (Paxinos y Watson, 1998). Las cánulas guía se fijaron al cráneo con dos tornillos, cemento dental y pegamento. Se colocaron estiletes de acero inoxidable dentro de las cánulas para evitar su oclusión (en la Figura 2 del Anexo se muestra una fotografía representativa de la lesión bilateral en la CI debida a la implantación de cánulas de farmacología). Posteriormente, se aplicó una mezcla de terramicina (antibiótico) y ketoconazol (antimicótico) con el fin de evitar infecciones. Después de la cirugía, se estableció un periodo de recuperación de una semana, durante los cuales se realizaron controles de salud y se sustituyeron los estiletes faltantes. Los procedimientos conductuales y farmacológicos comenzaron 7 días después de la cirugía.

Efecto de la administración de AP5, propranolol y SCH en el establecimiento del CPS

Para evaluar el papel funcional de glutamato, norepinefrina y dopamina en el establecimiento del CPS, el día de la adquisición los animales fueron expuestos a dos bebederos, cada uno con 30 mL de sacarina 0.3% durante 15 minutos. Dependiendo del grupo, 15 minutos después del término de consumo se inyectó 1 μ l por hemisferio (0.5 μ l/min) de ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico (AP5; 10 mg/ μ l) (n=9), propranolol (PROP; 5 mg/ μ l) (n=9), SCH-23390

(SCH; 2 mg/ μ l) (n=9) o SS intracorticalmente (n=10). Inmediatamente después los animales recibieron una inyección i. p. de glucosa 350 mg/kg. 72 horas más tarde se realizó la prueba de memoria a largo plazo (MLP) en la que se presentó una botella con sacarina 0.3% y una botella con agua para calcular tanto el consumo como el índice de preferencia.

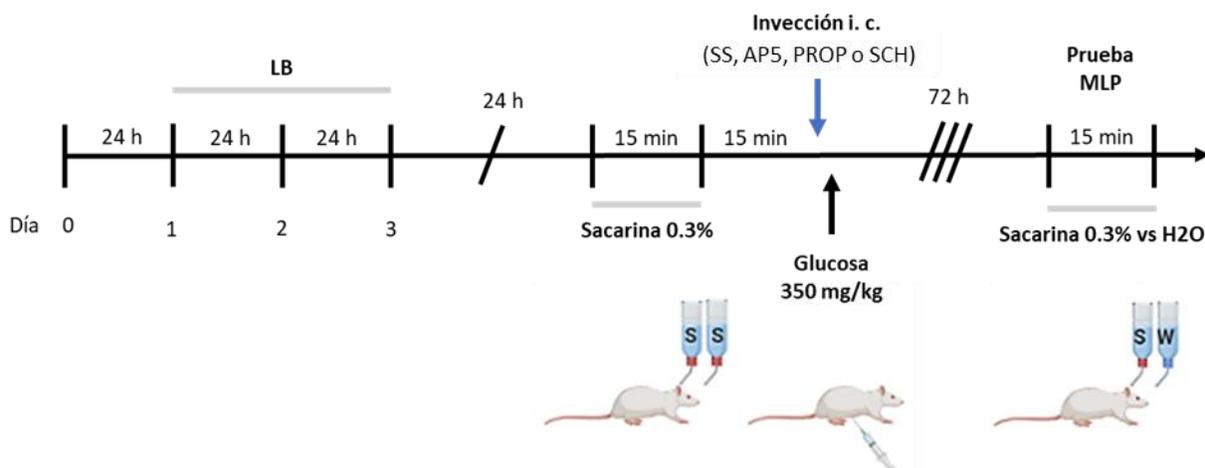


Figura 4. Protocolo de administración de antagonistas específicos previo a la inducción de CPS. Se estableció una línea basal (LB) de consumo después de 24 horas de privación de agua. Para ello, se presentaron 2 botellas con 30 ml de agua por tres días consecutivos. En el día de la adquisición, los animales fueron expuestos a dos botellas con sacarina (Sac) 0.3% durante 15 minutos y, dependiendo del grupo, 15 minutos después del término de consumo fueron inyectados i. c. con AP5, propranolol, SCH O SS. Inmediatamente después, se les administró glucosa 350 mg/kg por vía i. p. 72 horas más tarde, se evaluó la preferencia de los animales en una prueba de dos botellas en la que se presentó un bebedero con agua y otro con sacarina 0.3%. La S en las botellas representa a la sacarina, mientras que la W hace referencia al agua.

Efecto de la administración de AP5, propranolol y SCH sobre la consolidación del CPS

Para evaluar la participación de glutamato, norepinefrina y dopamina en la formación del trazo de memoria, el día de la adquisición los animales fueron expuestos durante 15 minutos a dos bebederos con sacarina 0.3%; 15 minutos después del término de consumo se inyectó glucosa 350 mg/kg por vía i. p. y, dependiendo del grupo, 30 minutos después se administró 1 μ l (0.5 μ l/min) de AP5, PROP, SCH-233990 o SS de manera intracraneal. Posteriormente se evaluó la memoria a corto (4 horas) ($n_{AP5}=9$, $n_{PROP}=10$, $n_{SCH}=9$, $n_{SS}=9$) y largo (72 horas) ($n_{AP5}=8$, $n_{PROP}=8$, $n_{SCH}=8$, $n_{SS}=10$) plazo durante las cuales se presentó una botella con sacarina 0.3% y una botella con agua para obtener el consumo y calcular el índice de preferencia.

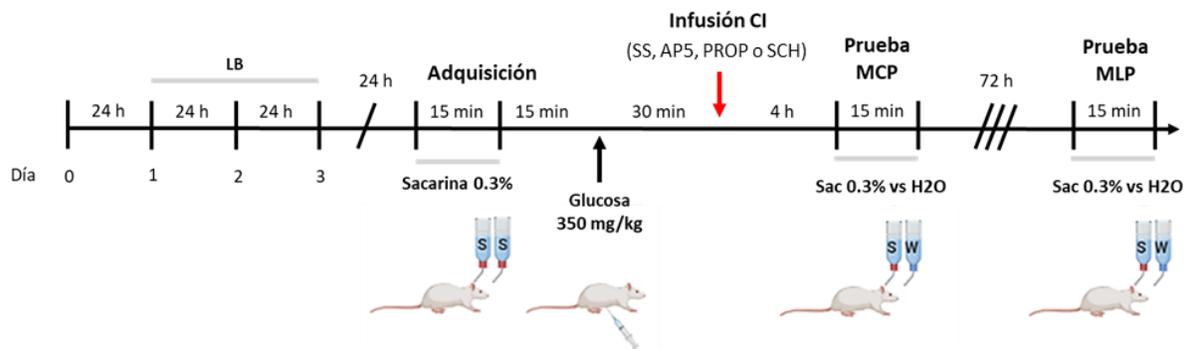


Figura 5. Protocolo de administración de antagonistas específicos posterior a la inducción de CPS.

24 horas después de ser privados de agua, por tres días a los animales se les presentaron 2 botellas con 30 ml de agua para establecer una línea basal de consumo (LB). En el día de la adquisición, los animales fueron expuestos a dos botellas con sacarina (Sac) 0.3% durante 15 minutos y 15 minutos después se les administró glucosa 350 mg/kg por vía i. p. Dependiendo del grupo, 30 minutos después de la inducción del CPS los animales fueron inyectados i. c. con AP5, propranolol, SCH o SS y se evaluó la memoria a corto plazo (MCP) y largo plazo (MLP) 4 y 72 horas más tarde, respectivamente. En cada una de las pruebas se evaluó la preferencia de los animales al colocar dos bebederos, uno con agua y otro con sacarina 0.3%. La S en las botellas representa a la sacarina, mientras que la W hace referencia al agua.



Presentación de datos y análisis estadístico

En primer lugar, los datos obtenidos en los experimentos conductuales se representaron como índices de preferencia, los cuales fueron calculados mediante la fórmula *índice de Preferencia = Consumo de sacarina (ml) / consumo de sacarina + consumo de agua (ml)*.

Para el experimento de curva dosis respuesta, las medias del índice de preferencia de cada grupo fueron sometidas a un análisis de varianza (ANOVA) de un factor (dosis) con comparaciones múltiples realizadas a través de la prueba post hoc de Fisher LSD. Asimismo, los datos fueron sometidos a pruebas t de una sola muestra para identificar diferencias entre las medias de cada grupo respecto al valor del índice que representa la indiferencia entre el consumo de agua y sacarina (media hipotética de 0.5). En lo que respecta al experimento de consecuencias posingestivas, las medias de cada grupo fueron analizadas por medio de una prueba ANOVA de medidas repetidas para dos factores (consecuencia posingestiva y etapa del entrenamiento).

En cuanto a los experimentos de microdiálisis *in vivo*, la representación de la concentración extracelular de neurotransmisores durante la presentación de los estímulos gustativos y viscerales se llevó a cabo promediando el porcentaje de liberación de cada neurotransmisor (glutamato, norepinefrina y dopamina) respecto a la liberación basal por grupo. Posteriormente, se promediaron tres fracciones recolectadas consecutivas para representar cada valor en la gráfica. En cuanto al análisis estadístico, para evaluar las diferencias entre estímulo para cada neurotransmisor se utilizó la prueba de t para muestras no pareadas. Además, los datos fueron analizados con la prueba t de una sola muestra con el fin de identificar diferencias entre las medias de porcentaje de liberación de cada grupo respecto al porcentaje de liberación basal de cada neurotransmisor (media hipotética de 100).



Para determinar el tipo de estadística a utilizar en cada experimento, los datos fueron analizados usando la prueba de normalidad Shapiro-Wilk y la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas. Todos los datos fueron representados como medias \pm error estándar (SEM) y analizados con el programa GraphPad Prism versión 8. En todos los análisis estadísticos se consideró un valor $p < 0.05$ como resultado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Curva dosis respuesta para el establecimiento del CPS

Con el fin de determinar la dosis de glucosa que sería empleada como EI, se evaluó el efecto de la administración de diferentes dosis de glucosa sobre el consumo de sacarina por medio de una prueba ANOVA de una vía. El análisis mostró la existencia de diferencias significativas entre los grupos ($F_{(4, 29)} = 3.065, P=0.0319$). Cuando se aplicó la prueba de Fisher para las comparaciones múltiples, se encontró que solo el grupo inyectado i. p. con una dosis de glucosa 350 mg/kg ($n=8$) fue diferente contra el grupo control de NaCl ($n=11$) ($P=0.0024$). Asimismo, al comparar la media de puntaje de los grupos respecto al azar (media hipotética de 0.5), se identificó que únicamente el grupo que recibió la inyección de glucosa 350 mg/kg (media 350 mg/kg = $0.7823 \pm 0.0417, t_{(7)} = 6.757, P=0.0003$) mostró preferencia por el consumo de sacarina en la prueba a largo plazo. Por el contrario, los animales en los que se administró glucosa en dosis de 37.5 (media 37.5 mg/kg = $0.477 \pm 0.109, t_{(2)} = 0.207, P=0.854, n=3$), 75 (media 75 mg/kg = $0.482 \pm 0.154, t_{(5)} = 0.111, P=0.916, n=6$) y 150 mg/kg (media 150 mg/kg = $0.628 \pm 0.128, t_{(5)} = 1.006, P=0.360, n=6$) no resultaron ser diferentes al azar (ver figura 4). Estos datos demuestran que la inducción del CPS después de un solo ensayo es posible al asociar el consumo de un sabor novedoso con una inyección i p. de glucosa 350 mg/kg.

