



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATECO**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Codificación de la palatabilidad de la sacarosa en  
las neuronas GABAérgicas del Hipotálamo Lateral”**

**T E S I S**

Que presenta

**MÓNICA HERNÁNDEZ LUNA**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

**Director de Tesis:           Ranier Gutiérrez Mendoza**

**Ciudad de México**

**DICIEMBRE 2018**

Este trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en el Departamento de Farmacología, en el Laboratorio de Neurobiología del Apetito bajo la tutoría del Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza; mediante el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca con número de registro: **620574** y con el donativo **620150**, Fronteras de la Ciencia **63** y Problemas Nacionales **464** y de Productos MEDIX 3247 (para RG).

# Índice general

Resumen.....	6
Abstract.....	7
Agradecimientos.....	8
Dedicatoria.....	9
Introducción.....	10
1.1 Concepto de palatabilidad.....	11
1.2 Área Hipotalámica Latera.....	15
1.2.1 Experimentos clásicos sobre la función del Área Hipotalámica Lateral...	16
1.2.2 Diversidad celular de las neuronas en el Área Hipotalámica Lateral.....	17
1.2.2.1 Neuronas Hipocretina/Orexina (Hcrt/Ox).....	19
1.2.2.2 Neuronas Hormona Concentradora de Melanina (MCH).....	19
1.2.2.3 Neuronas Glutamatérgicas del LHA.....	20
1.2.2.4 Neuronas GABAérgicas del LHA.....	20
Justificación.....	21
Hipótesis.....	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Particulares.....	22
Procedimiento Experimental.....	22
6.1 Sujetos de experimentación.....	22
6.2 Constructo Viral.....	22
6.3 Optrodo.....	23
6.4 Cirugías Estereotáxicas.....	23
6.5 Soluciones de prueba.....	24
6.6 Caja operante para pruebas conductuales.....	24
6.7 Protocolo conductual.....	24
6.8 Adquisición de datos.....	26
6.9 Histología.....	26
6.10 Análisis Estadístico.....	27
Resultados.....	27

7.1 Resultados conductuales.....	28
7.2 Una población de neuronas en el LHA codifica la palatabilidad inducida por la sacarosa.....	31
7.3 Identificación optogenética de las neuronas GABAérgicas en el LHA.....	35
7.4 Las neuronas LHA <sup>GABA</sup> incrementan su tasa de disparo para monitorear la palatabilidad inducida por la sacarosa.....	37
Discusión.....	39
Conclusiones.....	42
Perspectivas.....	43
Bibliografía.....	44

## Índice de figuras

<b>Figure 1.</b>	Proyección de la prevalencia de obesidad a 2030.....	12
<b>Figure 2</b>	Reactividad al Sabor.....	10
<b>Figure 3</b>	Esquema temporal del patrón de lengüeteos y parámetros de la palatabilidad .....	14
<b>Figure 4.</b>	Diagrama que ilustra las aferencias (A) y eferencias (B) del Área Hipotalámica Lateral en el cerebro de rata.....	16
<b>Figure 5.</b>	Fenotipos celulares en el Área Hipotalámica Lateral (LHA).....	18
<b>Figure 6.</b>	Metodología en diagrama temporal para las sesiones de registro electrofisiológico.....	25
<b>Figure 7.</b>	Caracterización de las neuronas GABAérgicas en LHA por Inmunofluorescencia.....	28
<b>Figure 8.</b>	Prueba de acceso breve ( <i>Brief Access Taste Test</i> , BATT) como prueba conductual para determinar la palatabilidad de la sacarosa..	30
<b>Figure 9.</b>	Neuronas relacionadas con la palatabilidad registradas en LHA.....	31
<b>Figure 10.</b>	Neuronas en LHA monitorean la palatabilidad de la sacarosa.....	34
<b>Figure 11.</b>	Identificación optogenética de las neuronas GABAérgicas en LHA.....	36
<b>Figure 12.</b>	Las neuronas LHA <sup>GABA</sup> incrementan su tasa de disparo para monitorear la palatabilidad a la sacarosa.....	37
<b>Figure 13.</b>	Las neuronas LHA <sup>GABA</sup> monitorean el valor hedónico de la sacarosa incrementando su tasa de disparo.....	43

## Resumen

El consumo excesivo de la sacarosa se ha asociado al incremento en el sobrepeso y obesidad en las últimas décadas. El sobreconsumo de sacarosa se debe en gran parte no sólo a su sabor dulce sino también a su palatabilidad (valor hedónico) que promueve su consumo más allá de las necesidades homeostáticas. La palatabilidad resulta de la evaluación afectiva de un sabor. En roedores, se describe por un incremento en la tasa de lengüeteos (número de lengüeteos por segundo) y un tamaño de ráfaga largo (ráfagas de lengüeteos rítmicos separados por una pausa  $\geq 0.5$  s) provocado por el incremento en la concentración de sacarosa. Por otra parte, el Área Hipotalámica Lateral (LHA, por sus siglas en inglés) se ha establecido como un punto central que orquesta aspectos fundamentales del comportamiento alimenticio. Registros electrofisiológicos en ratas han identificado neuronas en el LHA que responden a sabores palatables. Sin embargo, LHA contiene una población neuronal heterogénea. Recientemente se reportó que las neuronas GABAérgicas del LHA (LHA<sup>GABA</sup>) promueven la conducta apetitiva y consumatoria, sin importar el contenido calórico o la relevancia biológica del estímulo. Sin embargo, queda por elucidar qué tipos de neuronas en LHA están involucradas en la codificación de la palatabilidad de la sacarosa. Hipotetizamos que una subpoblación de las neuronas LHA<sup>GABA</sup> codifica las respuestas oromotoras provocadas por la palatabilidad de la sacarosa. Para poner a prueba esta hipótesis se utilizaron ratones transgénicos (Vgat-IRES-cre) que expresaron el canal de rodopsina tipo 2 (ChR2) en neuronas LHA<sup>GABA</sup>. A través de registros electrofisiológicos con un optrodo (fibra óptica y electrodos de tungsteno), se examinó la actividad de neuronas del LHA, mientras los sujetos realizaban la prueba de Acceso Breve (*Brief Access Taste Test*, BATT, por sus siglas en inglés). Al finalizar la sesión se empleó la fotoidentificación optogenética (*Optotagging*) de las neuronas LHA<sup>GABA</sup>. En BATT, un ensayo consiste en un periodo de recompensa de 4 s donde el sujeto puede lengüetear un bebedero y ser recompensado con 2  $\mu$ L de una solución de sacarosa distinta (0, 1.5, 3, 10, 18 o 32% peso/vol) en cada ensayo. El promedio de la tasa de lengüeteos y el tamaño de la ráfaga se utilizaron para medir la palatabilidad evocada por la sacarosa. Se observó un incremento en la tasa de lengüeteos y un mayor tamaño de la ráfaga en función de la concentración de sacarosa. Se encontraron dos poblaciones de neuronas con dos tipos de respuestas relacionadas a la palatabilidad de la sacarosa, una que incrementa (correlación positiva) y otra que decreta (negativa) su tasa de disparo al incrementarse la palatabilidad de la sacarosa. El subgrupo de neuronas no-GABAérgicas, es decir que se inhibieron durante la fotoestimulación, monitorearon el valor hedónico de la sacarosa, pero con una correlación negativa en su tasa de disparo en función de la concentración de sacarosa. Más importante, la población que incrementa su tasa de disparo en función de la concentración de sacarosa en su mayoría correspondía a las neuronas fotoidentificadas como LHA<sup>GABA</sup>. Nuestros datos demuestran que las neuronas LHA<sup>GABA</sup> de forma fisiológica codifican la palatabilidad de la sacarosa.

## Abstract

The prevalence of overweight and obesity has scaled in the last decades. One culprit of this epidemic is the overconsumption of sucrose, which due to its high palatability (hedonic value) promotes its intake beyond homeostatic need. Palatability is the affective evaluation of a tastant. In rats, it is measured by an increase in lick rate (number of licks per second) and a larger bout size (rhythmic burst licks with a inter lick interval  $\geq 0.5$  s) elicited by increasing sucrose concentration. The Lateral Hypothalamic Area (LHA) has been established as an important node on the feeding circuit. Extracellular recordings on rats revealed that LHA neurons respond to palatable tastants. Although, LHA contains a heterogeneous population of neurons. Recently it has been reported that the LHA<sup>GABA</sup> promotes appetitive and consummatory behaviors, regardless of the caloric content or biological relevance of the consumed stimuli. However, it remains unclear which LHA neuron types are involved in encoding sucrose's palatability. We hypothesized that a subpopulation of LHA<sup>GABA</sup> neurons encode the oromotor palatability responses elicited by sucrose. To address this issue, we used transgenic mice (Vgat-IRES-cre) that express channelrhodopsin type 2 (ChR2) on LHA<sup>GABA</sup> neurons. Employing extracellular optrode (16 electrodes and a optic fiber) recordings, we examined single unit LHA responses in these subjects performing a Brief Access Taste Test (BATT). After the task, we used optogenetic tagging (Optotagging) to identify LHA<sup>GABA</sup> neurons. In BATT, a trial consists of a reward period of 4s where the subject can lick the sipper to be rewarded with 2  $\mu$ L of a solution with different sucrose concentration (0, 1.5, 3, 10, 18 or 32 wt/vol %) on each trial. The average number of licks per second (lick rate) and the size of the bouts (bursts of rhythmic licks separated by a pause  $\geq 0.5$  s) were used as direct measures of palatability. An increase in lick rate and a larger bout size were observed as the sucrose concentration increased. We found two populations of neurons with distinct sucrose palatability-related responses, one that increased (positive correlation) and other that decreased (negative correlation) their firing rate as the sucrose's palatability increased. We also found that a portion of these palatability-related neurons were identified as LHA<sup>GABA</sup> neurons. Moreover, another subset of palatability-related neurons was inhibited by photostimulation, indicating that they were non-GABAergic neurons, but they also belong to the same circuitry modulated by the photostimulation of LHA<sup>GABA</sup> neurons. Finally, we also found a subpopulation of non-GABAergic LHA neurons (i.e non-responsive to photostimulation) also tracked the hedonic value of sucrose but with a negative correlation. We conclude that GABAergic neurons in LHA, under physiological conditions, encode sucrose's palatability increasing their firing rate.

# Agradecimientos

A Oscar Xavier, mi amigo, mi copiloto, mi colega, mi confidente, mi maestro, mi guerrero, mi compañero de vida. Por inspirarme a continuar aprendiendo, por alentarme a saltar cuando me sentía al borde del fracaso, por iluminar mi camino con su conocimiento, por permitirme acompañar su preparación como doctorante. Para seguir creciendo, seguir cuestionándonos el porqué de las cosas, seguir aprendiendo, seguir experimentando y continuar compartiéndonos lo más valioso que poseemos, el tiempo.

A Jorge Luis-Islas, a Alam Iztac, a Diana Aketzali, por no solo instruirme en el ámbito de las Neurociencias y guiarme en las cirugías, el manejo y análisis de datos, sino por brindarme su amistad y confianza. Por esas buenas pláticas de tan diversos temas, que volvían más ameno y divertido el ambiente del laboratorio. Por su disponibilidad y amabilidad, cuando me invadían las dudas e incertidumbre.

A mis demás colegas y amigos del laboratorio; Blanca Duran, Esmeralda Fonseca, Claudia Perez, Silvia Mejia, Benjamin. Arroyo, Vicente Sandoval por enseñarme su pasión por la ciencia.

Un agradecimiento especial para Miguel Villavicencio, por su colaboración y apoyo en el presente trabajo, por ser mi mentor en el análisis de los datos neuronales y su correcta interpretación.

Agradezco también a Fabiola Hernández y Mario Gil, por transmitirme sus conocimientos técnicos y prácticos que fueron fundamentales para el desarrollo del presente trabajo. Desde el correcto manejo y cuidado de los sujetos de experimentación hasta el ensamblaje fino y preciso de mi instrumento de medición. Agradezco toda la ayuda brindada ya que siempre lo hicieron con su peculiar y particular entusiasmo.

A mis amigos de generación, Yarely Mabel, Victoria Barrios, José Eduardo y José Antonio, por nuestras reuniones fuera del ámbito académico, que, aunque con cada una de nuestras preferencias que nos llevaron a caminos distintos, nuestra amistad y apoyo prevalece.

A el Dr. Ranier Gutiérrez por incluirme en su equipo de investigación, por orientarme y respaldarme en la presentación de este trabajo en uno de los congresos más relevantes para las Neurociencias, lo que me enorgullece. Por exigirme siempre un poquito más y representar un reto constante que estoy segura es determinante para mi crecimiento profesional y personal.

Finalmente quiero agradecer a todos aquellos compañeros (as) y amigos (as) que conocí en este centro de investigación, quienes a través de sus comentarios y conversaciones nutren las raíces de mi ser.



# Dedicatoria

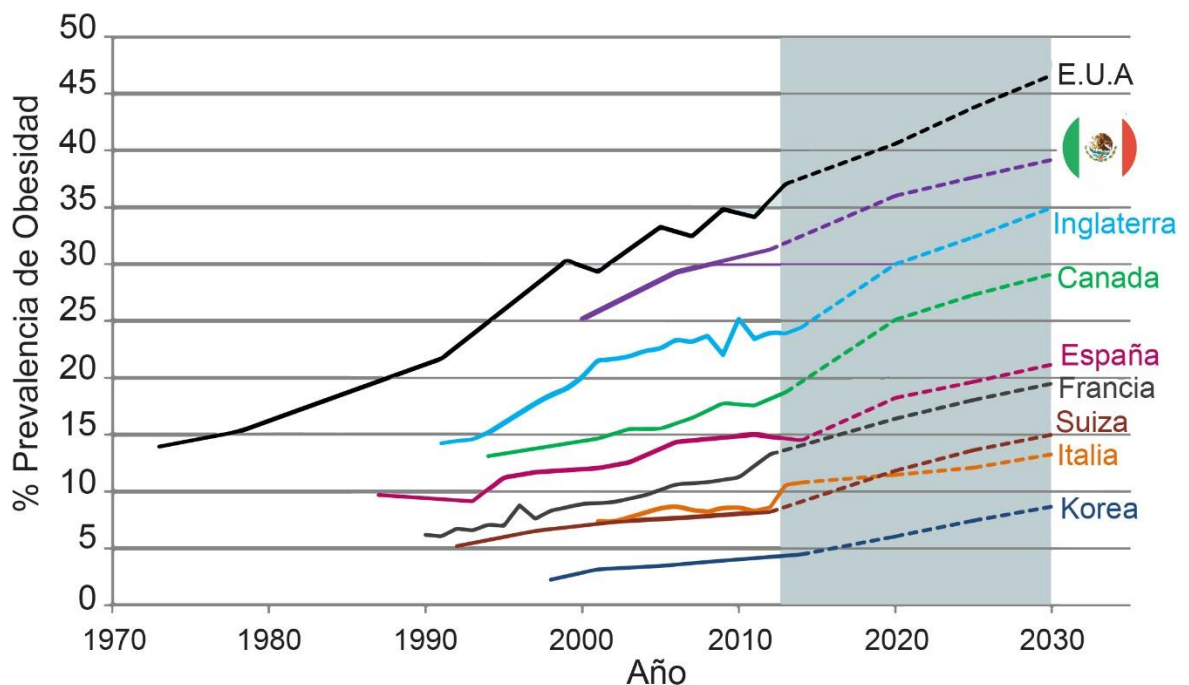
A mi padre y madre.

Por su amor, constancia y ejemplo. Por esa probabilidad aleatoria, a la que me gusta llamar destino, de darme la oportunidad de estar aquí, y ser cuidada por estas dos grandes personas. A ellos, quienes sin importarles el grado académico que llegue a alcanzar, su mayor anhelo es verme feliz. Agradezco su compañía e invaluable apoyo a lo largo de este viaje.

## Introducción

En las décadas recientes, la prevalencia de sobrepeso y obesidad se ha incrementado en la mayoría de los países (**Fig. 1**). El sobrepeso se define con un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 25, la obesidad como  $IMC \geq 30$  y la obesidad mórbida como  $IMC \geq 35$ . Es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas como: enfermedades cardiovasculares, diabetes, desordenes esqueleto-musculares y algunos tipos de cáncer (OMS). De acuerdo con datos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), para México, la prevalencia de obesidad en adultos; es del 27.7% en hombres y de 38% en mujeres (OECD, 2017). El consumo de azúcar en la forma de alimentos y bebidas endulcoradas, se ha incrementado y se ha asociado con el incremento en los índices de obesidad (Popkin et al., 2003; Te Morenga et al., 2012; Lee et al., 2015).

### Proyección de la prevalencia de obesidad a 2030, diferentes países



**Figure 1. Proyección de la Prevalencia de obesidad a 2030.** La OCDE estima que, en 2030, 40% de los adultos mexicanos tendrán obesidad. Fuente: Análisis de la información de la encuesta nacional de Salud, OCDE. Traducción al español de (OECD, 2017).

La obesidad es el resultado de una interacción increíblemente compleja entre el ambiente, la genética, el equilibrio homeostático y factores hedónicos. Además de la necesidad metabólica, la palatabilidad y la recompensa son determinantes para la ingestión de un alimento en particular. Alimentos altamente palatables, si son fácilmente accesibles, son ingeridos incluso si las necesidades homeostáticas estas satisfechas, es decir en un estado saciado ([Saper et al., 2002](#); [Berthoud, 2004](#); [Volkow et al., 2005](#)). Diferenciar entre apetito (valor nutricional) y palatabilidad significa distinguir entre la disposición para alimentarse y el placer sensorial de comer ([Blundell et al., 1991](#)). De hecho, el sentido común revela que el placer es el principal factor en el control del consumo de alimento ([Young, 1959](#); [Pfaffmann, 1960](#); [Wyrwicka, 1969](#)).

### **Concepto de palatabilidad**

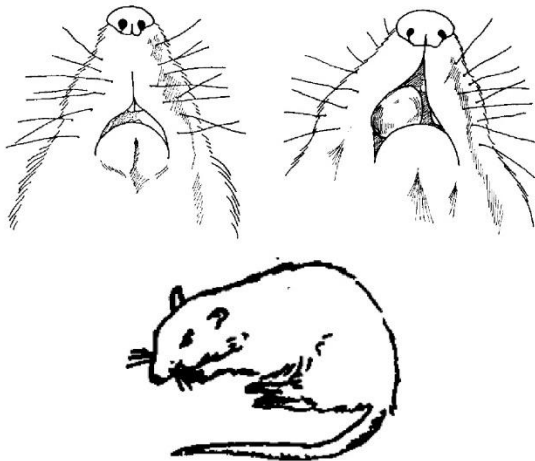
La palatabilidad, o el componente hedónico del alimento, resulta de un proceso central integrativo que evalúa factores sensoriales como el sabor y olor de un alimento, el estado fisiológico, la historia individual y determina la respuesta que provoca el alimento ([Berridge et al., 1983](#); [Le Magnen, 1987](#); [Cabanac, 1989](#)). Se concibe que la palatabilidad varía en una dimensión continua, de muy positivo, neutro, a muy negativo. De acuerdo a esta visión de la palatabilidad, un sabor podría presentar palatabilidad positiva, negativa o neutra, pero no podría ser positiva y negativa al mismo tiempo ([Young et al., 1964](#); [Berridge et al., 1983](#)).

La palatabilidad por naturaleza es un concepto subjetivo, entonces no puede ser realmente aplicado a sujetos no humanos ([Davis, 1973](#)). El principal objetivo de la investigación de la conducta alimenticia es entender como una señal sensorial (el sabor) eventos post-ingestivos y el estado fisiológico (hambre y saciedad) interactúan y se integran para controlar la cantidad de alimento consumido.

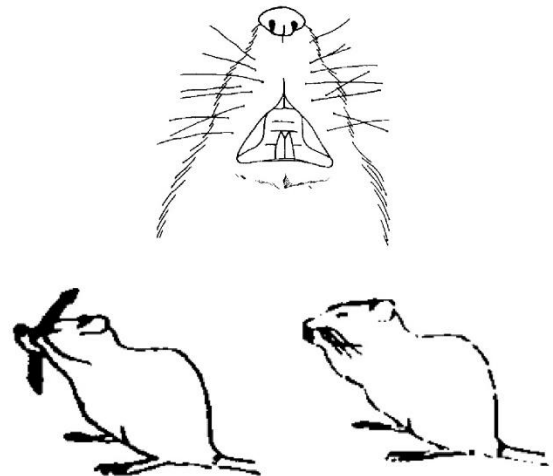
Debido a que el sabor es crucial para la aceptación o el rechazo de un alimento, los mecanismos que controlan la ingesta podrían ser definidos por el estudio del proceso de evaluación del sabor. Cuando un sabor dulce o amargo es colocado en la boca de un infante humano, se pueden observar expresiones faciales innatas y estereotipadas;

e.g., un sabor dulce provoca un ligero masticado rítmico, una expresión relajada acompañada de un ligero repunte de las esquinas de la boca. Mientras que un sabor amargo, agrio o muy salado provoca una mueca desagradable, alejamiento y movimientos orales como para expulsar el sabor ofensivo (boqueos *gapping or gagging*) (Steiner, 1973, 1979). Se ha observado cierta similitud de estos patrones orofaciales en ratas (Fig 2) (Grill et al., 1978; Schwartz et al., 1984; Spector et al., 1988). A estas respuestas oromotoras, se les llama reactividad al sabor y se agrupan en dos categorías: apetitiva y aversiva. Estas respuestas orales, se han utilizado como medidas cualitativas de la evaluación que los roedores hacen sobre la palatabilidad inducida por la estimulación con sabores (Berridge et al., 1983, 1985; Schwartz et al., 1984).

## A Reacciones Hedónicas



## B Reacciones Aversivas

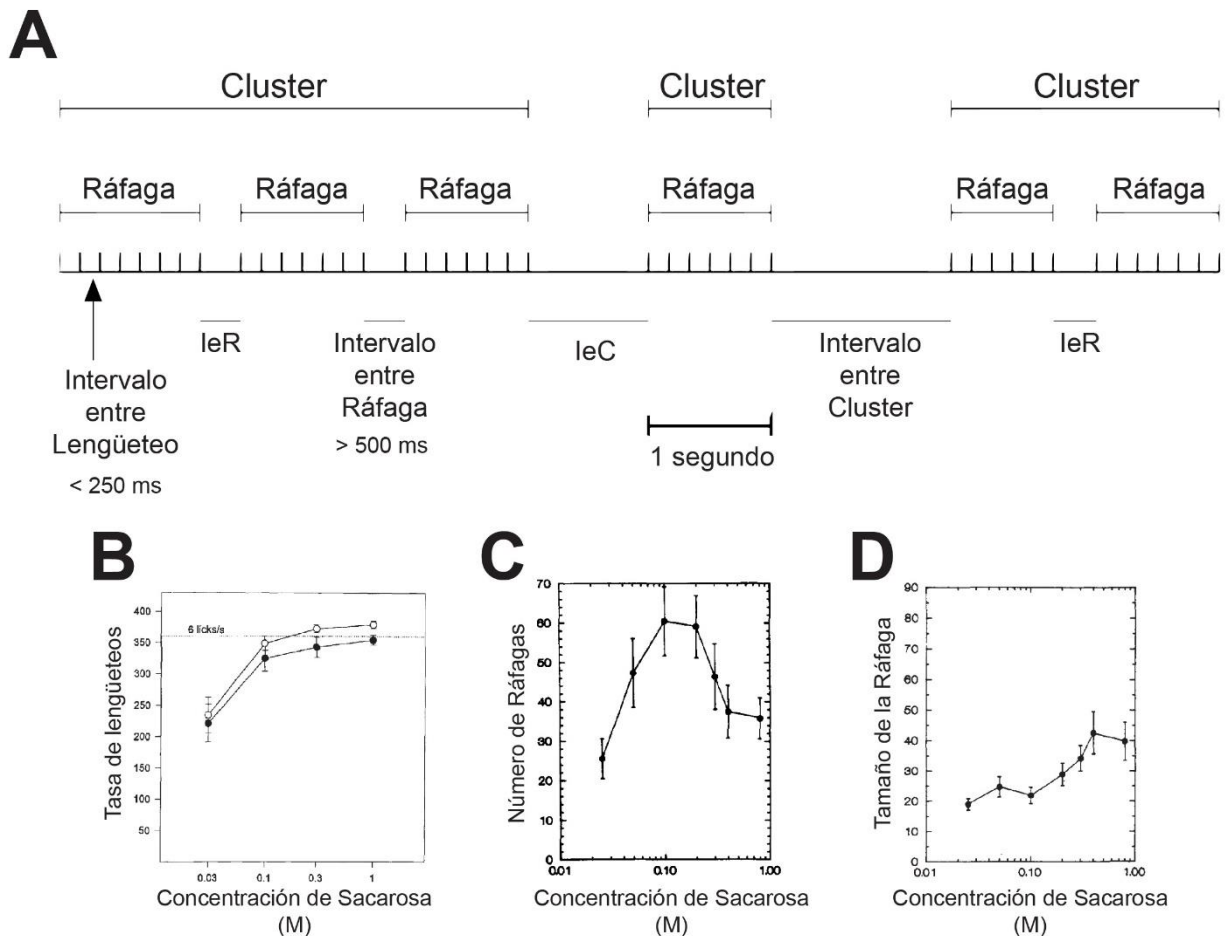


**Figure 2. Reactividad al Sabor.** A) Reacciones hedónicas positivas provocadas por la sacarosa y otros sabores palatables. Las reacciones hedónicas incluyen movimientos rítmicos de la lengua, protrusión lateral de la lengua y el lamido de pata. B) Reacciones aversivas provocadas por quinina y otros sabores no palatables. Las reacciones aversivas incluyen; encogimiento de la barbilla, alejamiento y movimientos con el propósito de expulsar el sabor ofensivo. Traducción al español de:(Grill et al., 1978).

Para examinar el proceso hedónico generado por combinaciones de soluciones, Paul T. Young y colaboradores, estudiaron el patrón de lengüeteos frente a una variedad de estímulos gustativos con propiedades hedónicas. Desarrollaron el método llamado Ensayo de Acceso Breve a un Sabor (*Brief Access Taste Test*, BATT), el cual consiste en presentar un sabor de forma breve (e.g., por 4 s). Determinando el movimiento de la lengua (lengüeteos) durante el periodo de presentación de la solución de prueba, se refleja la palatabilidad o propiedades hedónicas de esta misma (Young et al., 1953, 1964; Young, 1959). La prueba de acceso breve se recomienda debido a que si la exposición al azúcar es prolongada su nivel de aceptabilidad declina a medida en que se alcanza el estado de saciedad, por lo que en esta prueba se evitan las señales calóricas post-ingestionales negativas que inhiben el consumo (Young, 1959; Boughter et al., 2002).