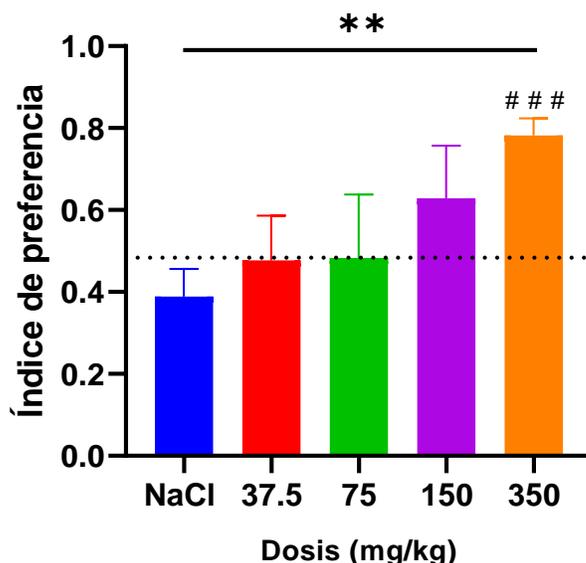


Figura 4. Curva dosis respuesta para el establecimiento del CPS. Los animales inyectados i. p. con glucosa de 350 mg/kg muestran preferencia por el consumo de sacarina el día de la prueba, mientras que el resto de los grupos inyectados con glucosa no exhiben diferencias respecto al grupo de NaCl. Datos representados como media del índice de preferencia \pm SEM para cada grupo.

** $P < .01$ NaCl vs Glucosa 350 mg/kg, ### $P < .001$ respecto al azar

La memoria de reconocimiento al sabor está relacionada con las consecuencias posingestivas

Con el fin de comparar el efecto de diferentes consecuencias posingestivas sobre el consumo de un sabor novedoso, en grupos independientes se asoció la presentación de sacarina 0.3% con la administración i. p. de glucosa 350 mg/kg (n=5), LiCl 0.4 M (n=5) y NaCl 0.9% (n=5). Los resultados obtenidos se compararon mediante una prueba ANOVA de medidas repetidas y, como se muestra en la figura 2, el análisis no mostró diferencias significativas entre los grupos debido a la etapa del protocolo conductual ($F_{(2, 26)} = 1.869, P = 0.174$). Por el contrario, se observó un efecto atribuido a la consecuencia posingestiva ($F_{(2, 26)} = 14.66, P < 0.001$) y a la interacción del



momento de evaluación con el efecto posingestivo administrado ($F_{(4,5)} = 6.338$, $P=0.034$). Cuando se realizaron las comparaciones múltiples por medio de la prueba de Fisher, considerando la solución intraperitoneal como factor, se encontró que ninguno de los grupos fue diferente entre sí el día de la adquisición. Sin embargo, durante el Test 1, el grupo tratado con glucosa fue significativamente distinto respecto a los grupos de NaCl ($P=0.008$) y LiCl ($P<0.0001$). Asimismo, cuando se realizó la comparación entre los animales inyectados con NaCl contra los animales tratados con LiCl, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P=0.010$). En lo que respecta al Test 2, el análisis mostró diferencias entre el grupo de glucosa contra los grupos de NaCl ($P=0.041$) y LiCl ($P<0.001$), a la vez que se observaron diferencias entre los animales tratados con NaCl y LiCl intraperitoneal ($P=0.015$) (ver figura 5). Estos resultados muestran que, aunque en el día de la adquisición todos los grupos exhibieron una disminución en el consumo de sacarina (neofobia), durante el día de la prueba solo el grupo en el que se asoció el consumo de sacarina con el efecto posingestivo positivo de la glucosa mostró preferencia por el sabor novedoso al incrementar su consumo. De manera particular, la preferencia por la sacarina se mantuvo hasta 96 horas (Test 2) después de haber realizado el condicionamiento, por lo que se concluye que el protocolo de CPS genera una memoria robusta de preferencia al sabor. En el caso de los animales a los que se les administró NaCl 0.15 M y LiCl 0.4 M se observaron los fenómenos de atenuación de la neofobia y condicionamiento de aversión al sabor, respectivamente, los cuales han sido descritos previamente en la literatura (Bermúdez-Rattoni, 2004). Los datos anteriores indican que la decisión de ingerir un nuevo sabor depende de las consecuencias posingestivas asociadas a la ingesta de un alimento y que esta respuesta cambia a lo largo del tiempo.

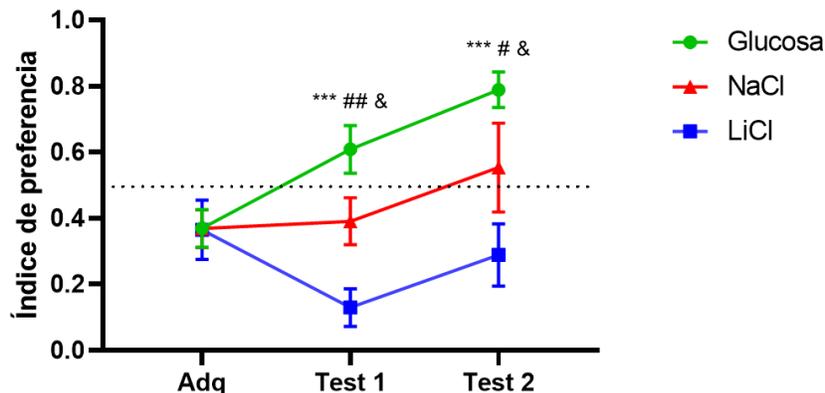


Figura 5. La memoria de reconocimiento está asociada con las consecuencias posingestivas. Los animales inyectados i. p. con 350 mg/kg de glucosa muestran preferencia por el consumo de sacarina el día de la prueba (Test 1), mientras que los grupos que fueron inyectados con NaCl y LiCl mostraron los fenómenos de atenuación de la neofobia y aversión al sabor, respectivamente. Datos representados como media del índice de preferencia \pm SEM para cada grupo.

*** $P < .001$ Glucosa vs LiCl, # $P < .05$, ## $P < .01$ Glucosa vs NaCl, & $P < .05$ NaCl vs LiCl

Cambios en la liberación de glutamato ante la presentación de estímulos gustativos y viscerales

Para evaluar los cambios en los niveles extracelulares de glutamato, se promediaron los porcentajes de liberación de este neurotransmisor durante al consumo de agua ($n=6$) y sacarina 0.3% ($n=16$). Los datos se compararon por medio de una prueba t de muestras independientes y, como se muestra en la figura 6A, el análisis no mostró diferencias significativas entre los estímulos gustativos ($t_{(55)} = 0.162$, $P=0.871$). Asimismo, cuando se realizó una prueba t de una sola muestra para comparar las medias de los grupos respecto al porcentaje de liberación basal, se encontró que ninguno fue diferente respecto al 100% (media H₂O = $124.9\% \pm 13.870$, $t_{(18)} = 1.799$, $p=0.089$; media Sac = $122.1\% \pm 9.927$, $t_{(39)} = 2.228$, $p=0.031$). Estos resultados indican



que la presentación de los estímulos gustativos no genera cambios en la liberación cortical de glutamato.

Posteriormente, para evaluar los cambios en la liberación de glutamato ante la estimulación visceral, se compararon las medias de los porcentajes de liberación de este neurotransmisor frente a la inyección i. p. de NaCl (n=6) y glucosa 350 mg/kg (Gluc) (n=12) por medio de una t de muestras independientes. Como se muestra en la figura 6B, el análisis mostró que la liberación de glutamato ante la administración de glucosa fue significativamente mayor en comparación con la inyección de NaCl ($t_{(45)} = 2.111, P=0.040$). Además, cuando se comparó la media de cada estímulo respecto al 100% por medio de una prueba t de una sola muestra, se encontró que, mientras que la administración de NaCl provocó un decremento en la liberación de glutamato (media NaCl = $59.22 \% \pm 15.910, t_{(11)} = 2.564, P=0.026$), la inyección de glucosa tuvo el efecto contrario al incrementar la concentración extracelular de glutamato dentro de la CI (media Gluc = $174.4 \% \pm 31.270, t_{(34)} = 2.379, P=0.023$). Los datos reportados durante este experimento muestran que la liberación de glutamato cortical es elicitada por una señal de tipo apetitivo (glucosa).

GLUTAMATO

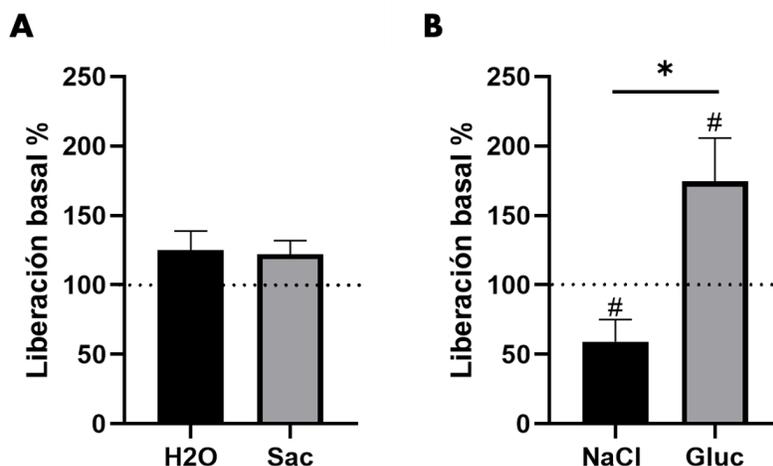


Figura 6. Monitoreo de la liberación de glutamato ante la presentación de estímulos gustativos y viscerales. No se observan cambios en la concentración extracelular de glutamato debido a la presentación de estímulos gustativos. Por el contrario, la inyección i. p. de NaCl promueve una disminución en la liberación de glutamato, mientras que la administración i. p. de glucosa incrementa significativamente la liberación de este neurotransmisor. Datos representados como media del porcentaje de liberación de neurotransmisores \pm SEM para cada grupo.