Para poder entender cómo el cerebro controla el volumen ingerido de un líquido, primero se necesita entender cómo el patrón de lengüeteos cambia en respuesta a las variables (e.g., su palatabilidad) que influyen su consumo. El patrón de lengüeteos, en roedores, es un comportamiento estereotipado que involucra el movimiento cíclico y rítmico de la lengua (protrusión y extrusión a 7-9 Hz). Está bajo el control de un grupo de neuronas en el núcleo V, VII y XII en la medulla oblongata, el cual funciona colectivamente como un Centro Generador de Patrones (CGP) localizado en la formación reticular (Travers et al., 1991; Nakamura et al., 1995). El estudio de la microestructura del patrón de lengüeteo, durante las pruebas de consumo, describe de forma detallada la conducta consumatoria del animal. La tasa de lengüeteos es el número de lengüeteos por segundo, mientras que una ráfaga de lengüeteos es definida por un intervalo entre lengüeteos (IEL) menor a 250 ms y refleja una serie de movimientos rítmicos de la lengua que ocurren en ráfagas (“burst” en inglés). El número de lengüeteos que ocurren enmarcados entre una pausa < 500 ms definen a un cluster de lengüeteos (los cuales puede contener uno o más ráfagas de lengüeteos) y el tamaño y duración de los cluster definen la palatabilidad de un sabor (**Fig 3A**) (Davis, 1973).

Altas concentraciones de sacarosa producen periodos largos de lengüeteos, mientras que concentraciones bajas producen ráfagas (o clusters) cortos de lengüeteos. Por lo que la determinación de los parámetros: tasa de lengüeteo, número y tamaño de la ráfaga reflejan la potencia hedónica (palatabilidad) de la solución de prueba (**Fig. 3B-D**) (Asin et al., 1992; Davis et al., 1992, 1993). En este sentido un estímulo muy palatable presenta una tasa de lengüeteo mayor, menor cantidad de ráfagas, pero de mayor duración.

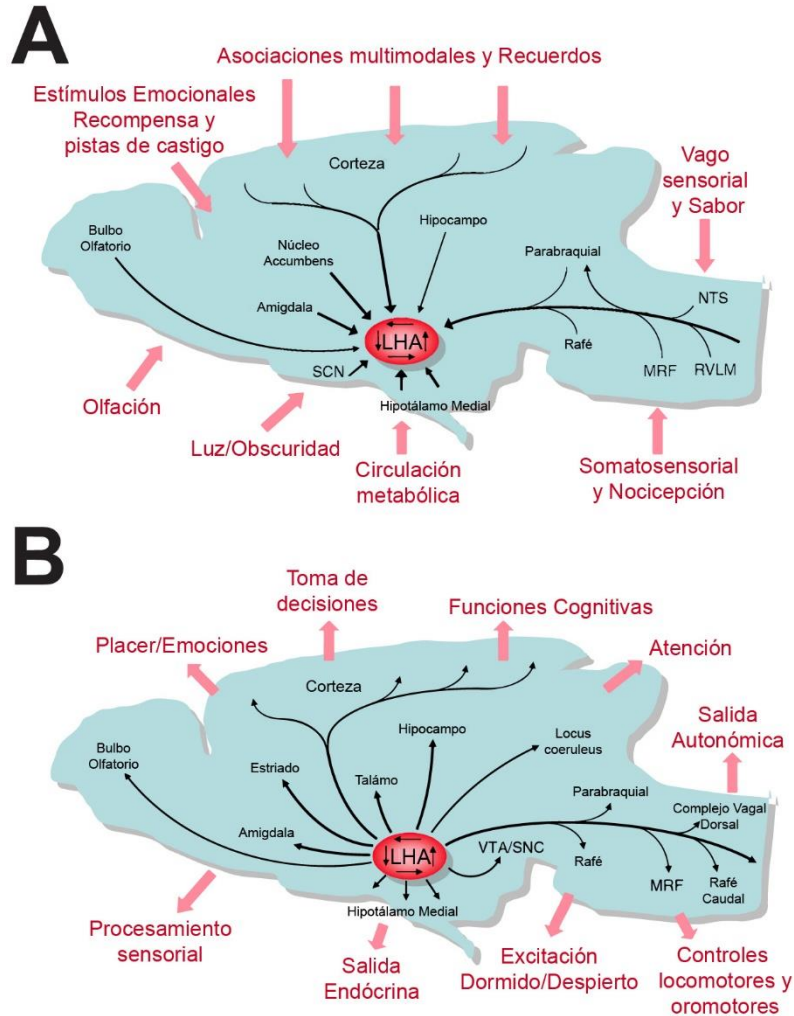


**Figure 3. Esquema temporal del patrón de lengüeteos y parámetros de la palatabilidad.** **A)** Las líneas verticales representan lengüeteos individuales separados por un intervalo entre lengüeteo (leL). Las ráfagas son lengüeteos rítmicos separados por  $leL \leq 250$  ms, los clusters son lengüeteos rítmicos separados por el  $leL \leq 500$  ms, el intervalo entre ráfagas (leR) es el intervalo entre ráfaga ( $leL > 250$  ms y  $\leq 500$  ms), y el intervalo entre clusters (leC) es el intervalo entre clusters ( $leL > 500$  ms). Traducción al español de: (Davis et al., 1992). **B)** Promedio ( $\pm$ SEM) del número de lengüeteos durante el primer minuto del comienzo del lengüeteo para todas las condiciones ( $n = 15$ ). Círculos cerrados representan la condición sin privación, círculos abiertos representa la condición de privación de 23 hrs. Traducción al español de: (Spector et al., 1998). **C)** Promedio ( $\pm$ SEM) del número de ráfagas para 12 ratas como función de la concentración de sacarosa. **D)** Promedio ( $\pm$ SEM) del número de lengüeteos en una ráfaga (tamaño de la ráfaga) para 12 ratas como función de la concentración de sacarosa. Traducción al español de: (Davis et al., 1992).

## Área Hipotalámica Lateral

El hipotálamo está conformado por múltiples núcleos y es una de las regiones más conservadas filogenéticamente en el cerebro de los vertebrados, tiene un papel crítico en el mantenimiento homeostático fisiológico y de varias conductas motivadas (hambre, sed, agresividad y la conducta sexual). El Área Hipotalámica Lateral (LHA, por sus siglas en inglés), en humanos, es un área pequeña dentro del hipotálamo, yace en el interior del fórnix y supraposterior al nervio y quiasma óptico ([Allen Human Brain Atlas](#)). Es el eje más relevante en la regulación de aspectos conductuales de los vertebrados como excitación, alimentación, balance energético, estrés, conductas recompensantes y motivación ([Berthoud et al., 2011](#); [Burdakov et al., 2013](#); [Hurley et al., 2014](#); [Brown et al., 2015](#); [Stuber et al., 2016](#)). En roedores, LHA, se funciona rostralmente con el área preóptica y caudalmente con el área tegmental ventral (VTA, por sus siglas en inglés). Sus límites mediales son los núcleos dorsomediales, ventromediales y el núcleo arcuato, sus bordes anteriores son el área preóptica medial y el área hipotalámica anterior, sus bordes laterales son la capsula interna, el tracto óptico y caudalmente el núcleo subtalámico ([Allen Mouse Brain Atlas](#)).

Las aferencias principales del área hipotalámica lateral son la corteza prefrontal, corteza orbitofrontal, corteza insular, corteza olfatoria, amígdala, formación hipocampal, núcleo accumbens shell y estructuras del talo cerebral como el núcleo del tracto solitario (**Fig 4A**) ([Horst et al., 1989](#); [Kampe et al., 2009](#)). Por otra parte, presenta eferencias hacia el manto cortical, la formación hipocampal, la amígdala, los ganglios basales, el tálamo, mecenfeló y puente, tallo cerebral y espina dorsal, así como otros núcleos del hipotálamo (**Fig. 4B**) ([Berk et al., 1982](#); [Horst et al., 1989](#)).



**Figure 4 Diagrama que ilustra las aferencias (A) y eferencias (B) del Área Hipotalámica Lateral en el cerebro de rata.** Abreviaciones: MRF, Formación Reticular Mesencefálica, NTS, Núcleo del Tracto Solitario, SNC, Sustancia Nigra Compacta, SCN, Núcleo supraquiasmático, RVLM, Medulla Rostral Vento Lateral, VTA. Área Tegmental Ventral. Traducción al español de (Berthoud et al., 2011).

### Experimentos clásicos sobre la función del Área Hipotalámica Lateral

En experimentos realizados hace más de 60 años se identificó a LHA como "el centro de la alimentación" (Hetherington et al., 1940; Anand et al., 1951). Lesiones bilaterales de LHA inducen el "Síndrome Hipotalámico Lateral" caracterizado por hipofagia, adiposidad, hipoactividad y pérdida de peso (Hetherington et al., 1940; Anand et al., 1951; Teitelbaum et al., 1962; Hoebel, 1965; Boyle et al., 1975). Mientras que la estimulación eléctrica de LHA resulta en un consumo voraz y ganancia de peso (Delgado et al., 1953; Hoebel et al., 1961; Margules et al., 1961). Desde entonces nuestro entendimiento sobre la organización neuronal que subyace a las bases biológicas de



conductas motivadas ha avanzado y el concepto de “centros” ha sido remplazado por circuitos neuronales (Bernardis et al., 1993, 1996). LHA es ahora considerado un nodo importante dentro del circuito de alimentación, debido a que integra los diferentes impulsos de alimentación y el comportamiento motivacional (parte apetitiva de la conducta de ingesta) (Stellar, 1954; Swanson, 2000; de Araujo et al., 2006; Berthoud et al., 2011; Clifton, 2017; Sternson et al., 2017). En este sentido, podríamos cuestionarnos si la estimulación del LHA influencia y modifica el valor de la recompensa. Se ha reportado que las neuronas de LHA responden de forma diferente ante estímulos gustativos con distinta palatabilidad (una población es modulada por estímulos de alta palatabilidad y la otra por estímulos aversivos) (Li et al., 2013). Lo anterior sugiere que quizás la codificación hedónica y las respuestas producidas por un alimento ocurren en el LHA.

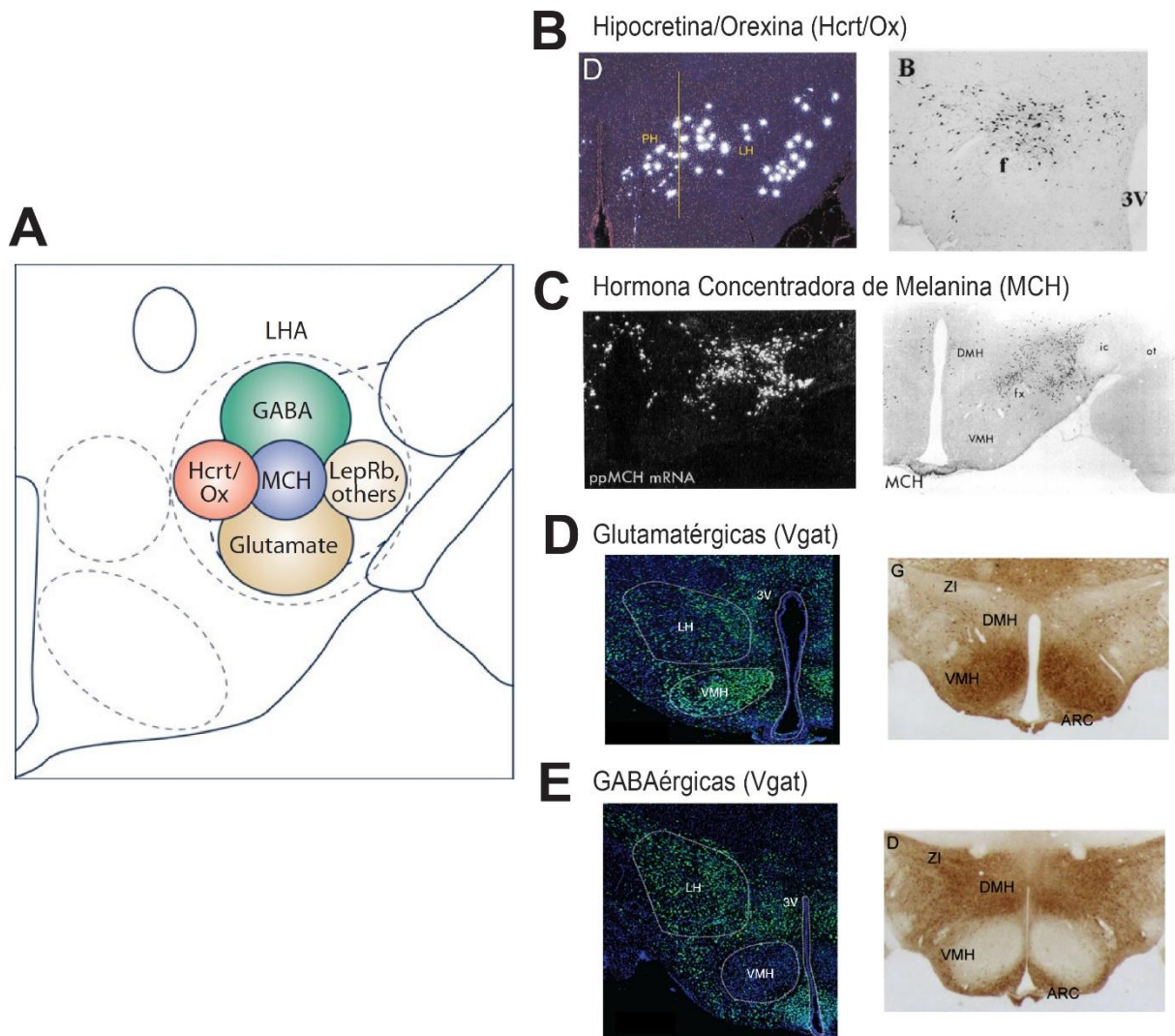
La naturaleza multimodal y multifuncional del LHA se puede atribuir a su población neuronal heterogénea que exhibe una diversidad fenotípica y neuroquímica en sus distintos tipos celulares que lo conforman (Adamantidis et al., 2009; Berthoud et al., 2011; Knight et al., 2012; Karnani et al., 2013; Mickelsen et al., 2017).

### **Diversidad celular de las neuronas en el LHA**

Subyacente a las diversas funciones de LHA esta su población neuronal heterogénea, de la cual sólo unos pocos tipos celulares han sido identificados y caracterizados (**Fig. 5**) (Para más detalles ver (Berthoud et al., 2011; Stuber et al., 2016)).

Las neuronas en el LHA han sido burdamente clasificadas por la expresión de neuropéptidos de la Hipocretina/Orexina (Hcrt/Ox) (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998) o la Hormona concentradora de melanina (MHC) (Bittencourt et al., 1992) o su expresión de ciertos marcadores como el transportador vesicular tipo 2 de glutamato (Vglut2) (Ziegler et al., 2002; Collin et al., 2003; Rosin et al., 2003), así como por marcadores neuronales GAD65, GAD67 y VGAT componentes necesarios para la síntesis y liberación de Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Hassani et al., 2010; Karnani et al., 2013; Chee et al., 2015; Jennings et al., 2015). Los sistemas Hcrt/Ox y MCH fueron los primeros examinados por su papel en la alimentación y la regulación del balance

energético utilizando enfoques de delección farmacológica y genética (Pissios et al., 2006; Sakurai et al., 2011; Sakurai, 2014; Brown et al., 2015).



**Figure 5. Fenotipos celulares en el Área Hipotalámica Lateral.** **A)** Diagrama de un corte coronal, que denota las subpoblaciones neuronales que comprenden a LHA. LHA está compuesta por una población heterogénea de neuronas definidas por marcadores neuroquímicos o neuropéptidos, por ejemplo, neuronas Hipocretina/Orexina, Hormona Concentradora de Melanina (MCH), y neurotransmisores inhibitorios como GABA y otros excitatorios como Glutamato. Tomado de: (Bonnavion et al., 2016). **B)** Autoradiografía de la hibridación in situ para las neuronas que contienen el ARN mensajero para prepro-orexina. Tomado de (Sakurai et al., 1998). Localización inmunohistoquímica de las células que contienen el péptido prepro-hipocretina a nivel del hipotálamo. Tomado de (Broberger et al., 1998). **C)** Autoradiografía para las neuronas positivas para el ARN mensajero de prepro-Hormona Concentradora de Melanina (ppMCH). Micrografía de la tinción para MCH a nivel del hipotálamo. Tomado de (Bittencourt et al., 1992) **D)** Micrografía de la expresión de canal rodopsina tipo II (ChR-2) en la sepa Vglut2-IRES-Cre. Inmunohistoquímica para la expresión de la proteína verde fluorescente (eGFP) en la sepa Vglut2-IRES-Cre, la coloración café representa la actividad de la Cre recombinasa. Tomados de (Vong et al., 2011; Jennings et al., 2013). **E).** Micrografía de la expresión de ChR2 en la sepa Vgat-IRES-Cre. Inmunohistoquímica para la expresión de eGFP en la sepa Vgat-IRES-Cre, la coloración café representa la actividad de la Cre recombinasa. Tomados de (Vong et al., 2011; Jennings et al., 2015).

### **Neuronas Hipocretina/Orexina (Hcrt/Ox)**

Neuronas que sintetizan y liberan el neuropéptido hipocretina/orexina (**Fig. 5B**) se encuentran en LHA y se ha reportado que presentan un fenotipo glutamatérgico (Harrison et al., 1999; Rosin et al., 2003). Evidencia basada en la expresión genética sugiere que una subpoblación de estas neuronas expresa la maquinaria necesaria para la síntesis de GABA (Balcita-Pedicino et al., 2002; Guan et al., 2002; Harthoorn et al., 2005; Mickelsen et al., 2017).

La estimulación optogenética de las neuronas hipocretina/orexina incrementa el estado de despierto (Adamantidis et al., 2007, 2009) además son particularmente importantes para el comportamiento motivado (Giardino et al., 2014; Baimel et al., 2015). La ablación genética de las neuronas hipocretina/orexina causa narcolepsia, hipofagia y obesidad (Hara et al., 2001). De acuerdo a estos hallazgos se sugiere que estas neuronas regulan principalmente la excitación, así como comportamientos relacionados con la recompensa y la estabilización del ciclo vigilia sueño (Haynes et al., 2002; Yamanaka et al., 2003; Harris et al., 2005; Lawrence et al., 2017).

### **Neuronas Hormona Concentradora de Melanina (MCH)**

Las neuronas MCH (**Fig. 5C**) son consideradas GABAérgicas por la co-localización de isoformas de las enzimas sintetizadoras de GABA (GAD65, GAD67) (Elias et al., 2001; Harthoorn et al., 2005; Sapin et al., 2010), sin embargo, existe una subpoblación de neuronas MCH que adicionalmente a la expresión de GAD65 y/o GAD67 también marcadores para glutamato (Vglut2) (Elias et al., 1998; Harthoorn et al., 2005; Jengo et al., 2013; Mickelsen et al., 2017) lo que sugiere que las neuronas MCH están compuestas de subgrupos de células tanto inhibitorias como excitatorias. La activación optogenética de las neuronas MCH promueve el estado REM del sueño (Jengo et al., 2013) y la sobre-expresión de estas neuronas resulta en la hiperfagia y obesidad (Ludwig et al., 2001). Esta evidencia sugiere que el sistema MCH regula de forma crítica la homeostasis energética y la recompensa (Qu et al., 1996; Monti et al., 2013).

## Neuronas Glutamatérgicas de LHA

Las neuronas glutamatérgicas (**Fig. 5D**) que expresan Vglut2 son cruciales en la alimentación, ya que su ablación propicia la alimentación y la ganancia de peso ([Stamatakis et al., 2016](#)). La estimulación optogenética de las neuronas glutamatérgicas de LHA suprime la alimentación en sujetos hambrientos y produce una señal de valencia negativa o aversiva ([Jennings et al., 2013](#)). Cabe mencionar que esta población está comprendida también por neuronas Hcrt/orexina y una subpoblación de neuronas MCH ([Bonnayon et al., 2016](#); [Mickelsen et al., 2017](#)).

## Neuronas GABAérgicas de LHA

El LHA también contiene neuronas GABAérgicas (**Fig 5E**) ([Rosin et al., 2003](#); [Wang et al., 2009](#)), que incluye aquellas que expresan enzimas para la síntesis de GABA: GAD65 y GAD67 ([Shin et al., 2007](#); [Karnani et al., 2013](#)) y aquellas que expresan el transportador vesicular para GABA (Vgat) ([McIntire et al., 1997](#); [Vong et al., 2011](#)).

Manipulaciones de las neuronas GABAérgicas, que expresan Vgat (LHA<sup>GABA</sup>) las ha identificado como cruciales para el control de la conducta de alimentación. Estas neuronas (no expresan Hcrt/orexina, ni MCH), de acuerdo a distintos patrones de activación, median la conducta de aproximación hacia un alimento (respuesta apetitiva) y el consumo del alimento (respuesta consumatoria) ([Jennings et al., 2015](#)). Así mismo, su activación incrementa el consumo de cualquier estímulo disponible, incluyendo aquellas que contienen calorías (alimento, sacarosa y etanol), aquellos que carecen de calorías (sacarina y agua) y aquellas que carecen de relevancia biológica (masticación de objetos no comestibles como corcho de madera) ([Navarro et al., 2016](#)).

En vista de estos resultados que describen los efectos de las neuronas GABAérgicas del LHA, cabe preguntarnos si la variabilidad en los efectos del comportamiento alimenticio y de recompensa podrían ser explicados por múltiples subpoblaciones neuronales, o si las mismas neuronas son quienes exhiben una co-liberación de diferentes neurotransmisores/neuropéptidos que conducen a un comportamiento u otro.

En el tipo celular y los circuitos neuronales de LHA subyace la promesa de identificar potenciales blancos farmacológicos para el tratamiento de varias enfermedades incluyendo enfermedades neuropsiquiátricas, adicciones, desordenes del sueño y la obesidad.

## **JUSTIFICACIÓN**

Nuestro ambiente alimenticio actual, con una sobreabundancia de alimentos altamente palatables (apetecibles), puede afectar el funcionamiento fisiológico de los circuitos del área hipotalámica lateral que refuerzan el consumo, por lo tanto, favorece el consumo en exceso de alimentos altamente calóricos y contribuye a la creciente incidencia en obesidad.

El LHA contiene dos poblaciones de neuronas con distintas propiedades responsivas relacionadas con la palatabilidad: una modulada por el estímulo de palatabilidad y la otra por el estímulo aversivo ([Li et. al. 2013](#)). Experimentos con activación optogenética indica que una población de neuronas GABAérgicas de LHA modulan comportamientos consumatorios independientemente del contenido calórico o la relevancia biológica de los estímulos ([Navarro et. al. 2016](#)). Sin embargo, aún se desconoce sí, de forma fisiológica, las neuronas GABAérgicas de LHA codifican la palatabilidad de la sacarosa. Por lo que nos planteamos la siguiente hipótesis:

## **HIPÓTESIS**

La población de las neuronas GABAérgicas ( $LH^{GABA}$ ) en LHA codifican la palatabilidad de la sacarosa.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar si la población de neuronas GABAérgicas en LHA monitorean las concentraciones de sacarosa y por ende su valor hedónico.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Expresar el canal de rodopsina tipo 2 exclusivamente en neuronas GABAérgicas del LHA.
- Realizar registros electrofisiológicos en LHA frente a distintas concentraciones de sacarosa mediante el ensayo de Acceso Breve a un Sabor (*Brief Access Taste Test, BATT*)
- Determinar si las respuestas neuronales unitarias observadas están relacionadas con la palatabilidad de la sacarosa.
- Fotoidentificar a la población GABAérgica mediante la prueba de Latencia a la primera Espiga asociada a un Estímulo (*Stimulus-Associated spike Latency Taste, SALT*).
- Examinar si la población GABAérgica participa en las respuestas relacionadas con la palatabilidad de la sacarosa.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

### Sujetos de experimentación

Se utilizaron ratones, 1 macho y 2 hembras adultos, de la sepa *Slc32a1<sup>tm2(cre)</sup>Low/L* (*Vgat-IRES-Cre*, [Vong et al., 2011](#)) de 20-25 gramos de peso. Se mantuvieron en ciclos de 12:12 horas luz/oscuridad (07:00 hrs se encienden las luces y 19:00 hrs se apagan), con acceso a alimento (Chow, LabDiet 5008) y agua *ad libitum*. Se privó del acceso a agua 12 horas previas a los ensayos conductuales. Si los sujetos perdían más del 85% de su peso inicial, el protocolo de privación era suspendido. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV.

### Constructos Virales.

Adenovirus inducible por Cre-recombinasa codificante para canal de rodopsina tipo 2 ChR2-eYFP (AAV5-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP-WPRE-HGHpA). Paquete UNC Vector Core Facility 100µL con título de  $\sim 2 \times 10^{12}$  cfu/mL.

## **Optrodo.**

Compuesto por un arreglo de 16 alambres de tungsteno ( $35\ \mu$ ) que rodean a una fibra óptica multimodo de  $200\ \mu\text{m}$  de diámetro con una apertura numérica de 0.39. El poder del láser de la fibra óptica se mide con un medidor de potencia (Thorlabs). Se calibra a 15 mV para alcanzar una irradiancia de  $119\ \text{mW}/\text{mm}^2$  en la punta de la fibra óptica.

## **Cirugías Estereotáxicas**

Para preparar a los animales para los experimentos, a cada sujeto se le realizaron dos procedimientos quirúrgicos por separado. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano en mezcla con 1 mL/s de oxígeno (inducción 3-5%, mantenimiento 1-2%). La cabeza del sujeto fue afeitada y montada en un estereotáxico. Se colocó ungüento oftálmico antibiótico-antiinflamatorio (Trióptico compuesto, Grin lab) sobre ambos ojos para mantener la lubricación ocular. Se administró 0.01 mL de lidocaína (2%) subcutánea en la zona de incisión como esterilizante y analgésico. Se realizó una incisión de aproximadamente 1 cm., se limpió el cráneo con peróxido de hidrógeno y se removió el periostio. Se localizó Bregma y Lambda para nivelar el cráneo en el plano anteroposterior, así mismo se niveló el plano medialateral localizando la coordenada  $\pm 1.5\ \text{mm}$  a partir de Bregma. Se microinyectó unilateralmente  $0.3\ \mu\text{L}$  del constructo viral en LHA bajo las siguientes coordenadas:  $-1.3\ \text{mm}$  anteroposterior (AP),  $\pm 1.0\ \text{mm}$  mediolateral (ML) y  $-5.3\ \text{mm}$  dorsoventral (DV) a la superficie del cráneo. Se suturó la incisión y se permitió que el sujeto se recuperara. Tres semanas después, se implantó unilateralmente un optrodo (arreglo de electrodos y fibroptica) en el mismo sitio de la microinyección previa. Se realizó una craneotomía con ayuda de un taladro dental (Series SR FOREDOM, M. SR-SCT) se aplicó constantemente solución salina fisiológica (0.9%), cuidadosamente se removió la dura con ayuda de una aguja de 30-gauge doblada en un ángulo de  $90^\circ$ , se retiró cualquier otro residuo alrededor del trepano con el propósito de generar un punto de entrada limpio para el optrodo. El optrodo, fue sujetado a un brazo estereotáxico, se introdujo lentamente en el tejido y fue retraído  $+500\ \mu\text{m}$  por cada  $-1\ \text{mm}$  de incremento ventral que penetra al tejido, para permitir el acomodo apropiado del optrodo. Estos pasos fueron repetidos hasta que el optrodo fue situado en LHA ( $-5.50\ \text{mm}$  de la superficie del cráneo). Posteriormente, el

arreglo fue fijado al cráneo con pegamento fotocurable (Futurabond M+, VOCO) y fue reforzado con acrílico dental para proteger al optrodo de cualquier daño externo. Se permitió la recuperación de los sujetos durante una semana, durante la cual se administró enrofloxacin (5mg/Kg, Baytril) intraperitoneal, como antibiótico de amplio espectro y ketoprofeno (5mg/Kg, Ketofen 1%) intraperitoneal, como analgésico y antiinflamatorio, 3 días siguientes a la cirugía.