* $P < .05$ NaCl vs Gluc, # $P < .05$ respecto al 100%

Cambios en la liberación de norepinefrina ante la presentación de estímulos gustativos y viscerales

Con el fin de evaluar los cambios en los niveles extracelulares de norepinefrina debido a la estimulación gustativa, se compararon las medias del porcentaje de liberación de este neurotransmisor frente al consumo de agua ($n=6$) y sacarina 0.3% ($n=11$) por medio de una prueba t de muestras independientes. Como se muestra en la figura 7A, el análisis mostró que la liberación de norepinefrina ante la presentación de sacarina fue significativamente mayor en comparación con la observada durante la estimulación con agua ($t_{(42)} = 2.467$, $P=0.017$). Además,



cuando se realizó una prueba t de una sola muestra para comparar las medias de cada estímulo respecto al porcentaje de liberación basal, se encontró que ambos fueron diferentes con relación al 100%, aumentando la liberación de norepinefrina durante el consumo de sacarina 0.3% (media Sac = 122.1 % \pm 9.927, $t_{(39)} = 2.228$, $P=0.031$) y disminuyendo ante la ingesta de agua (media H₂O = 80.10 % \pm 34.62, $t_{(25)} = 2.313$, $P=0.029$). Estos datos demuestran que la administración de un sabor novedoso promueve cambios en la liberación de norepinefrina.

En lo que refiere a la estimulación visceral, se compararon las medias del porcentaje de liberación durante la inyección i. p. de NaCl (n=6) y glucosa (n=12) por medio del uso de una t de muestras independientes. Aunque en este caso no se identificaron diferencias significativas entre los estímulos ($t_{(44)} = 0.726$, $P=0.472$), cuando se comparó la concentración extracelular de norepinefrina de cada estímulo respecto al 100% mediante la aplicación de una prueba t de una sola muestra, se encontró que la inyección i. p. de glucosa generó un incremento significativo en la liberación de norepinefrina (media Gluc = 158.8 % \pm 28.590, $t_{(34)} = 2.058$, $P=0.047$), mientras que la aplicación de NaCl no provocó cambios (media NaCl = 118.4 % \pm 38.760, $t_{(10)} = 0.475$, $P=0.644$) (ver figura 7B). Los datos anteriores demuestran que la liberación de norepinefrina cortical participa en la señalización de una consecuencia posingestiva apetitiva.

NOREPINEFRINA

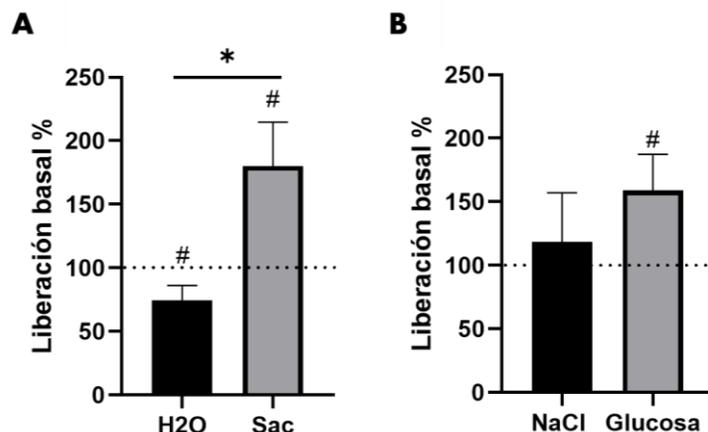


Figura 7. Monitoreo de la liberación de norepinefrina ante la presentación de estímulos gustativos y viscerales. Mientras que el consumo de sacarina 0.3% y la inyección i. p. de glucosa incrementan la concentración extracelular de norepinefrina en la CI, la presentación de agua la disminuye. No se observaron cambios en la liberación de norepinefrina debido a la estimulación visceral con NaCl. Datos representados como media del porcentaje de liberación de neurotransmisores \pm SEM para cada grupo.

* $P < .05$ H2O vs Sac, # $P < .05$ respecto al 100%

Cambios en la liberación de dopamina ante la presentación de estímulos gustativos y viscerales

Para evaluar los cambios en los niveles extracelulares de dopamina en la corteza insular ante la presentación de estímulos gustativos, se compararon las medias del porcentaje de liberación observados durante el consumo de agua ($n=6$) y sacarina 0.3% ($n=16$). Aunque el análisis derivado de una prueba t de muestras independientes no identificó diferencias significativas en la liberación de dopamina entre los estímulos gustativos ($t_{(55)} = 0.327$, $P=0.744$), cuando se comparó la media de cada estímulo respecto al 100% con ayuda de una prueba t de una sola muestra, se observó que el consumo de sacarina aumentó de manera significativa los niveles de dopamina (media Sac = $131.8 \% \pm 12.590$, $t_{(38)} = 2.522$, $P=0.016$). Por el contrario, la ingesta de agua no

generó cambios en la liberación de este neurotransmisor (media H₂O = 124.9 % ± 13.870, $t_{(17)} = 1.799$, $P=0.089$) (ver figura 8A). Estos datos muestran que la ingesta de un sabor novedosos como la sacarina genera un incremento en la liberación de dopamina.

En lo referente a la estimulación visceral, las medias del porcentaje de liberación observadas ante las inyecciones de NaCl (n=6) y glucosa 350 mg/kg (n=12) fueron comparadas por medio de una prueba t de muestras independientes. Aunque nuevamente el análisis no mostró diferencias significativas entre los estímulos ($t_{(45)} = 1.939$, $P=0.058$), cuando se compararon las medias de cada estímulo respecto al 100% por medio de una prueba t de una sola muestra, se encontró que solo la inyección i. p. de glucosa aumentó la liberación de dopamina de manera significativa (media Gluc = 184.8 % ± 25.950, $t_{(34)} = 3.266$, $P=0.002$; media NaCl = 96.97 % ± 13.130, $t_{(11)} = 0.230$, $P=0.821$) (ver figura 8B), por lo que se sugiere que este sistema de neurotransmisión participa en la señalización de una consecuencias posingestivas de tipo apetitivo.

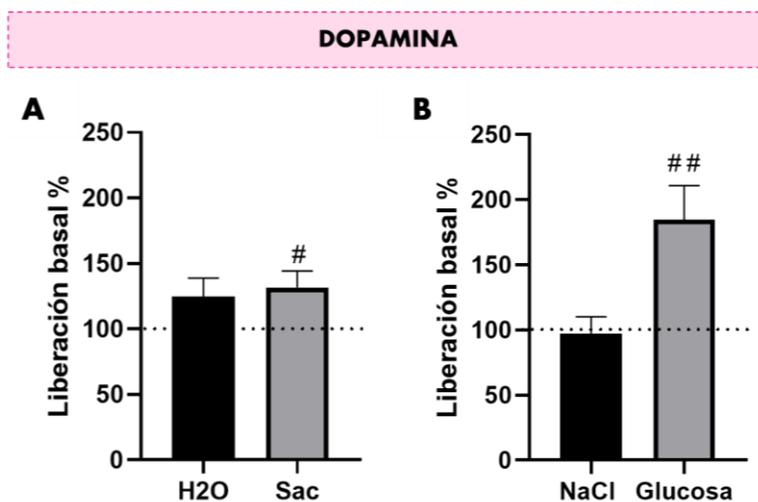


Figura 8. Monitoreo de la liberación de dopamina ante la presentación de estímulos gustativos y viscerales. El consumo de sacarina 0.3% y la inyección i. p. de glucosa provocan un incremento en la liberación de dopamina. Por el contrario, el consumo de agua y la estimulación visceral con NaCl no



generan cambios en la concentración extracelular de este neurotransmisor. Datos representados como media del porcentaje de liberación de neurotransmisores \pm SEM para cada grupo.

$p < .05$, ## $p < .01$ respecto al 100%

El bloqueo de los receptores NMDA, β -adrenérgicos y dopaminérgicos tipo D1 en la CI antes del estímulo visceral afecta el establecimiento del CPS

Con el fin de evaluar el papel funcional de los sistemas de neurotransmisión glutamatérgica y catecolaminérgica durante el establecimiento del CPS, por medio de una prueba ANOVA de un factor (fármaco) se compararon los índices de preferencia de los grupos a los que se les administraron antagonistas de los receptores NMDA (AP5) (n=9), β -adrenérgicos (propranolol) (n=9) y dopaminérgicos tipo D1 (SCH) (n=9) justo antes de la inyección intraperitoneal de glucosa. Como se muestra en la figura 9, el análisis mostró diferencias significativas entre las medias de los grupos ($F_{(3,34)} = 3.514$, $P=0.025$). Por medio de la prueba de Fisher se encontró que los índices de preferencia de los animales tratados con AP5 ($P=0.023$), PROP ($P=0.028$) y SCH ($P=0.006$) fueron significativamente distintos en comparación con el grupo tratado con SS intracortical (n=13). Estos datos muestran que, mientras que el grupo tratado con SS i. c. mostró preferencia por la sacarina 72 horas después del condicionamiento, los animales a los que se les administró AP5, propranolol (PROP) o SCH no incrementaron el consumo de sacarina, por lo que no se observó preferencia en la prueba de memoria a largo plazo. Los resultados anteriores indican que el bloqueo de los receptores NMDA, β -adrenérgicos y dopaminérgicos tipo D1 antes de la señalización visceral afecta el establecimiento del CPS y se concluye que el incremento en las liberaciones de glutamato, norepinefrina y dopamina son necesarias para la adquisición del condicionamiento de preferencia al sabor.