### **Soluciones de prueba.**

Cada solución de prueba consistió en agua desionizada y sacarosa grado reactivo (S0389-5KG, Lot # SLBW6518, Sigma-Aldrich). Se prepararon soluciones de sacarosa en concentraciones separadas semi-logáritmicamente; 0, 1.5, 3, 10, 18 y 32 % peso/volumen (0, 0.0438, 0.0876, 0.2921, 0.5258, 0.9348 M respectivamente). Todas las soluciones fueron preparadas semanalmente, almacenadas a 4°C y utilizadas, en cada sesión, a temperatura ambiente.

### **Caja operante para pruebas conductuales.**

Se utilizó una caja operante de Med Associates, MED-307A-D1 de 20 x 17 x 12 cm. La cual contenía un puerto central equipado con un bebedero, compuesto por 5 agujas independientes que dispensan cada una de las soluciones de prueba (0, 1.5, 3, 10, 18 y 32 % de sacarosa). Cada aguja estuvo conectada a una válvula solenoide que se mantuvo a una presión constante, con el propósito de asegurar la entrega de aproximadamente 2  $\mu$ L de la solución de prueba. Adicionalmente, la caja tenía un medidor de lengüeteos por contacto (ENV-250, Med Associates) y un generador de sonido (ENV-325SM, Med Associates).

### **Protocolo conductual.**

Posteriormente al periodo de recuperación de la cirugía de microinyección del constructo viral, los ratones se privaron de agua 12 horas antes de las sesiones conductuales, es decir, se retiraron los contenedores de agua de sus casas hogar.



Entrenamiento: los sujetos ingenuos se colocaron en la caja operante durante 20 min para una sesión de la tarea conductual, Ensayo de acceso breve a un sabor. Al finalizar, los sujetos fueron devueltos a sus respectivas cajas hogar.

Ensayo de Acceso Breve a un Sabor (*Brief-access Taste Test*, BATT): un ensayo consiste en un periodo de recompensa de 4 s, denotado por un tono de 16 KHz, de la misma duración. Un ensayo da inicio cuando el sujeto lengüetea el bebedero en el puerto central, cada lengüeteo es recompensado con 2  $\mu$ L de una solución de sacarosa distinta (0, 1.5, 3, 10, 18 y 32 % peso/volumen) en cada ensayo. Para comenzar un nuevo ensayo el sujeto debe abstenerse de lengüeteo el bebedero vacío por un periodo aleatorio de 1-3 s. Se registró el número de lengüeteos para cada ensayo. El promedio de lengüeteos por segundo (tasa de lengüeteos) y el tamaño de la ráfaga (ráfagas de lengüeteos rítmicos separados por una pausa  $\geq 0.5$  s) se utilizaron como descriptores de la palatabilidad inducida por la sacarosa.

Fotoidentificación: parámetros de fotoestimulación, comprende 100 ciclos de 2 s de fotoestimulación, pulsos (10 ms) de luz azul (473 nm) a una frecuencia de 50 Hz, seguidos de 4 s en ausencia de fotoestimulación.

Sesiones de registro electrofisiológico: consistieron en 10 sesiones, compuestas por 20 min del Ensayo de acceso breve a un sabor y 10 min de fotoidentificación, mientras se monitoreaba la actividad eléctrica unitaria extracelular de las neuronas (**Ver Fig. 6**).

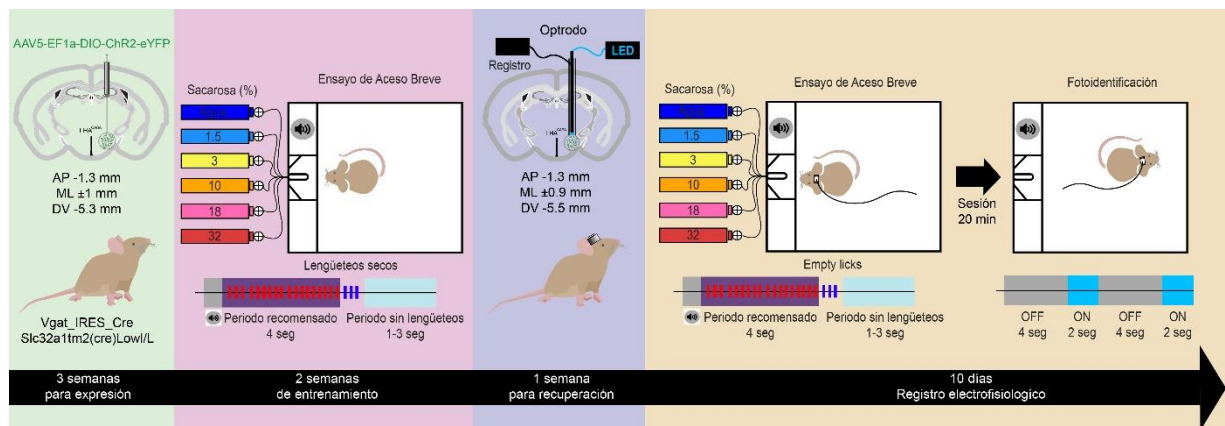


Figure 6. Metodología en diagrama temporal para las sesiones de registro electrofisiológico.

### **Adquisición de datos.**

Registros Electrofisiológicos. La actividad neuronal se registró utilizando el Procesador de Adquisición Multicanal (Plexon, Dallas, TX). Específicamente; se muestrearon el voltaje extracelular a 40 KHz y fueron digitalizados con una resolución de 12 *bits*. Las señales unitarias se extrajeron de la señal general, utilizando un filtro pasabandas con un corte bajo de 154 Hz y alto de 8.8 KHz. Los potenciales de acción fueron aislados utilizando ventanas con un umbral en voltaje-tiempo y el análisis de componentes principales para 3 elementos de acuerdo con el algoritmo de plantilla (*Template*). Sólo las neuronas con potenciales de acción con una razón señal/ruido >3:1 reconocidas por Offline Sorter™ (OFS) (Gutiérrez et al. 2010), fueron incluidas en el análisis.

### **Histología.**

Para verificar la localización del optrodo, finalizadas las sesiones de registro electrofisiológico los sujetos recibieron una inyección intraperitoneal de pentobarbital y se perfundieron intracardialmente con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y con una solución al 4% de paraformaldehído (PFA) en PBS. Los cerebros son incubados en PFA a 4 °C por 24 hrs. Posteriormente son transferidos a una solución al 30% de sacarosa con 0.2% azida de sodio por 72 hrs a 4 °C. Se obtuvieron rebanadas coronales de 40 µm con ayuda de un criostato (Leica CM1850).

Las rebanadas obtenidas se llevaron a una tinción inmunohistoquímica contra GA67. Los cortes se permeabilizaron con una solución PBS-Tritón al 0.2% y se bloquearon con una solución de PBS con suero de Albumina bovina al 5% (PBS 1x con 5% BSA, Bovine Serum Albumin, Jackson Immuno Research, 001-000-162). Se incubaron con el anticuerpo primario contra GAD67 [1:500] (GAD-67 Antibody (A-4), Santa Cruz Biotechnology, sc-390383) por 12 hrs a 4 °C. Fueron lavados con solución de PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor™ 647 [1:250] (Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Invitrogen, A21235) por 2 hrs a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente y se incubaron con DAPI [1:1000] por 30 min. Finalmente, las rebanadas se observaron en un microscopio confocal (Leica TCS SP8 MP) utilizando los objetivos 20X y 40X.

## **Análisis Estadístico.**

Los datos se representaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticas entre grupos se cuantificaron mediante un Análisis de Varianza de repetidas medidas (ANOVA-RM) con un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

Neuronas relacionadas con la Palatabilidad.

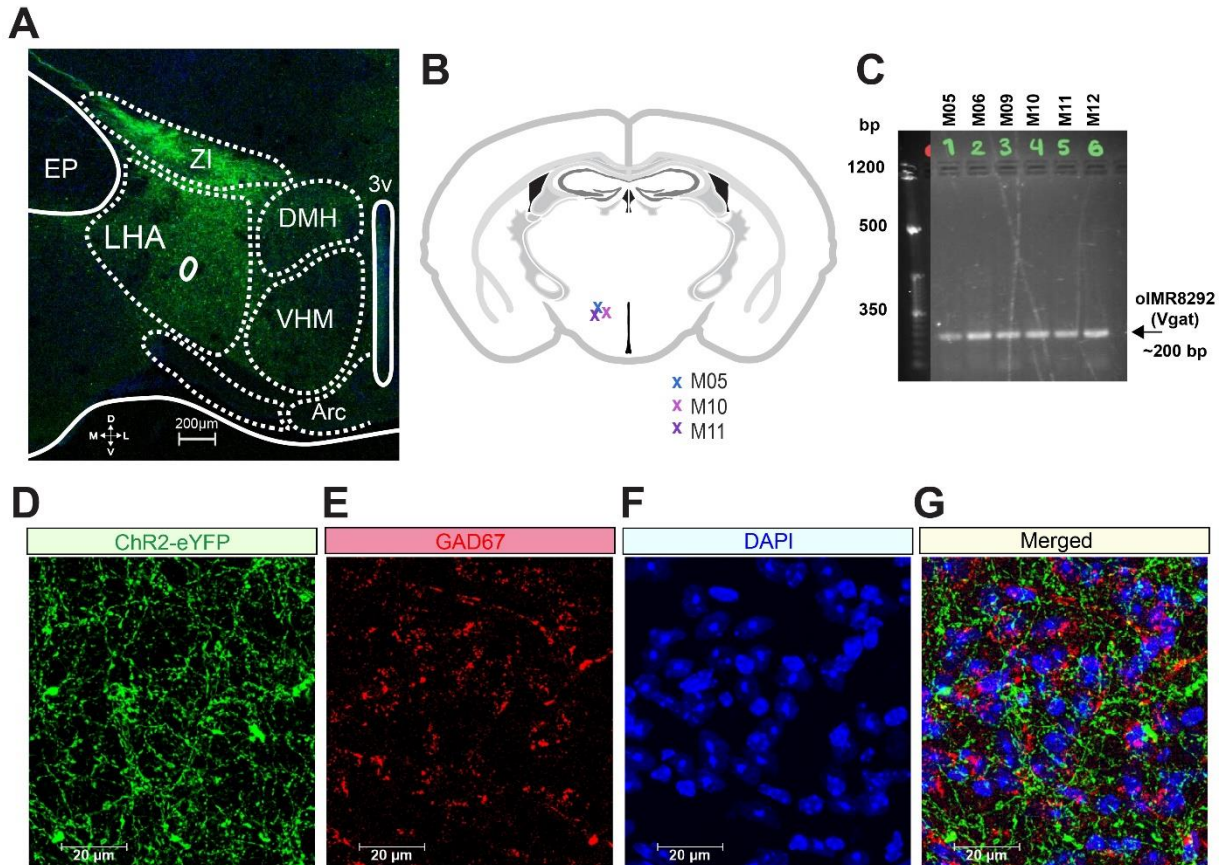
Para identificar cuales neuronas contienen información acerca de la palatabilidad de la sacarosa, se desarrolló un análisis que detecta una ventana temporal con la correlación máxima (coeficiente de correlacion de Pearson,  $r$ ) entre la actividad neuronal y el índice de palatabilidad. El índice de palatabilidad refleja las respuestas oromotoras producidas por cada una de las concentraciones de sacarosa. Se calcula como el promedio del número de lengüeteos por segundo (tasa de lengüeteos) durante el periodo de recompensa, 4 s, para todos los ensayos, incluyendo completos e incompletos. Se calcula la tasa de disparo neuronal en múltiples tamaños de ventana (de 0.5 a 4 s en pasos de 0.5 s), se identifico la ventana donde el promedio de la tasa de disparo fuera significativamente diferente (Kruskal-Wallis,  $\alpha = 0.05$ ). Para cada uno de los tipos de ensayos, se calculo la correlación de Pearson entre el índice de palatabilidad y la tasa de disparo.

El procesamiento de datos y el análisis estadístico se realizó en MATLAB R2015a.

## **RESULTADOS**

Para explorar si las neuronas GABAérgicas del Área Hipotalámica Lateral (LHA) codifican la palatabilidad de la sacarosa, primero se indujo la expresión del canal de rodopsina tipo 2 conjugada con la proteína amarillo fluorescente (ChR2-eYFP, **Fig. 7A**) a través de la infección con el adenovirus AAV5-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP, específicamente en las neuronas GABAérgicas del ratón *Vgat\_IRES-Cre* ([Vong et al., 2011, Fig. 7C](#)) bajo las coordenadas estereotáxicas dirigidas hacia el LHA. Se implantó un optrodo bajo estas mismas coordenadas (**Fig. 6B**) para el registro electrofisiológico

y la posterior fotoidentificación de las neuronas GABAérgicas. Se confirmó la identidad GABAérgica de las neuronas portadoras del canal de rodopsina tipo 2, por inmunofluorescencia contra GAD67 (Decarboxilasa de glutamato) enzima que cataliza la conversión de Glutamato a Ácido  $\gamma$  aminobutírico, GABA (**Fig. 7A**).