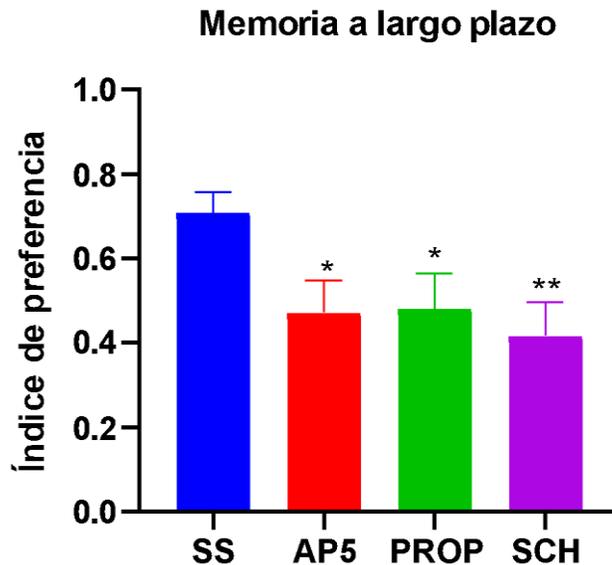


Figura 9. El bloqueo farmacológico de receptores NMDA, β -adrenérgicos y dopaminérgicos tipo D1 en la CI antes de la estimulación visceral afecta el establecimiento del CPS. Los animales tratados con SS mostraron preferencia al sabor en la prueba de memoria a largo plazo, mientras que los animales inyectados i. c. con AP5, propranolol (PROP) y SCH fallaron en exhibir esta memoria 72 horas después del condicionamiento. Datos representados como media del índice de preferencia \pm SEM para cada grupo.

** $P < .01$, * $P < .05$ respecto a SS

El bloqueo de los receptores NMDA, β -adrenérgicos y dopaminérgicos tipo D1 en la CI después de la adquisición del CPS impide la consolidación de la memoria a largo plazo

Con el fin de evaluar el papel funcional de los cambios en la liberación de glutamato, norepinefrina y dopamina en la CI sobre la consolidación de la memoria de preferencia al sabor, se administraron antagonistas de los receptores NMDA (AP5), β -adrenérgicos (propranolol) y dopaminérgicos tipo D1 30 minutos después de la adquisición del CPS. Cuando se compararon los resultados de la prueba de memoria a corto plazo (4 horas) por medio de una prueba ANOVA de un factor (fármaco), el análisis no mostró diferencias significativas entre los grupos tratados



con antagonistas ($n_{AP5}=9$, $n_{PROP}=10$, $n_{SCH}=9$) respecto al grupo al que se administró SS ($n=9$) de manera intracortical ($F_{(3,33)} = 1.945$, $P=0.141$), por lo que se concluye que la adquisición del CPS no fue afectada (Figura 10A). Por el contrario, cuando se realizó la prueba 72 horas después del condicionamiento, la prueba ANOVA de un factor mostró diferencias significativas entre los grupos ($F_{(3,30)} = 3.027$, $P=0.044$). Así, mediante la aplicación de la prueba de Fisher, se encontró que los animales tratados con AP5 ($P=0.049$, $n=8$) y SCH ($P=0.029$, $n=8$) exhibieron alteraciones en la memoria a largo plazo al disminuir la ingesta de sacarina respecto a la del agua. Por otro lado, no se observaron cambios en el índice de preferencia en el grupo PROP ($P=0.980$, $n=8$) respecto al control de SS ($n=10$) (Figura 10B). Los datos anteriores indican que el bloqueo de los receptores NMDA y dopaminérgicos tipo D1 después de la asociación del estímulo gustativo con el estímulo visceral afecta el establecimiento del CPS, impactando directamente sobre la consolidación de la memoria.

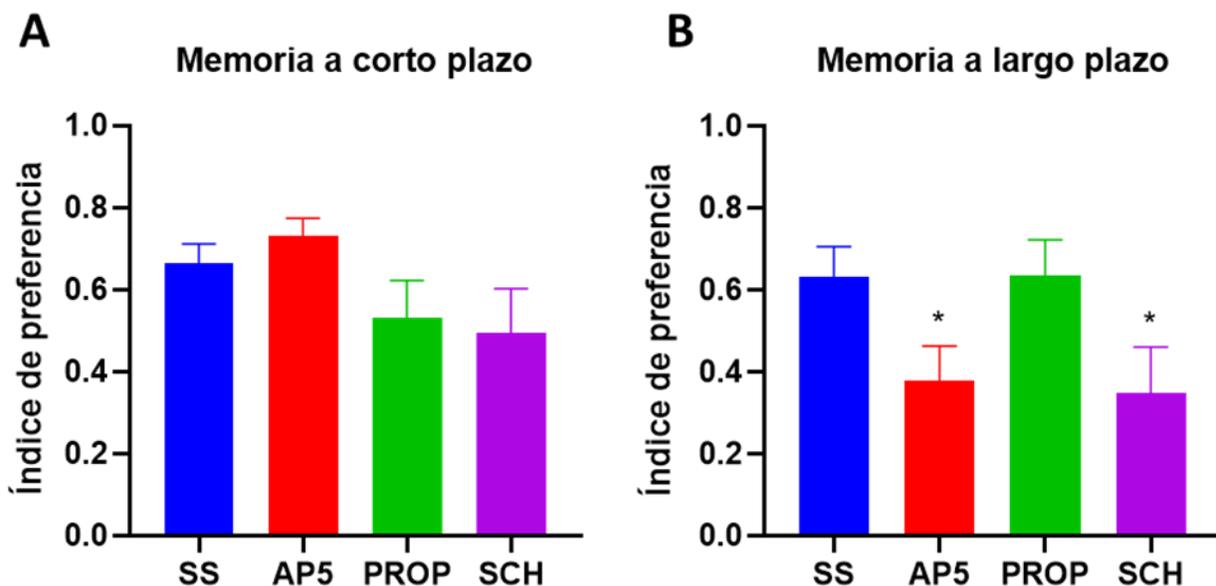


Figura 10. El bloqueo farmacológico de receptores NMDA, β -adrenérgicos y dopaminérgicos tipo D1 en la CI 30 minutos después del CPS afecta la expresión de la memoria a largo plazo, pero no a corto plazo. Durante la prueba de memoria a corto plazo (4 horas), los animales de todos los grupos mostraron preferencia al sabor; sin embargo, durante la evaluación de la memoria a largo plazo, los animales tratados con AP5 y SCH i. c. exhibieron alteraciones en la memoria al disminuir el consumo de sacarina respecto al agua. Datos representados como media del índice de preferencia \pm SEM para cada grupo.

* $P < .05$ respecto a SS

DISCUSIÓN

La administración intraperitoneal de glucosa induce el establecimiento del CPS en un solo ensayo

Uno de los principales hallazgos del presente estudio es que la inyección intraperitoneal de glucosa favorece el establecimiento de una preferencia hacia un sabor novedoso cuando se utiliza como una consecuencia posingestiva positiva y en un solo ensayo. Previamente se ha reportado que, aunque la glucosa es favorecida entre otros sacáridos para el desarrollo de preferencias



alimenticias (Ackroff et al., 2001; Ackroff y Sclafani, 1991; Bodnar, 2018; Myers y Sclafani, 2001; Buchanan et al., 2022; Sclafani y Ackroff, 1994; Tan et al., 2020), su efectividad varía dependiendo de la vía de administración (Bodnar, 2018). Típicamente, los trabajos que emplean a la glucosa como estímulo visceral para condicionar una preferencia al sabor se valen de la administración intragástrica pues ofrece la ventaja de separar el componente gustativo del componente posingestivo (Bodnar et al., 2018; Buchanan et al., 2022; Tan et al., 2020). A pesar de ello, constituye un método invasivo pues requiere de una cirugía a través de la cual se implanta un catéter en el estómago para administrar la solución deseada (Bodnar et al., 2018). Si bien los resultados que ofrece son robustos entre las diferentes manipulaciones, se ha propuesto que la administración intraperitoneal podría separar los componentes mencionados sin realizar intervenciones invasivas. A pesar de ello, las investigaciones realizadas hasta ahora han mostrado su ineficacia al momento de condicionar preferencias alimenticias a pesar de que elevan los niveles de glucosa en sangre de manera similar a una administración intragástrica de menor concentración (Zukerman, Ackroff y Sclafani, 2013). Debido a lo anterior, uno de los objetivos del presente trabajo consistió en estandarizar un protocolo de condicionamiento de preferencia al sabor utilizando una vía de administración intraperitoneal. Mediante la realización de una curva dosis respuesta en la que se asoció el consumo de sacarina 0.3% con la inyección de glucosa, el presente trabajo mostró que la dosis de 350 mg/kg genera preferencia hacia la sacarina en relación con el resto de las dosis. Al compararlo con otros procedimientos, se observa que el protocolo empleado en este trabajo administró un mayor volumen de solución (glucosa) en una concentración menor a la reportada (glucosa 8%) (Zukerman, Sclafani y Ackroff, 2013). Aunque los antecedentes que han realizado esta manipulación lo han hecho



principalmente en ratones, parece que administrar una mayor cantidad de solución requeriría una menor concentración para generar una memoria de preferencia.

Es importante mencionar que, si bien los experimentos realizados sugieren que la vía intraperitoneal es efectiva durante el condicionamiento de preferencia al sabor, típicamente se ha propuesto que el desarrollo de dichas preferencias depende de la activación de células epiteliales en el intestino (Buchanan et al., 2022; Liu y Bohórquez, 2022; Tan et al., 2020; Yue et al., 2022). Ya que la solución inyectada intraperitonealmente atraviesa directamente por la vena porta hepática, se sugiere que la preferencia podría establecerse a través de mecanismos independientes de los receptores intestinales, presumiblemente por la acción de hormonas (p. ej. CCK) (Laviano et al., 2018; Pérez y Sclafani, 1991). Sin embargo, se requiere mayor investigación en torno a dilucidar el papel funcional de la señalización humoral en el condicionamiento de preferencia al sabor por macronutrientes (Berthoud et al., 2021).

Neuroquímica del procesamiento de estímulos gustativos y viscerales

a) Glutamato

En lo que refiere a los estímulos gustativos, los resultados muestran que ni el consumo de agua ni el consumo de sacarina generan cambios en los niveles extracelulares de glutamato en la CI. Estos datos son congruentes con lo reportado por otras investigaciones en las que se ha mostrado que solo el valor aprendido, y no la valencia innata o la novedad de los estímulos gustativos, promueve actividad glutamatérgica dentro de la CI (Guzmán-Ramos et al., 2010; Miranda et al., 2002; Osorio-Gómez, 2017; Osorio Gómez et al., 2021; Tucci, Rada y Hernández, 1998).

En lo que respecta a la señalización visceral, trabajos anteriores han mostrado que la administración intraperitoneal de LiCl como agente inductor de malestar gástrico facilita una



elevación de glutamato dentro de la CI de manera dosis dependiente (Osorio-Gómez et al., 2021). Por el contrario, la inyección de NaCl en concentraciones iso- e hipertónicas no genera cambios en los niveles de este neurotransmisor (Osorio-Gómez et al., 2021). Con base en esta información, la hipótesis anterior proponía que a través de la actividad glutamatérgica se señala el componente aversivo del estímulo visceral (Guzmán-Ramos et al., 2010; Osorio-Gómez et al., 2021). Contrario a ello, los resultados de este trabajo muestran que la administración intraperitoneal de glucosa, un estímulo que se considera apetitivo por sus propiedades nutricionales, también promueve un incremento en la liberación basal de glutamato cortical.

Hasta ahora no se había descrito la dinámica de liberación de neurotransmisores ante la administración de estímulos apetitivos (p. ej. azúcares) dentro de la CI, sin embargo, se ha encontrado, en estudios de imagenología, que esta estructura exhibe un incremento en la señal BOLD cuando se administra glucosa de manera intragástrica (Tsurugizawa y Unemaya, 2014). Asimismo, la señalización relacionada a la llegada de un azúcar al intestino depende principalmente de glutamato (Kaelberer et al., 2018). De acuerdo con el modelo propuesto, cuando la glucosa es sensada por los receptores GLUT y SGLT de las células neuropodas en el intestino (Buchanan et al., 2022; Liu y Bohórquez, 2022), estas células se comunican a través de una sinapsis glutamatérgica con las neuronas del ganglio nodoso del nervio vago (Kaelberer et al., 2018; Lukas, Brindle y Greengard). A partir de allí, se sabe que el nervio vago interviene enviando información visceral hacia el NTS; de ahí, la señal alcanza al NPB y después al tálamo, el cual proyecta hacia la AMY y finalmente, a la CI (Bermúdez-Rattoni, 2004; Cao et al., 2021). Si bien la vía de administración intraperitoneal no requiere del metabolismo intestinal (Ren et al., 2010) y se desconocen a los actores celulares y moleculares que permiten el paso de esta información hacia la CI, el presente trabajo muestra que ambos tipos de administración,



intragástrica e intraperitoneal, son facilitados por actividad glutamatérgica. En conjunto, estos datos sugieren que la señalización de consecuencias posingestivas aversivas y apetitivas en el organismo es dependiente de glutamato.

Un aspecto que vale la pena resaltar sobre la actividad glutamatérgica es que esta se ha relacionado principalmente con el aprendizaje asociativo. Al respecto, estudios anteriores han demostrado que el glutamato, a través de la actividad de los receptores NMDA, constituye una señal neuroquímica importante para el establecimiento de tareas asociativas como el CAS y el CPL (Escobar, Alcocer y Chao, 1998; Jiménez y Tapia, 2004; Osorio-Gómez, Guzmán-Ramos y Bermúdez-Rattoni, 2019). Así pues, los resultados observados con CAS y CPS en los que se presenta un incremento en glutamato sugieren que la asociación de dos estímulos promueve el aumento de glutamato en la CI; por lo tanto, se propone que este neurotransmisor favorece el aprendizaje al asignar un valor aprendido a los estímulos.

Al ampliar esta información con los resultados observados durante la farmacología, se observa que la administración intracortical de AP5 antes de la inyección de glucosa impide que los animales muestren preferencia al sabor el día de la prueba. Este fenómeno también ocurre en el CAS pues, la infusión de antagonistas de receptores glutamatérgicos en la CI previa al condicionamiento impide que los animales muestren aversión al sabor el día de la prueba (Osorio-Gómez et al., 2021). Este fenómeno podría explicarse desde el momento de la aplicación del fármaco. Previamente se describió que el pico de acción del AP5 se extiende hasta 60 min después de su aplicación (Jin, Suga y Gao, 2005), por lo que la cercanía respecto a la administración de la consecuencia posingestiva impide la señalización de este estímulo; por consiguiente, los animales no exhiben la preferencia hacia sacarina el día de la prueba.



Por otro lado, se ha reportado que 30 minutos después de la adquisición de un aprendizaje de reconocimiento al sabor, se activan diferentes cascadas de señalización que favorecen la consolidación del aprendizaje, entre las que se puede mencionar la cascada asociada a la actividad de los receptores NMDA (Guzmán-Ramos et al., 2012). Al respecto se sabe que, después de que los receptores glutamatérgicos tipo NMDA se activan por la llegada de glutamato y el tapón de magnesio (Mg^{++}) es retirado del canal, la entrada de calcio al interior de la célula cambia el potencial eléctrico de la célula y promueve la actividad de la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CAMKII); esta fosforila a los receptores AMPA para aumentar su sensibilidad al glutamato y permite la inserción de nuevos receptores en la membrana postsináptica; paralelamente, la proteína cinasa C (PKC) y otras cinasas como Fyn derivan en la activación de PKA la cual, a su vez, fosforila al factor de transcripción CREB para inducir la transcripción de genes en el núcleo de la neurona (Loubon y Franco, 2010). Por lo anterior, cuando se inyectó AP5 intracorticalmente 30 minutos después del condicionamiento, se bloqueó una cascada de consolidación dependiente de la activación de los receptores NMDA. En consecuencia, los animales mostraron memoria a corto plazo y no así memoria de largo plazo. Los resultados anteriores demuestran que el glutamato funge como un instructor de la memoria pues solo exhibe un incremento cuando los animales son expuestos a un protocolo de preferencia al sabor. Por otro lado, la consolidación de memorias asociativas depende de la señalización glutamatérgica asociada a la actividad de receptores tipo NMDA.

b) Norepinefrina

En lo referente a la norepinefrina, los resultados mostraron que, mientras que la presentación de sacarina induce una elevación en la liberación de norepinefrina en la CI, el consumo de agua ejerce el efecto contrario al provocar una disminución de estos niveles. Asimismo, se observó



que las inyecciones intraperitoneales de NaCl y glucosa promovieron cambios en la concentración extracelular de este neurotransmisor. Aunque hasta ahora no se habían reportado los cambios que expresa la norepinefrina durante la adquisición de un condicionamiento de preferencia al sabor, los datos obtenidos son congruentes con experimentos anteriores en los que se ha observado que la exposición a estímulos novedosos y que la estimulación nociceptiva (p. ej. inyección intraperitoneal) promueven cambios en los niveles de norepinefrina (Kafkas y Montaldi, 2018; Moreno-Castilla et al., 2017; Osorio-Gómez et al., 2021; Titulaer et al., 2021).

A diferencia de otras catecolaminas, típicamente se ha propuesto que la liberación de norepinefrina en la CI aumenta cuando un estímulo es considerado como estresante (Osorio-Gómez et al., 2021); esto tiene importantes implicaciones sobre la memoria pues modula su establecimiento al catalogar los estímulos como relevantes o no relevantes (saliencia) (Ventura et al., 2008). En el caso de la señalización gustativa, de manera general se ha observado un incremento en la actividad noradrenérgica en la CI ante la presentación de estímulos novedosos (Osorio-Gómez et al., 2021). Aunque la novedad juega un papel importante en la conducta de ingesta pues asegura reacciones cautelosas hacia los alimentos hasta que estos se hacen familiares y se reconocen como seguros para el organismo, la disminución en el consumo de un alimento o una solución (neofobia) se considera como una respuesta ansiogénica (Lin, Arthurs y Reilly, 2015), por lo que cumple con el requisito de ser estresante. A pesar de ello, parece que la relevancia de esta señal varía dependiendo del tipo de memoria de reconocimiento, pues cuando se bloquean los receptores de norepinefrina antes de la presentación del estímulo gustativo, genera alteraciones en un protocolo de atenuación de la neofobia, mientras que no muestra efectos en una memoria de aversión al sabor (Miranda et al., 2008).



En lo que respecta a la estimulación visceral, trabajos anteriores han mostrado que, independientemente de la solución que se administre (p. ej. NaCl o LiCl), las inyecciones intraperitoneales promueven elevaciones en los niveles de norepinefrina y estos cambios responden directamente a la concentración de la solución administrada (Galvez, Mesches y McGaugh, 1996; Osorio-Gómez et al., 2021; Quirarte, Galvez, Roozendaal y McGaugh, 1998; Tanaka, 1991). Asimismo, se ha reportado que la inmovilización (como ocurre durante la manipulación de los animales) provoca un aumento en la concentración extracelular de norepinefrina (Galvez, Mesches, & McGaugh, 1996; Quirarte et al., 1998; Tanaka et al., 1991). Ya que los animales utilizados en los experimentos fueron inmovilizados para su consecuente inyección y se administró una solución de manera intraperitoneal, se sugiere que la señal noradrenérgica asignó a la glucosa la connotación de relevante o saliente para el condicionamiento de preferencia al sabor. Para probar esta premisa, en experimentos posteriores se administró propranolol, un antagonista de los receptores β -adrenérgicos antes de la inyección i. p. de glucosa. Los resultados mostraron que los animales a los que se les administró propranolol en la CI no mostraron preferencia hacia la solución condicionada cuando se evaluó la memoria 72 horas después. Esto contrasta con los resultados observados en el protocolo de CAS, en el cual el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos antes de la administración de LiCl no impide la expresión de la aversión al sabor en la prueba de memoria a largo plazo (Osorio-Gómez et al., 2021). En este sentido se sugiere que, aunque la actividad noradrenérgica no es relevante para establecer una memoria de reconocimiento al sabor aversiva, juega un papel importante en el establecimiento de una memoria apetitiva como el CPS.

Finalmente, con el fin de dilucidar si el papel modulador de la norepinefrina se restringe a la adquisición del CPS o es relevante para etapas posteriores en la formación de la memoria, se



administró propranolol en la CI 30 minutos después del término del condicionamiento, una ventana temporal en la que se ha demostrado que diferentes estructuras (p. ej. amígdala) liberan norepinefrina para participar en la consolidación. Aunque previamente no se ha reportado la participación de los receptores β -adrenérgicos corticales en la consolidación de la memoria, los datos obtenidos indican que no son relevantes para la consolidación y su función se restringe estrictamente al establecimiento de la memoria de preferencia.

c) Dopamina

Estudios previos han demostrado que las catecolaminas juegan un papel importante en la codificación de la novedad pues, ante la presentación de estímulos novedosos (p. ej. sacarina, quinina), se observa un incremento en los niveles de dopamina y norepinefrina. Particularmente en lo que refiere a la liberación de dopamina, investigaciones recientes muestran que, sin importar la valencia del estímulo, la CI exhibe un incremento en la liberación de este neurotransmisor cuando el estímulo se presenta por primera vez (Guzmán-Ramos et al., 2010; Osorio-Gómez et al., 2021) y no exhibe cambios una vez que el estímulo se vuelve familiar (Osorio-Gómez et al., 2017). Aunque las manipulaciones realizadas durante este trabajo muestran que la sacarina produce un aumento en la señal dopaminérgica de la CI, el agua exhibe un incremento similar al de la sacarina. Para explicar este fenómeno, trabajos previos han demostrado que la rehidratación aumenta la actividad de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA), una estructura que proyecta aferencias hacia la CI (Gil-Lievana et al., 2020), en decenas de segundos (Grove et al., 2022) y la activación de estas neuronas es mayor dependiendo de si el animal se encuentra hidratado o deshidratado. En este sentido, es probable que el aumento en la señalización por dopamina frente al consumo de agua se deba al estado



homeostático de los organismos. Sin embargo, se requieren más mediciones para confirmar esta premisa.