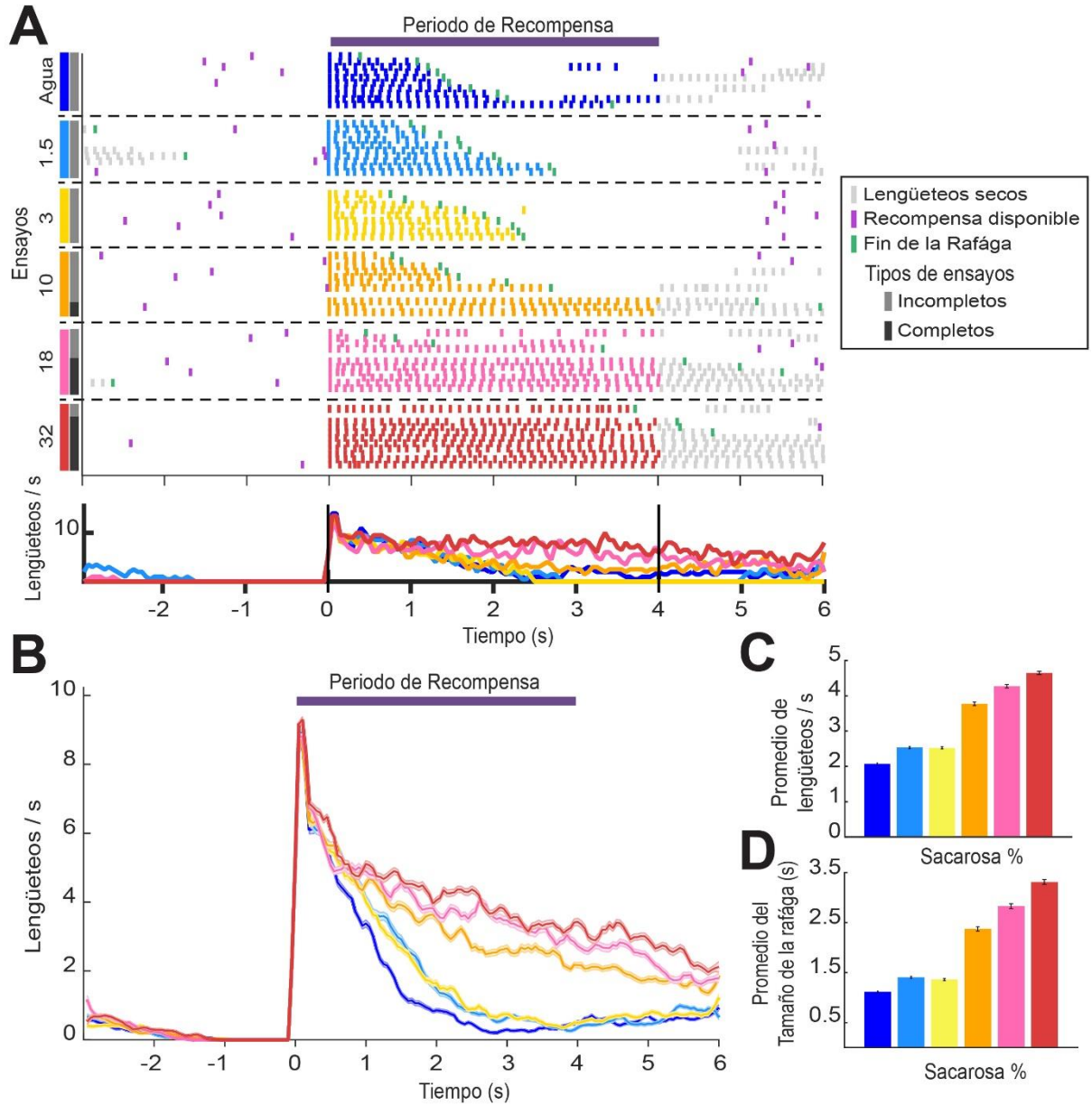
**Figure 7. Caracterización de las neuronas GABAérgicas en LHA por Inmunofluorescencia.** **A)** Micrografía confocal 10x representando la expresión de ChR2-eYFP en neuronas LHAGABA. ZI, Zona Incerta, DMH, Núcleo Hipotalámico Dorsomedial, LHA, Área Hipotalámica Lateral, VHM, Núcleo Hipotalámico Ventromedial, Arc, Núcleo Arcuato, 3v, Tercer ventrículo. **B)** Zona de implantación del optrodo (n = 3 animales). **C)** Genotipificación de Slc32a1 por reacción de PCR, Mutante (10582) = 250 bp. **D-G)** Micrografías confocales 63x representativas (n = 3 animales), demostrando la expresión de ChR2-eYFP en verde, GAD67-Alexa647 en rojo, azul para DAPI. El último panel muestra la colocalización. Barra de escala 20 µm

### Resultados conductuales.

Se caracterizó la palatabilidad de la sacarosa a través del ensayo de acceso breve (*Brief Access Taste Test*, BATT, por sus siglas en inglés). En una gráfica representativa tipo *ráster* (**Fig. 8A**) se muestran los diferentes tipos de ensayos. Las

distintas concentraciones de sacarosa están representadas por líneas verticales, donde cada línea vertical representa un lengüeteo recompensado con sacarosa 0% o agua en azul, sacarosa 1.5% en cian, 3% en amarillo, 10% en naranja, 18% en rosa y 32% en rojo. Adicionalmente, las líneas verticales en color gris representan los lengüeteos no recompensados o lengüeteos secos (no se libera ningún sabor). Las líneas verticales morada y verde, representan la disponibilidad de las soluciones de prueba y el fin de la ráfaga de lengüeteos, respectivamente. Los ensayos fueron clasificados como Completos cuando los sujetos lengüetean continuamente en una única ráfaga, y como Incompletos cuando pausan el lengüeteo por  $\geq 0.5$  s durante el periodo de recompensa. En la parte inferior se muestran los PSTHs (*Peristimulus Time Histograms*) de todos los lengüeteos para cada una de las concentraciones de sacarosa, alineados al inicio del periodo de recompensa (Tiempo = 0 s). En este ejemplo, se observa un inferior número de lengüeteos para los ensayos donde se presentaron las soluciones de sacarosa menos concentradas (Ver **Fig. 8A**, líneas en azul, cian y amarillo), mientras que, los ensayos correspondientes a la entrega de soluciones de sacarosa más concentradas, se observa un mayor número de lengüeteos (Ver **Fig. 8A**, líneas en naranja, rosa y rojo).

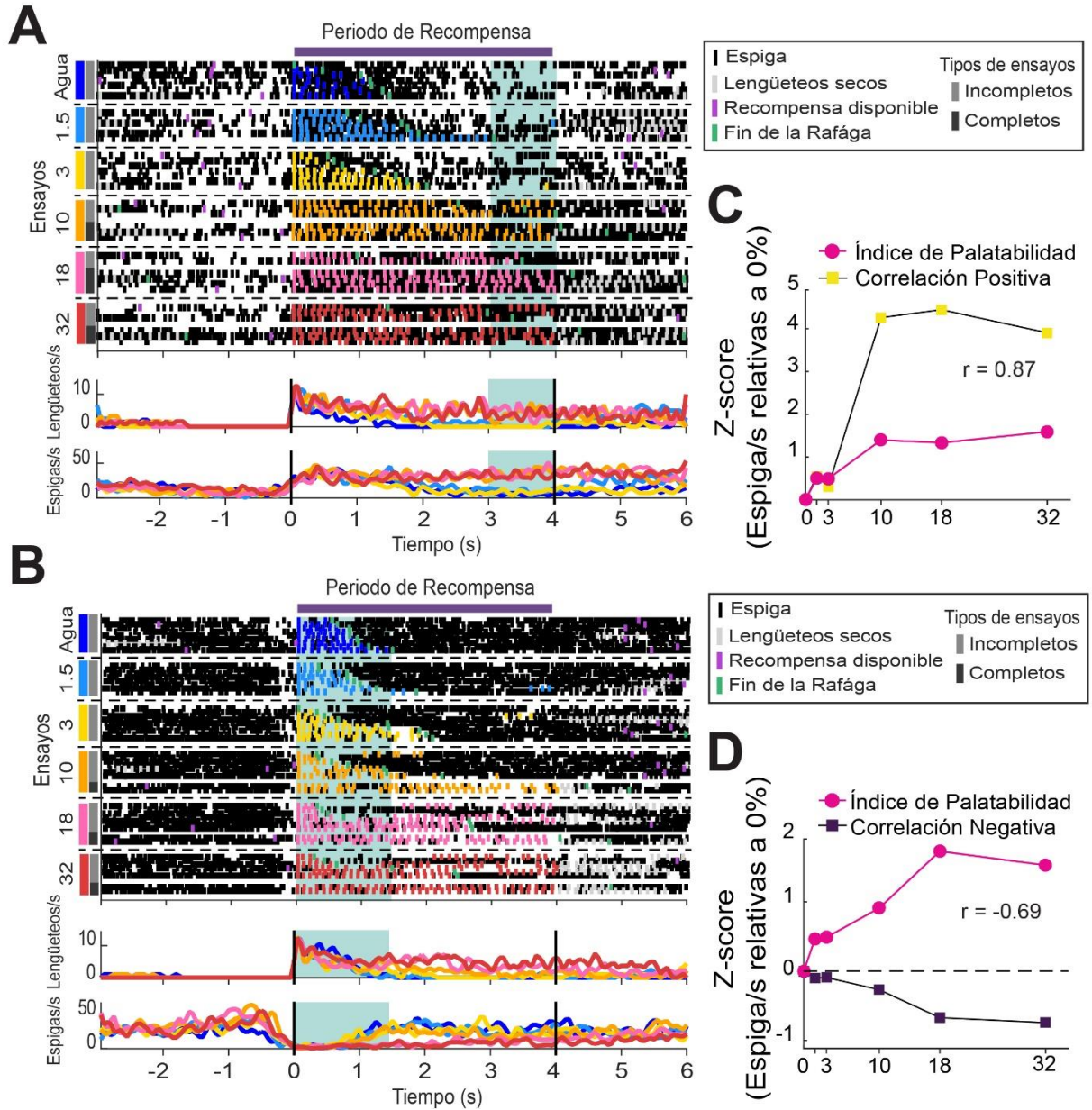
Con el análisis de la microestructura del lengüeteo, agrupando todas las sesiones y todos los sujetos, se puede observar una mayor tasa de lengüeteos y un tamaño de ráfaga mayor para las concentraciones altas de sacarosa (**Fig. 8C y 8D**,  $3.77 \pm 0.05$  y  $2.4 \pm 0.04$  para 10% de sacarosa,  $4.27 \pm 0.05$  y  $2.82 \pm 0.05$  para 18% de sacarosa y  $4.64 \pm 0.04$  y  $3.31 \pm 0.05$  para 32% de sacarosa, respectivamente) lo cual refleja su palatabilidad. Se observan que la tasa de lengüeteos incrementa en función de la concentración de sacarosa (**Fig. 8B**) y esta variable conductual será utilizada como indicador de la palatabilidad de la sacarosa para construir el índice de palatabilidad. El índice de palatabilidad es el promedio de lengüeteos durante el periodo de recompensa para cada una de las concentraciones probadas, de tal forma que este índice refleja el patrón general de lengüeteo con el cual el animal respondió ante todas las concentraciones de sacarosa.



**Figure 8. Prueba de acceso breve (*Brief Access Taste Test*, BATT) como prueba conductual para determinar la palatabilidad de la sacarosa.** **A)** Panel superior, una gráfica tipo ráster representativa para los lengüeteos en una sesión de BATT, dividido en ensayos completos (los sujetos lengüeteo continuamente en una única ráfaga) y ensayos incompletos (los sujetos pausan el lengüeteo por más de 0.5 s). Azul, corresponde a los ensayos de 0% sacarosa (agua), cian, 1.5%, amarillo, 3%, naranja, 10%, rosa, 18% y rojo para 32% sacarosa. Panel inferior, PSTH de la tasa de lengüeteos para cada una de las concentraciones de sacarosa probadas. **B)** PSTH promedio  $\pm$ SEM para la tasa de lengüeteos en función de la concentración de sacarosa, de todas las sesiones de BATT. **C)** Promedio  $\pm$ SEM de lengüeteos por segundo (tasa de lengüeteos).  $2.07 \pm 0.03$  para 0% de sacarosa,  $2.53 \pm 0.03$  para 1.5% de sacarosa,  $2.52 \pm 0.03$  para 3% de sacarosa,  $3.77 \pm 0.05$  para 10% de sacarosa,  $4.27 \pm 0.05$  para 18% de sacarosa y  $4.64 \pm 0.04$  para 32% de sacarosa. El incremento en la tasa de lengüeteos es dependiente de la concentración de sacarosa. **D)** Promedio  $\pm$ SEM del tamaño de la ráfaga (ráfagas de lengüeteos rítmicos separados por una pausa  $\geq 0.5$  s). Mayor tamaño de la ráfaga a mayor concentración de sacarosa. Esto es  $1.11 \text{ s} \pm 0.01$ ,  $1.4 \text{ s} \pm 0.02$ ,  $1.36 \text{ s} \pm 0.02$ ,  $2.4 \text{ s} \pm 0.04$ ,  $2.82 \text{ s} \pm 0.05$  y  $3.31 \text{ s} \pm 0.05$  para 0, 1.5, 3, 10, 18 y 32% de sacarosa, respectivamente.

## **Una población de neuronas en el LHA codifica la palatabilidad inducida por la sacarosa.**

Para identificar cuáles neuronas contienen (codifican) información acerca de la palatabilidad de la sacarosa, se realizó un análisis que detecta una ventana de tiempo con la máxima correlación de Pearson ( $r$ ) entre la respuesta neuronal y el índice de palatabilidad (**Fig. 9, Ver Metodología**). En la **Figura 9** se presentan respuestas neuronales ejemplo para ambos tipos de poblaciones identificadas. En el panel superior se despliega una gráfica tipo ráster donde cada línea vertical representa un lengüeteo recompensado con sacarosa 0% o agua en azul, 1.5% en cian, 3% en amarillo, 10% en naranja, 18% en rosa y 32% de sacarosa en rojo, como se describió anteriormente. Adicionalmente cada línea vertical de color negro representa la ocurrencia de un potencial de acción, es decir una espiga. En el panel central, se muestra un PSTH para la tasa de lengüeteos (Índice de Palatabilidad) y el panel inferior se muestra, de igual forma, un PSTH para la respuesta neuronal. Con un recuadro verde se detona la ventana temporal, donde se detectó la máxima correlación ( $r$  de Pearson) entre la respuesta neuronal y el índice de palatabilidad. En la **Figura 9A** y **9C** se muestra un ejemplo representativo de la población que incrementa su tasa de disparo al incrementarse las concentraciones de sacarosa, (correlación positiva,  $r = 0.87$ ). En la **Figura 9B** y **9D** se muestra otro ejemplo representativo de la población que decrece su actividad al incrementarse las concentraciones de sacarosa (correlación negativa,  $r = -0.69$ ).



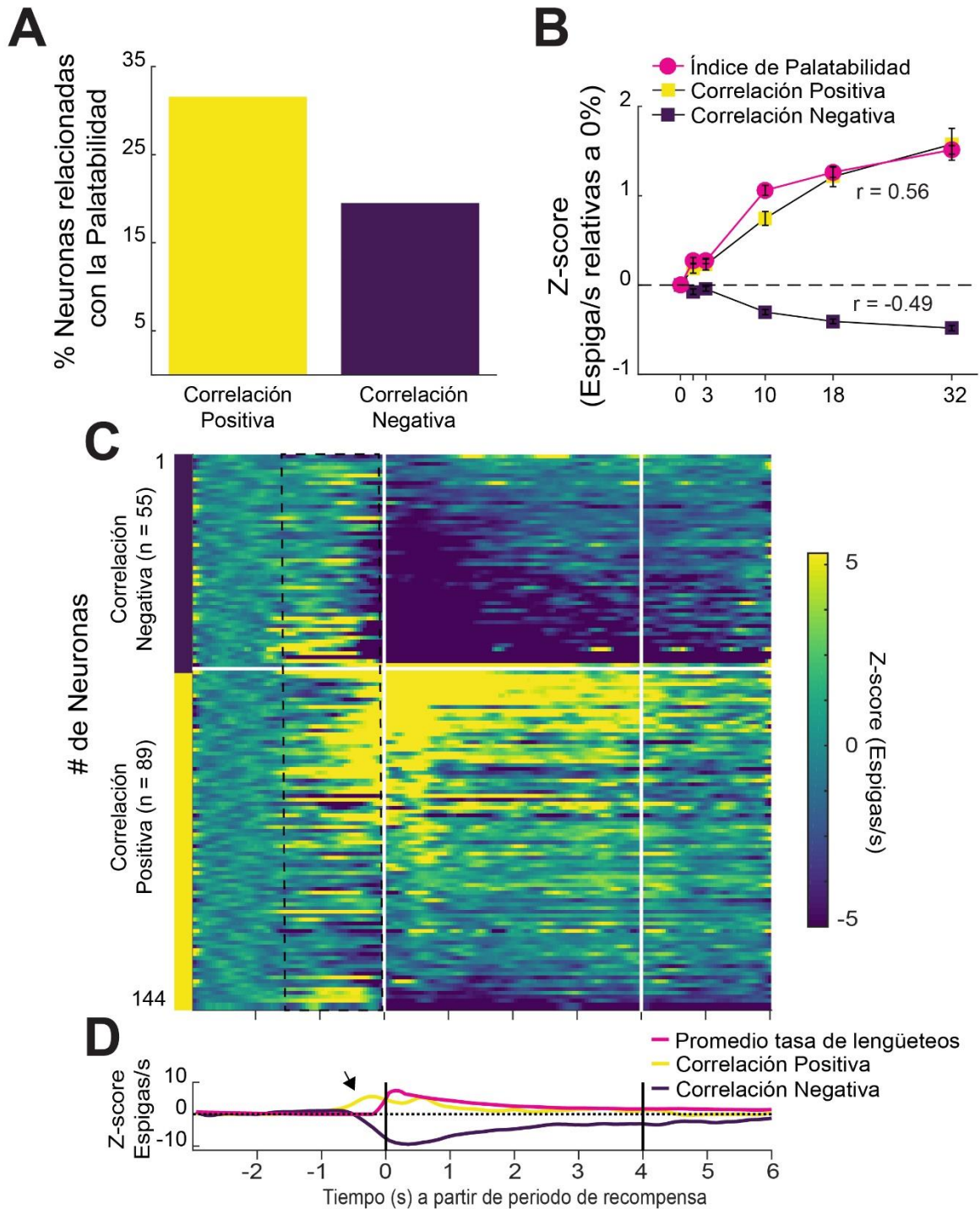
**Figure 9. Neuronas relacionadas con la palatabilidad registradas en LHA.** Grafica tipo ráster y PSTH representativos para neuronas que correlacionan de manera (A) positiva y (B) negativa con la palatabilidad de la sacarosa. Correlación de Pearson positiva (C) o negativa (D), entre la actividad neuronal normalizada (relativa a la actividad en los ensayos de agua) y el índice de palatabilidad (promedio de la tasa de lengüeteos durante el periodo de recompensa).

De manera poblacional, incluyendo a toda la población neuronal registrada ( $n = 282$ ), se identificó al 32% (Fig. 10A,  $n = 82$ , en amarillo) con una fuerte correlación positiva (Fig. 10B,  $r = 0.56$ ) y un 20% (Fig. 9A,  $n = 55$ , en morado) con una moderada



correlación negativa (**Fig. 10B**,  $r = -0.49$ ) entre la respuesta neuronal y el índice de palatabilidad.

En la **Figura 10C** se muestra en un mapa de calor (heat-map) el curso temporal de la respuesta neuronal promedio de las neuronas relacionadas con la palatabilidad. En el panel superior se muestra a la población con una correlación negativa (es decir, la que decrementa su actividad al incrementarse las concentraciones de sacarosa) y en el panel inferior, a la población con correlación positiva (incrementa su actividad al incrementarse las concentraciones de sacarosa). Cada fila representa la respuesta neuronal normalizada para las distintas concentraciones de sacarosa alineada al periodo de recompensa (Tiempo = 0 s). Para futuras referencias, a ambos tipos de poblaciones se les denominara, de forma general, como la población relacionada con la palatabilidad. En la **Figura 10D**, el PSTH de la actividad promedio normalizada (Z-score espigas/s) para el índice de palatabilidad y ambos tipos de respuesta neuronal, revela la anticipación de la modulación neuronal 500-750 ms previos al periodo de recompensa (ver **Fig. 10C**; -1.5 a 0 s). Cabe mencionar, que este tipo de modulación previa podría hacer referencia a la expectativa que tiene el sujeto por ser recompensado, es decir, podría corresponder a una conducta apetitiva. En esta conducta apetitiva se ha descrito la participación de las neuronas GABAérgicas (Jennings et al. 2015), sin embargo, este hallazgo no fue analizado al detalle en este trabajo.

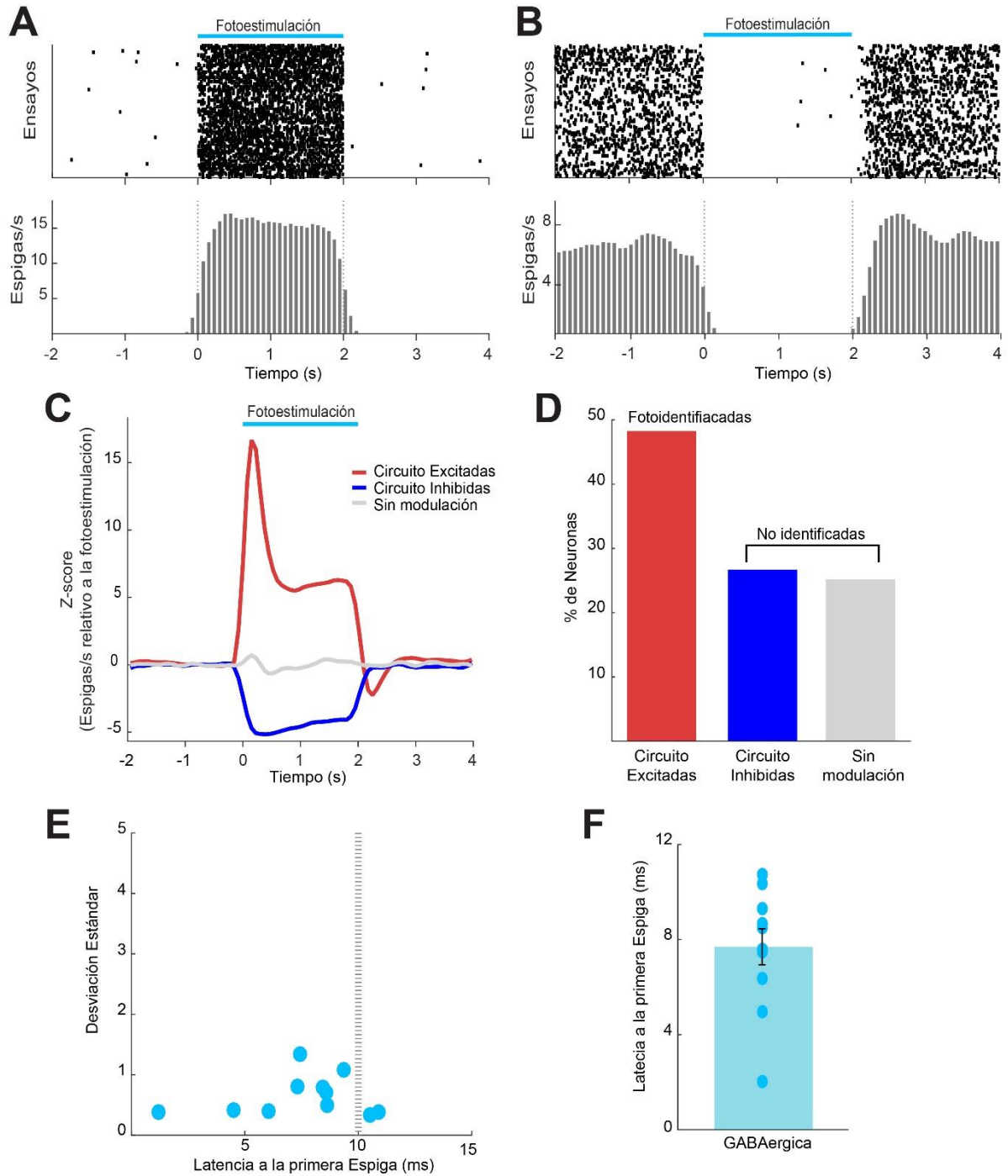


**Figure 10. Neuronas en Hipotálamo Lateral monitorean la palatabilidad de la sacarosa.** **A)** Histograma del porcentaje de neuronas registradas que correlacionan de forma: positiva ( $r = 0.56$ , amarillo) o negativa ( $r = -0.49$ , morado) con el índice de palatabilidad. **B)** Promedio  $\pm$ SEM de la actividad neuronal normalizada con correlación positiva (amarillo) o negativa (morado) con el índice de palatabilidad (rojo). **C)** Mapa de calor representando el curso temporal de la respuesta neuronal de cada una de las neuronas que correlacionan de forma negativa (panel superior en morado) o de forma positiva (panel inferior en amarillo) con el índice de palatabilidad. Cada fila representa el promedio de las respuestas evocadas por cada neurona, frente a las diferentes concentraciones de sacarosa durante BATT. **D)** PSTH promedio de la respuesta neuronal para las neuronas que correlacionan de forma positiva (amarillo) o de forma negativa (morado) con el índice de palatabilidad (rosa).

## Identificación optogenética de neuronas GABAérgicas en el LHA.

El adenovirus utilizado restringe la expresión del canal de rodopsina tipo 2 a las neuronas GABAérgicas en el ratón Vgat-IRES-Cre. Para la fotoidentificación de estas neuronas, posteriormente a la sesión de BATT, los sujetos fueron fotoestimulados con luz azul,  $\lambda = 473$  nm, en pulsos de 10 ms, con una frecuencia de 50 Hz por 2 s seguidos de 4 s en ausencia de fotoestimulación (**Ver Metodología, Fig. 6**). En la **Figura 11A y 11B** se muestran ejemplos representativos de las respuestas neuronales observadas durante la fotoestimulación, activación e inhibición respectivamente. En el panel superior se despliega una gráfica tipo ráster, donde cada línea vertical de color negro representa la ocurrencia de un potencial de acción, es decir una espiga. En el panel inferior se muestra un PSTH correspondiente a la actividad neuronal alineado al inicio de los 2 s de fotoestimulación.