En lo que corresponde al procesamiento de estímulos viscerales, los antecedentes demuestran que la ingesta de azúcares promueve un aumento en la liberación de DA en estructuras del sistema mesolímbico entre las que se incluyen la amígdala, el hipotálamo, el núcleo accumbens y la corteza prefrontal medial (Sclafani, Touzani y Bodnar, 2011). Aunque parte de esta señalización ha sido atribuida a la palatabilidad de los estímulos gustativos, en la literatura se refiere que la liberación de DA es independiente de los efectos orales pues experimentos en los que infundió glucosa por vía intragástrica promovieron un incremento en la liberación de DA dentro de las mismas estructuras (Ren et al., 2010). Además, se ha observado que el porcentaje de cambio en la concentración extracelular de DA se correlaciona con la densidad calórica del nutriente que se administra (Ferreira et al., 2012; Ren et al., 2010). Así, pues, a diferencia de otros estímulos viscerales, parece que la actividad dopaminérgica es exclusiva de la glucosa pues la administración intraperitoneal de un inductor de malestar gástrico (LiCl) o la inyección de una solución inocua como el NaCl no inducen cambios en los niveles de DA corticales (Osorio-Gómez, 2021). Debido a lo anterior, parece que la dopamina señala la valencia positiva de la consecuencia posingestiva.

Con el fin de evaluar la relevancia de la actividad dopaminérgica en la CI para el establecimiento del CPS, posteriormente se bloqueó esta señal mediante el uso de antagonistas específicos. En este caso, se optó por emplear antagonistas de los receptores dopaminérgicos tipo D1 pues experimentos anteriores han mostrado que la administración de este fármaco en el núcleo accumbens (Touzani et al., 2008) y la amígdala (Touzani et al., 2009) antes del condicionamiento impide la adquisición de la memoria de preferencia. En este caso, la



administración de SCH, un antagonista de los receptores dopaminérgicos D1. antes de la inyección de glucosa impidió el establecimiento de la preferencia hacia la sacarina, indicando que la actividad de estos receptores es un factor esencial durante la codificación de la consecuencia posingestiva.

Finalmente, trabajos anteriores han mostrado que, 30 minutos después de la adquisición de una memoria de reconocimiento, se observa un incremento en la liberación de dopamina cortical (Guzmán-Ramos et al., 2010). Aunque esta actividad parece tener un papel modulador en el establecimiento de una memoria de reconocimiento aversiva pues impide la consolidación de este trazo cuando se administra en conjunto con antagonistas de los receptores NMDA, los resultados del presente estudio muestran que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos tipo D1 impide la consolidación de la memoria apetitiva al permitir que se exprese a corto, pero no largo plazo. En conjunto, estos resultados demuestran que la dopamina cumple un papel importante en el establecimiento de la memoria de preferencia al sabor al señalar la valencia de la consecuencia posingestiva y favorecer la consolidación de la memoria.

CONCLUSIONES

El presente trabajo se realizó con el fin de evaluar el papel funcional de la CI en el establecimiento de un condicionamiento de preferencia al sabor. A partir de los resultados obtenidos se pudo concluir que la inducción de un CPS es posible al asociar un sabor novedoso con una consecuencia posingestiva positiva. Al evaluar los aspectos neuroquímicos involucrados en este proceso, se identificó que, mientras que la presentación de un sabor novedoso (sacarina) es señalizada en la CI por cambios en los sistemas de neurotransmisión catecolaminérgicos, la presentación de una consecuencia posingestiva con valencia apetitiva (glucosa) es señalizada por los sistemas de neurotransmisión glutamatérgico y dopaminérgico. Al complementar estos



hallazgos con los resultados obtenidos mediante las manipulaciones farmacológicas, se concluye que la norepinefrina juega un papel importante en el establecimiento del condicionamiento de preferencia al sabor por medio de la actividad de los receptores β -adrenérgicos; y que el glutamato y la dopamina participan en la consolidación de la memoria de preferencia a través de la actividad de los receptores NMDA y D1, respectivamente.

ANEXO

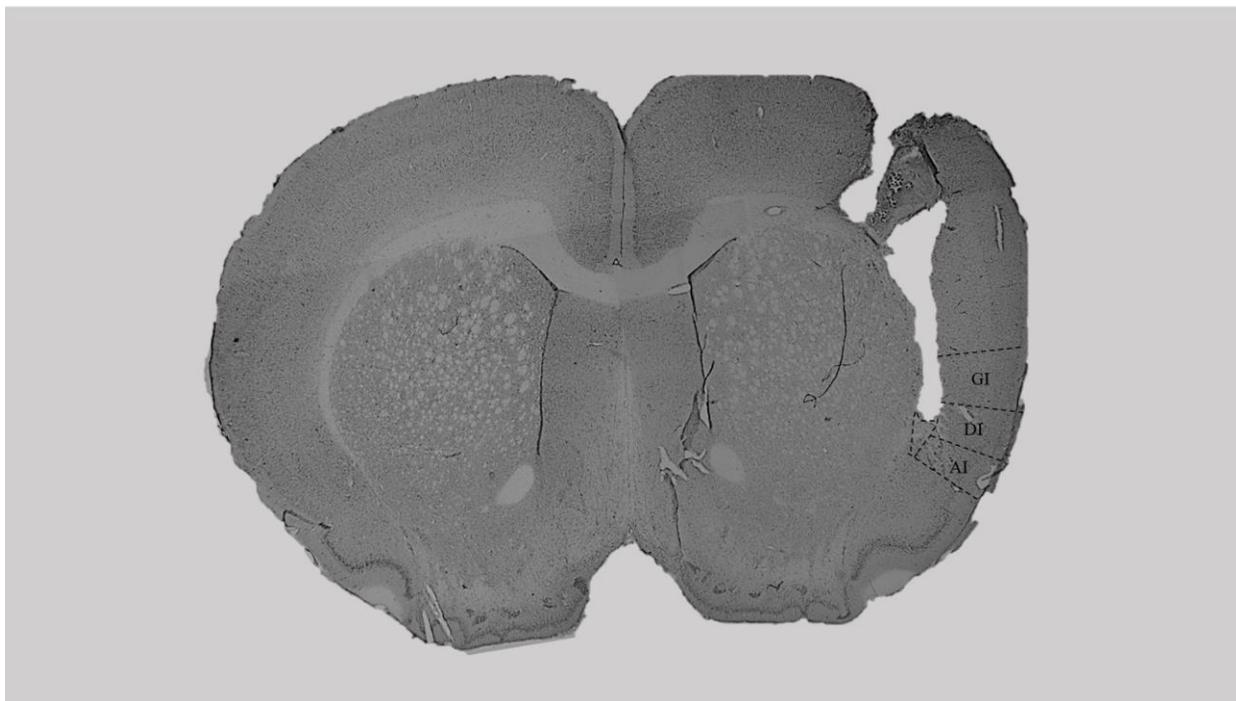


Figura 1. Fotografía representativa de la implantación unilateral de una cánula guía de microdiálisis en la CI. En la imagen se puede observar que la lesión en la CI asociada a la implantación de la cánula guía abarca distintas capas de la corteza, entre las que se encuentran la capa granular y parte de la capa disgranular.

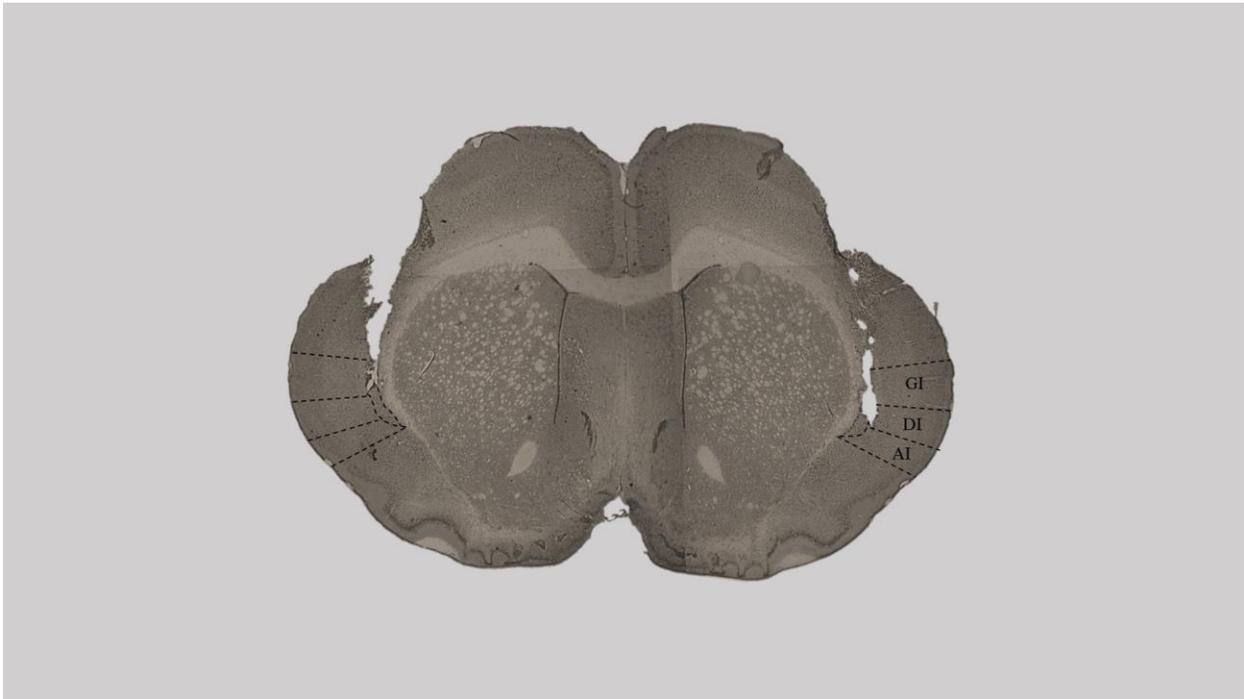


Figura 2. Fotografía representativa de la implantación unilateral de una cánula guía de microdiálisis en la CI. En la imagen se puede observar que la lesión en la CI asociada a la implantación de las cánulas de farmacología abarca distintas capas de la corteza, entre las que se encuentran la capa granular y disgranular.



REFERENCIAS

- Ackroff, K., & Sclafani, A. (1991). Flavor preferences conditioned by sugars: rats learn to prefer glucose over fructose. *Physiology & behavior*, 50(4), 815–824. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90023-h](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90023-h)
- Ackroff, K., Touzani, K., Peets, T. K., & Sclafani, A. (2001). Flavor preferences conditioned by intragastric fructose and glucose: differences in reinforcement potency. *Physiology & behavior*, 72(5), 691–703. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(01\)00442-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(01)00442-5)
- Aggleton, J. P., & Brown, M. W. (1999). Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *The Behavioral and brain sciences*, 22(3), 425–489.
- Agmo, A., Galvan, A., & Talamantes, B. (1995). Reward and reinforcement produced by drinking sucrose: two processes that may depend on different neurotransmitters. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 52(2), 403–414. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00128-j](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00128-j)
- Alagband, Y., & Marshall, J. F. (2013). Common influences of non-competitive NMDA receptor antagonists on the consolidation and reconsolidation of cocaine-cue memory. *Psychopharmacology*, 226(4), 707–719. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2793-y>
- Avery, J. A., Liu, A. G., Ingeholm, J. E., Riddell, C. D., Gotts, S. J., & Martin, A. (2020). Taste Quality Representation in the Human Brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 40(5), 1042–1052. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1751-19.2019>
- Baxter, D. A. & Byrne, J. H. (2006). Feeding behavior of Aplysia: A model system for comparing cellular mechanisms of classical and operant conditioning. *Learning and Memory*, 13(6), 669–680. <https://doi.org/10.1101/lm.339206>
- Beaulieu, J. M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews*, 63(1), 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>



- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature reviews Neuroscience*, 5(3), 209-217. <https://doi.org/10.1038/nrn1344>
- Bermudez-Rattoni F. (2014). The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. *Neurobiology of learning and memory*, 109, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.01.001>
- Bermúdez-Rattoni, F., Núñez-Jaramillo, L., & Balderas, I. (2005). Neurobiology of taste-recognition memory formation. *Chemical senses*, 30, i156–i157. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjh161>
- Berridge, C. W., & Waterhouse, B. D. (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain research. Brain research reviews*, 42(1), 33–84. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(03\)00143-7](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(03)00143-7)
- Berthoud, H. R., Morrison, C. D., Ackroff, K., & Sclafani, A. (2021). Learning of food preferences: mechanisms and implications for obesity & metabolic diseases. *International journal of obesity*, 45(10), 2156–2168. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00894-3>
- Beutler, L. R., Chen, Y., Ahn, J. S., Lin, Y. C., Essner, R. A., & Knight, Z. A. (2017). Dynamics of Gut-Brain Communication Underlying Hunger. *Neuron*, 96(2), 461–475.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.043>
- Bodnar R. J. (2018). Conditioned flavor preferences in animals: Merging pharmacology, brain sites and genetic variance. *Appetite*, 122, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.12.015>
- Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2010). Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*, 68(5), 815–834. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.022>
- Brozek G. (1997). Human memory and its animal models. *Casopis lekaru ceskych*, 136(2), 39–43.



- Buchanan, K. L., Rupprecht, L. E., Kaelberer, M. M., Sahasrabudhe, A., Klein, M. E., Villalobos, J. A., Liu, W. W., Yang, A., Gelman, J., Park, S., Anikeeva, P., & Bohórquez, D. V. (2022). The preference for sugar over sweetener depends on a gut sensor cell. *Nature neuroscience*, 25(2), 191–200. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00982-7>
- Cao, X., Yin, H. Y., Ulrich, H., Semyanov, A., & Tang, Y. (2021). A Neural Circuit for Gut-Induced Sugar Preference. *Neuroscience bulletin*, 37(6), 754–756. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00692-x>
- De Araujo, I. E., Schatzker, M., & Small, D. M. (2020). Rethinking Food Reward. *Annual review of psychology*, 71, 139–164. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-122216-011643>
- Domjan M. (1976). Determinants of the enhancement of flavored-water intake by prior exposure. *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes*, 2(1), 17–27. <https://doi.org/10.1037//0097-7403.2.1.17>
- Escobar, M. L., Alcocer, I., & Chao, V. (1998). The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain research*, 812(1-2), 246–251. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00931-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00931-7)
- España, R. A., Schmeichel, B. E., & Berridge, C. W. (2016). Norepinephrine at the nexus of arousal, motivation and relapse. *Brain research*, 1641(Pt B), 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.01.002>
- Etkin, A., Büchel, C., & Gross, J. J. (2015). The neural bases of emotion regulation. *Nature reviews. Neuroscience*, 16(11), 693–700. <https://doi.org/10.1038/nrn4044>
- Fioravante, D., Antzoulatos, E. G., & Byrne, J. H. (2008). Sensitization and Habituation: Invertebrate. *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*, 31–51. <https://doi.org/10.1016/B978-012370509-9.00005-X>
- Fenu, S., Bassareo, V., & Di Chiara, G. (2001). A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(17), 6897–6904. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-17-06897.2001>



- Ferreira, J. G., Tellez, L. A., Ren, X., Yeckel, C. W., & de Araujo, I. E. (2012). Regulation of fat intake in the absence of flavour signalling. *The Journal of physiology*, 590(4), 953–972. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.218289>
- Frank, S., Kullmann, S., & Veit, R. (2013). Food related processes in the insular cortex. *Frontiers in human neuroscience*, 7, 499. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00499>
- Frank, S., Linder, K., Kullmann, S., Heni, M., Ketterer, C., Cavusoglu, M., Krzeminski, A., Fritsche, A., Häring, H. U., Preissl, H., Hinrichs, J., & Veit, R. (2012). Fat intake modulates cerebral blood flow in homeostatic and gustatory brain areas in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 95(6), 1342–1349. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.031492>
- Galindo, M. M., Schneider, N. Y., Stähler, F., Töle, J., & Meyerhof, W. (2012). Taste preferences. *Progress in molecular biology and translational science*, 108, 383–426. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398397-8.00015-0>
- Gil-Lievana, E., Ramírez-Mejía, G., Urrego-Morales, O., Luis-Islas, J., Gutierrez, R., & Bermúdez-Rattoni, F. (2022). Photostimulation of Ventral Tegmental Area-Insular Cortex Dopaminergic Inputs Enhances the Salience to Consolidate Aversive Taste Recognition Memory via D1-Like Receptors. *Frontiers in cellular neuroscience*, 16, 823220. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.823220>
- Goelet, P., Castellucci, V., Schacher, S. *et al.* The long and the short of long-term memory—a molecular framework. *Nature*, 322, 419–422 (1986). <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/322419a0>
- Grace, A. A., Floresco, S. B., Goto, Y., & Lodge, D. J. (2007). Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends in neurosciences*, 30(5), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.003>
- Grove, J. C. R., Gray, L. A., La Santa Medina, N., Sivakumar, N., Ahn, J. S., Corpuz, T. V., Berke, J. D., Kreitzer, A. C., & Knight, Z. A. (2022). Dopamine subsystems that track internal states. *Nature*, 608(7922), 374–380. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04954-0>



- Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2010). Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *Journal of neurochemistry*, *114*(1), 226–236. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06758.x>
- Holman, E. W. (1975). Immediate and delayed reinforcers for flavor preferences in rats. *Learning and Motivation*, *6*(1), 91-100. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(75\)90037-5](https://doi.org/10.1016/0023-9690(75)90037-5)
- Jezzini, A., Mazzucato, L., La Camera, G. & Fontanini, A. (2013). Processing of hedonic and chemosensory features of taste in medial prefrontal and insular networks. *Journal of neuroscience*, *33*(48), 18966-18978. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2974-13.2013>
- Jiménez, B., & Tapia, R. (2004). Biochemical modulation of NMDA receptors: role in conditioned taste aversion. *Neurochemical research*, *29*(1), 161–168. <https://doi.org/10.1023/b:nere.0000010445.27905.aa>
- Jones, L. M., Fontanini, A., Sadacca, B. F., Miller, P., & Katz, D. B. (2007). Natural stimuli evoke dynamic sequences of states in sensory cortical ensembles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(47), 18772–18777. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705546104>
- Jones, C. L., Ward, J., & Critchley, H. D. (2010). The neuropsychological impact of insular cortex lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, *81*(6), 611–618. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.193672>
- Kaelberer, M. M., Buchanan, K. L., Klein, M. E., Barth, B. B., Montoya, M. M., Shen, X., & Bohórquez, D. V. (2018). A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science (New York, N.Y.)*, *361*(6408), eaat5236. <https://doi.org/10.1126/science.aat5236>
- Kafkas, A., & Montaldi, D. (2018). How do memory systems detect and respond to novelty?. *Neuroscience letters*, *680*, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.01.053>
- Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, *157*(1), 163–186. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>
- Myers, K. P. (2018). The convergence of psychology and neurobiology in flavor-nutrient learning. *Appetite*, *122*, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.03.048>



- Koo, J. W., Lobo, M. K., Chaudhury, D., Labonté, B., Friedman, A., Heller, E., Peña, C. J., Han, M. H., & Nestler, E. J. (2014). Loss of BDNF signaling in D1R-expressing NAc neurons enhances morphine reward by reducing GABA inhibition. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(11), 2646–2653. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.118>
- Laviano, A., Di Lazzaro, L., & Koverech, A. (2018). Changes in eating behavior, taste and food preferences and the effects of gastrointestinal hormones. *Clinical Nutrition Experimental*, 20, 65-70.
- Liu, W. W., & Bohórquez, D. V. (2022). The neural basis of sugar preference. *Nature reviews. Neuroscience*, 23(10), 584–595. <https://doi.org/10.1038/s41583-022-00613-5>
- Loubon, C. O., & Franco, J. C. (2010). Neurofisiología del aprendizaje y la memoria. *Plasticidad Neuronal. Archivos de Medicina*, 6(1), 2.
- Lukas, G., Brindle, S. D., & Greengard, P. (1971). The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 178(3), 562–564.
- Mela D. J. (2006). Eating for pleasure or just wanting to eat? Reconsidering sensory hedonic responses as a driver of obesity. *Appetite*, 47(1), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2006.02.006>
- Miranda, M. I., Rodríguez-García, G., Reyes-López, J. V., Ferry, B., & Ferreira, G. (2008). Differential effects of beta-adrenergic receptor blockade in basolateral amygdala or insular cortex on incidental and associative taste learning. *Neurobiology of learning and memory*, 90(1), 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.01.004>
- Moreno-Castilla, P., Pérez-Ortega, R., Violante-Soria, V., Balderas, I., & Bermúdez-Rattoni, F. (2017). Hippocampal release of dopamine and norepinephrine encodes novel contextual information. *Hippocampus*, 27(5), 547–557. <https://doi.org/10.1002/hipo.22711>
- Myers, K. P., & Sclafani, A. (2001). Conditioned enhancement of flavor evaluation reinforced by intragastric glucose: I. Intake acceptance and preference analysis. *Physiology & behavior*, 74(4-5), 481–493. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(01\)00595-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(01)00595-9)



Nairne J.S., Vasconcelos M. & Pandeirada J.N.S. (2012) Adaptive Memory and Learning. In: Seel N.M. (eds) *Encyclopedia of the Sciences of Learning*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1428-6_1636

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). *WHO urges global action to curtail consumption and health impacts of sugary drinks*. Recuperado de: <https://www.who.int/news/item/11-10-2016-who-urges-global-action-to-curtail-consumption-and-health-impacts-of-sugary-drinks>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). *Directriz: Ingesta de azúcares para niños y adultos*. Recuperado de: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/154587/WHO_NMH_NHD_15.2_spa.pdf;jsessionid=14663DC3EFD1B18E9D28D55D3CA5DF74?sequence=2

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2022). *Monitoreo de los avances en relación con las enfermedades no transmisibles 2022*. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1436975/retrieve>

Osorio-Gómez, D., Bermúdez-Rattoni, F., & Guzmán-Ramos, K. R. (2021). Cortical neurochemical signaling of gustatory stimuli and their visceral consequences during the acquisition and consolidation of taste aversion memory. *Neurobiology of learning and memory*, 181, 107437. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107437>

Parent, M. B., Varnhagen, C., & Gold, P. E. (1999). A memory-enhancing emotionally arousing narrative increases blood glucose levels in human subjects. *Psychobiology*, 27(3), 386-396.

Peng, Y., Gillis-Smith, S., Jin, H., Tränkner, D., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2015). Sweet and bitter taste in the brain of awake behaving animals. *Nature*, 527(7579), 512–515. <https://doi.org/10.1038/nature15763>

Pérez, C., & Sclafani, A. (1991). Cholecystokinin conditions flavor preferences in rats. *The American journal of physiology*, 260(1 Pt 2), R179–R185. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.260.1.R179>



- Pizzorno J. (2015). Hard to be Healthy in North America. *Integrative medicine* (Encinitas, Calif.), 14(3), 8–13.
- Gutierrez, R., Fonseca, E., & Simon, S. A. (2020). The neuroscience of sugars in taste, gut-reward, feeding circuits, and obesity. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 77(18), 3469–3502. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03458-2>
- Reber, P. J. (2008). Cognitive Neuroscience of Declarative and Nondeclarative Memory. *Advances in Psychology*, 139, 113–123. doi:10.1016/s0166-4115(08)10010-3
- Ren, X., Ferreira, J. G., Zhou, L., Shammah-Lagnado, S. J., Yeckel, C. W., & de Araujo, I. E. (2010). Nutrient selection in the absence of taste receptor signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(23), 8012–8023. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5749-09.2010>
- Rogers-Carter, M. M., Varela, J. A., Gribbons, K. B., Pierce, A. F., McGoey, M. T., Ritchey, M., & Christianson, J. P. (2018). Insular cortex mediates approach and avoidance responses to social affective stimuli. *Nature neuroscience*, 21(3), 404–414. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0071-y>
- Rossi, M. A., & Stuber, G. D. (2018). Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. *Cell metabolism*, 27(1), 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.021>
- Samuelsen, C. L., & Fontanini, A. (2017). Processing of Intraoral Olfactory and Gustatory Signals in the Gustatory Cortex of Awake Rats. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(2), 244–257. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1926-16.2016>
- Schechter, A., & Schwartz, G. J. (2018). Gut-brain nutrient sensing in food reward. *Appetite*, 122, 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.12.009>
- Schier, L. A., Blonde, G. D., & Spector, A. C. (2016). Bilateral lesions in a specific subregion of posterior insular cortex impair conditioned taste aversion expression in rats. *The Journal of comparative neurology*, 524(1), 54–73. <https://doi.org/10.1002/cne.23822>



- Schultz W. (2007). Behavioral dopamine signals. *Trends in neurosciences*, 30(5), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.007>
- Sclafani A. (2004). Oral and postoral determinants of food reward. *Physiology & behavior*, 81(5), 773–779. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.04.031>
- Sclafani, A., & Ackroff, K. (1994). Glucose- and fructose-conditioned flavor preferences in rats: taste versus postingestive conditioning. *Physiology & behavior*, 56(2), 399–405. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90213-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90213-5)
- Sclafani, A., Touzani, K., & Bodnar, R. J. (2011). Dopamine and learned food preferences. *Physiology & behavior*, 104(1), 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.039>
- Secretaría de Salud (2022). *Panorama epidemiológico de las enfermedades no transmisibles en México*. México, SSA. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/745354/PanoEpi_ENT_Cierre2021.pdf
- Small D. M. (2012). Flavor is in the brain. *Physiology & behavior*, 107(4), 540–552. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.04.011>
- Smith-Roe, S. L., & Kelley, A. E. (2000). Coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the nucleus accumbens core is required for appetitive instrumental learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(20), 7737–7742. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-20-07737.2000>
- Squire, L. R. (1986). Memory and the Brain. En Friedman, S. L., Klivington, K. A. & Peterson, R. W. *The Brain, Cognition and Education*, 171-197. Estados Unidos de América. ACADEMIC PRESS INC.
- Starr, C. J., Sawaki, L., Wittenberg, G. F., Burdette, J. H., Oshiro, Y., Quevedo, A. S., & Coghill, R. C. (2009). Roles of the insular cortex in the modulation of pain : insights from brain lesions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(9), 2684–2694. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5173-08.2009>
- Soto, A., Gasalla, P., Begega, A., & López, M. (2017). c-Fos activity in the insular cortex, nucleus accumbens and basolateral amygdala following the intraperitoneal injection of saccharin and lithium chloride. *Neuroscience letters*, 647, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.03.025>



- Swinburn, B. A., Sacks, G., Hall, K. D., McPherson, K., Finegood, D. T., Moodie, M. L., & Gortmaker, S. L. (2011). *The global obesity pandemic: Shaped by global drivers and local environments*. *Lancet* (London, England), 378(9793), 804–814. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60813-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60813-1)
- Tan, H. E., Sisti, A. C., Jin, H., Vignovich, M., Villavicencio, M., Tsang, K. S., Goffer, Y., & Zuker, C. S. (2020). The gut-brain axis mediates sugar preference. *Nature*, 580(7804), 511–516. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2199-7>
- Titulaer, J., Björkholm, C., Feltmann, K., Malmlöf, T., Mishra, D., Bengtsson Gonzales, C., Schilström, B., & Konradsson-Geuken, Å. (2021). The Importance of Ventral Hippocampal Dopamine and Norepinephrine in Recognition Memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15, 667244. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.667244>
- Touzani, K., Bodnar, R. J. & Sclafani, A. (2008). Activation of dopamine D1-like receptors in nucleus accumbens is critical for the acquisition, but not the expression, of nutrient-conditioned flavor preferences in rats. *The European journal of neuroscience*, 27(6), 1525-1533. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06127.x>
- Touzani, K, Bodnar, R.J. & Sclafani, A. (2009). Dopamine D1-like receptor antagonism in amygdala impairs the acquisition of glucose-conditioned flavor preference in rats. *The European journal of neuroscience*, 30(2), 289-298. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06829.x>
- Touzani, K, Bodnar, R.J. & Sclafani, A. (2010a). Acquisition of glucose-conditioned flavor preference requires the activation of dopamine D1-like receptors within the medial prefrontal cortex in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 94(2), 214-219. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.05.009>
- Touzani, K, Bodnar, R.J. & Sclafani, A. (2010b). Neuropharmacology of learned flavor preferences. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 97, 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.06.001>
- Touzani, K. & Sclafani, A. (2005). Critical role of amygdala in flavor but not taste preference learning in rats. *European Journal of Neuroscience*, 22(7), 1767-1774. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04360.x>
- Tsurugizawa, T., Uematsu, A., Nakamura, E., Hasumura, M., Hirota, M., Kondoh, T., Uneyama, H., & Torii, K. (2009). Mechanisms of neural response to gastrointestinal nutritive



- stimuli: the gut-brain axis. *Gastroenterology*, 137(1), 262–273.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.057>
- Tsurugizawa, T., & Uneyama, H. (2014). Differences in BOLD responses to intragastrically infused glucose and saccharin in rats. *Chemical senses*, 39(8), 683–691.
<https://doi.org/10.1093/chemse/bju040>
- Osorio-Gómez, D., Bermúdez-Rattoni, F., & Guzmán-Ramos, K. (2019). Artificial taste avoidance memory induced by coactivation of NMDA and β -adrenergic receptors in the amygdala. *Behavioural brain research*, 376, 112193.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112193>
- Vandevijvere, S., Chow, C. C., Hall, K. D., Umali, E., & Swinburn, B. A. (2015). Increased food energy supply as a major driver of the obesity epidemic: a global analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 93(7), 446–456. <https://doi.org/10.2471/BLT.14.150565>
- Ventura, R., Latagliata, E. C., Morrone, C., La Mela, I., & Puglisi-Allegra, S. (2008). Prefrontal norepinephrine determines attribution of "high" motivational salience. *PloS one*, 3(8), e3044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003044>
- Wang, L., Gillis-Smith, S., Peng, Y., Zhang, J., Chen, X., Salzman, C. D., Ryba, N., & Zuker, C. S. (2018). The coding of valence and identity in the mammalian taste system. *Nature*, 558(7708), 127–131. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0165-4>
- Warburton, E. C., & Brown, M. W. (2015). Neural circuitry for rat recognition memory. *Behavioural brain research*, 285, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.050>
- Yiannakas, A., & Rosenblum, K. (2017). The Insula and Taste Learning. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 335. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00335>
- Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of neural transmission*, 121(8), 799–817. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8>
- Zukerman, S., Ackroff, K., & Sclafani, A. (2013). Post-oral glucose stimulation of intake and conditioned flavor preference in C57BL/6J mice: a concentration-response study. *Physiology & behavior*, 109, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.11.004>