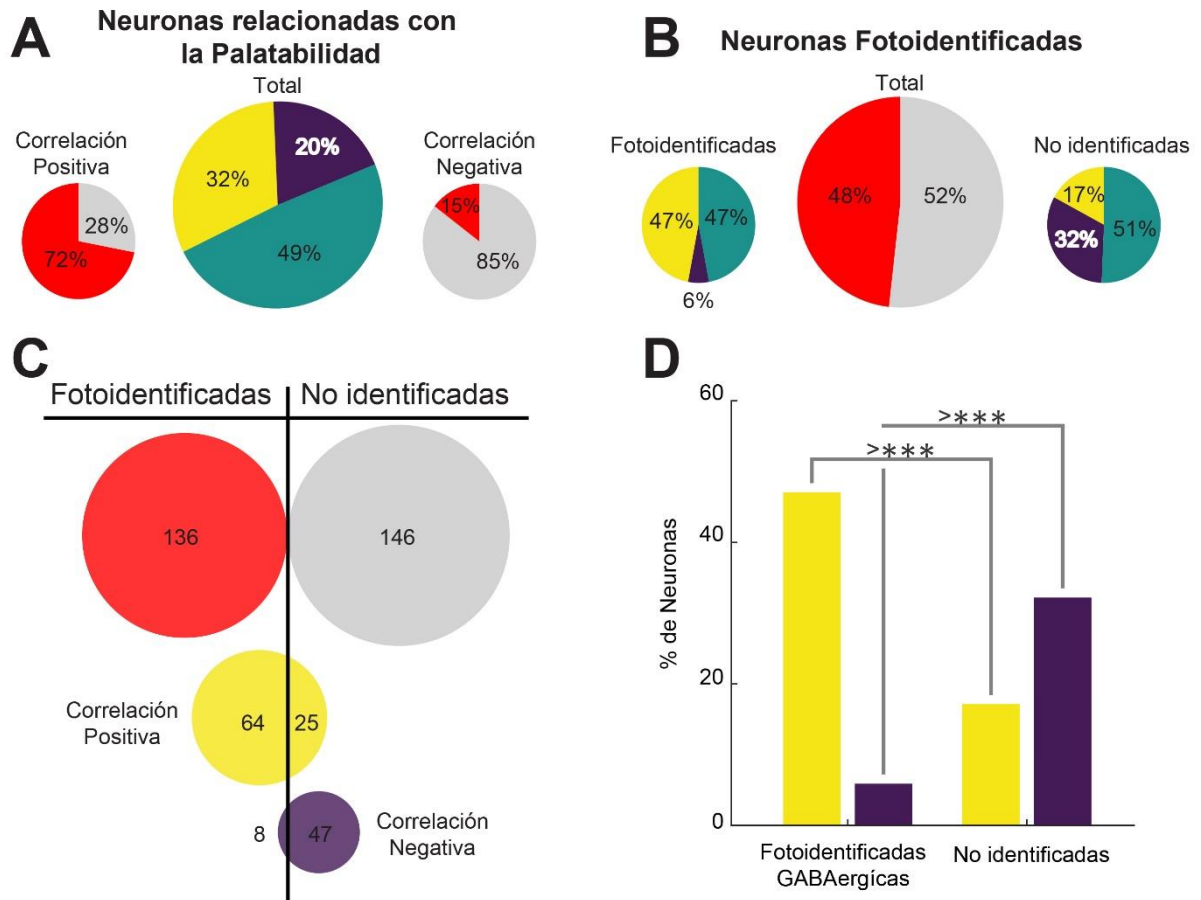
De manera poblacional, incluyendo a toda la población registrada ( $n = 282$ ), el 48% ( $n = 136$ , **Fig. 11C y 11D**, en rojo) se clasificaron como fotoidentificadas neuronas LHA<sup>GABA</sup>, ya que estas neuronas desplegaron respuestas neuronales evocadas por la fotoestimulación, es decir presentaron potenciales de acción o espigas cada vez que se fotoestimulo (Ejemplo representativo **Fig. 11A**). Con respecto a los otros tipos de respuestas neuronales observados durante la fotoestimulación, se clasificaron como no identificadas a todas aquellas respuestas tanto inhibitorias como sin modulación, que fueron evocadas por la fotoestimulación, es decir se agrupó la población con respuesta inhibitoria (25%,  $n = 50$ , **Fig. 11C y 11D**, en azul marino) y la población que no presentó modulación alguna (20%,  $n = 30$ , **Fig. 11C y 11D**, en gris) durante la fotoestimulación. Es bien conocido que sólo las neuronas GABAérgicas que expresan el ChR2 presentarán potenciales de acción con una pequeña latencia al recibir un pulso de luz azul. Se utilizó la prueba de latencia a la primera espiga asociada al estímulo (*Stimulus-associated spike latency test*, SALT, **Fig. 11E y 11F**, latencia promedio de  $7.7 \pm 0.75$  ms) y se confirmaron 11 unidades fotoidentificadas, ya que mostraron respuestas directamente evocadas por la luz, a estas unidades se les clasifico como neuronas GABAérgicas.



**Figure 11. Identificación optogenética de las neuronas GABAérgicas en LHA.** Gráfica tipo ráster y PSTH representativos de una neurona activada (A) por la fotoestimulación y otra neurona inhibida (B), registradas por el optrodo. Ambos alineados al inicio de la fotoestimulación. C) Actividad neuronal normalizada (Z-score) durante la fotoestimulación. D) Histograma del porcentaje de neuronas fotoidentificadas y neuronas no identificadas, que corresponden a neuronas con tasa de disparo mayor (rojo), menor (azul) o sin cambio (gris) durante la fotoestimulación. D) Dispersión obtenida por la prueba de latencia a la primera espiga asociada a un estímulo (SALT, por si siglas en inglés), para la identificación de neuronas directamente activadas por la fotoestimulación (n = 282 neuronas analizadas, fotoidentificadas n = 11). E) Latencia promedio para neuronas optogenéticamente identificadas como GABAérgicas (latencia promedio =  $7.7 \pm 0.75$  ms).

**Las neuronas LHA<sup>GABA</sup> incrementan su tasa de disparo para monitorear la palatabilidad inducida por la sacarosa.**

Al integrar a la población que codifica la palatabilidad inducida por la sacarosa que presenta correlación positiva o negativa (Ver **Fig. 10A** y **10B**) y compararla con la población fotoidentificada (Ver **Fig. 11C** y **11D**), se observó que la población fotoidentificada como GABAérgica (48%, n = 136, **Fig. 12A, 12B y 12C**, en rojo) presentó una proporción significativamente mayor de neuronas que incrementan su tasa de disparo al incrementarse la concentración de sacarosa (Correlación Positiva 47%, n = 64, en amarillo, Correlación Negativa 6%, n = 8, en morado, **Fig. 12D**  $\chi^2(1, N = 282) = 15.30, p = 0.000093$ ). Mientras que la población no fotoidentificada (52%, n = 146, **Fig. 12A, 12B y 12C**, en gris) presenta una proporción significativamente mayor de neuronas que decremantan su tasa de disparo al incrementarse la concentración de sacarosa (Correlación Negativa 32%, n = 47, en morado, Correlación Positiva 17%, n = 25, en amarillo, **Fig. 12D**  $\chi^2(1, N = 282) = 21.33, p = 0.0000038$ ).



**Figure 12. Las neuronas LHA<sup>GABA</sup> incrementan su tasa de disparo para monitorear la palatabilidad a la sacarosa.** **A)** Diagrama circular que representa la proporción de neuronas relacionadas con la palatabilidad que fueron fotoidentificadas como GABAérgicas (rojo) y la fracción no identificada (gris). **B)** Diagrama circular que representa la proporción de neuronas fotoidentificadas que contienen información de la palatabilidad a la sacarosa. **C)** Diagrama de burbuja que muestra las proporciones netas para las poblaciones neuronales relacionadas con la palatabilidad de la sacarosa. Nótese que de las neuronas fotoidentificadas como GABAérgicas ( $n = 64$ , 47%) incrementan su tasa de disparo en función de la concentración de sacarosa (amarillo) mientras que las no fotoidentificadas ( $n = 47$ , 32%) decrementan su tasa de disparo en función de la concentración de sacarosa (morado) **D)** Histograma del porcentaje de neuronas relacionadas con la palatabilidad para la población fotoidentificada contra la no fotoidentificada. Las neuronas fotoidentificadas como GABAérgicas presentan una proporción significativamente mayor de neuronas que correlacionan de forma positiva con la palatabilidad  $\chi^2(1, N = 282) = 15.30, p = 0.000093$ , mientras que las neuronas no identificadas presentan una proporción significativamente mayor de neuronas que correlacionan de forma negativa con la palatabilidad  $\chi^2(1, N = 282) = 21.33, p = 0.0000038$ .

## DISCUSIÓN

La palatabilidad de la sacarosa es una de las principales razones por la que es consumida en exceso y además contribuye a la creciente incidencia en obesidad (Malik et al., 2010; Sánchez-Pimienta et al., 2016). La propiedad de palatabilidad es determinada por las preferencias del sujeto y su reacción al estímulo (Breslin et al., 1992), esta menos relacionado a alguna propiedad física del estímulo o a un parámetro fisiológico en particular, ya que los sujetos nacen con sus gustos particulares (Chandrashekar et al., 2006). La palatabilidad de un sabor es afectada por factores extrínsecos al sujeto, como la saciedad (Berridge, 1991) y su experiencia (Galef, 1986; Spector et al., 1988; Fortis-Santiago et al., 2010). Una vez que la rata recibe una gota de una solución de prueba, producen una ráfaga de lengüeteos no específica, la cual puede convertirse en movimientos ingestivos (movimiento lateral de la lengua) o movimientos egestivos (como intentando expulsar el sabor aversivo), estas respuestas dependen de la palatabilidad (valor hedónico) de la solución de prueba (Pfaffmann et al., 1977).

El objetivo de este trabajo fue determinar si las neuronas GABAérgicas del Área Hipotalámica Lateral (LHA) podían monitorear la palatabilidad de la sacarosa de forma fisiológica. Aquí se reporta la actividad unitaria en LHA en sujetos de la cepa Vgat-IRES-Cre (Vong et al., 2011) en libre movimiento mientras realizaban la prueba de acceso breve a un sabor (Brief Access Taste Test, BATT), donde se les presentaron 6 soluciones de concentración creciente de sacarosa (0%, 1.5%, 3%, 10%, 18% y 32%). BATT captura las variaciones finas en la palatabilidad de las soluciones de prueba, al determinar la tasa de lengüeteos, el número de ráfagas de lengüeteos y el tamaño de la ráfaga (Grill et al., 1978; Davis et al., 1992, 1993; Spector et al., 1998; Johnson et al., 2010). Se puede argumentar que las respuestas observadas aquí (Ver **Figura 8**), reflejan la palatabilidad oromotora inducida por la sacarosa.

La información sobre la palatabilidad en el LHA emerge rápidamente entre 250 y 500 ms (Li et al., 2013), la cual sucede en paralelo con la detección y discriminación del sabor (Perez et al., 2013; Wallroth et al., 2018) lo que facilita su identificación. En total (Ver **Figura 10**), cerca del 52% de las respuestas neuronales registradas resultaron

responsivas a la palatabilidad de la sacarosa, 32% incrementando su tasa de disparo y el 20% decrementando su tasa de disparo al incrementarse la concentración de sacarosa. Estos resultados confirmaron que el LHA contiene neuronas que codifican la palatabilidad (Li et al., 2013), neuronas responsivas a los sabores también se han reportado en otras áreas consideradas parte del sistema gustativo, incluyendo la corteza gustativa (Katz et al., 2001), la amígdala basolateral (Fontanini et al., 2009; Moran et al., 2014) e hipocampo (Herzog et al., 2018).

El LHA parece ser más central en el circuito del aprendizaje de la preferencia del sabor, esta anatómicamente conectado a otros sitios relacionados con la palatabilidad y motivación como el Núcleo Accumbens shell (NAc-Sh) (Villavicencio et al., 2018) donde la inhibición de las neuronas espinosas medianas que expresan el receptor para dopamina tipo I (D1R-MSNs) y que además proyectan al LHA permiten la alimentación (O'Connor et al., 2015). Recientemente se reportó la potenciación de la sinapsis NAc a LHA (*ex vivo*) al momento de la hiperfagia, en sujetos expuestos a un régimen de restricción de alimento y ejercicio desencadena la hiperfatiga y la ganancia de peso en cuanto vuelven a tener acceso al alimento *ad libitum* (Thoeni 287.02, SFN 2018), lo anterior apunta a un modelo donde la plasticidad en el circuito NAc→LHA podría soportar la reasociación al consumo de alimentos después de un periodo de pérdida de peso.

La obesidad se ha asociado con una significativa disminución de la calidad de vida, debido a sus múltiples comorbilidades y la muerte prematura (Marie Ng, Tom Fleming, Margaret Robinson, Blake Thomson, Nicholas Graetz, Christopher Margono, Erin C Mullany et al., 2014; Flegal et al., 2016). Tratamientos no quirúrgicos contra la obesidad mórbida muestran índices altos de fracaso, mientras que las opciones quirúrgicas, como el *bypass* gástrico y la gastrectomía, que conllevan una morbilidad significativa, han demostrado índices de fracaso considerables (Buchwarld et al., 2004; Gloy et al., 2013; Chang et al., 2014). El primer estudio de estimulación profunda en el cerebro (DBS, por sus siglas en inglés) bilateral en LHA en humanos, se realizó en 2013 por Whiting et al. Este estudio se enfocó en la seguridad del paciente y reporto la pérdida de peso en 2 de los 3 pacientes con los parámetros de estimulación



optimizados (Frecuencia de 185 Hz con pulsos de 90 microsegundos, [\(Whiting et al., 2013\)](#)).

El LHA es una estructura muy compleja donde diferentes regiones presentan diferentes funciones [\(Khan, 2013\)](#). Además, existen diferencias interespecies [\(Bittencourt et al., 1998; Chometton et al., 2014, 2016\)](#), entonces los estudios en roedores deben ser interpretados con precaución. Evidencia reciente sugiere que la mayoría de las subpoblaciones del LHA contribuye diferencialmente a las conductas de recompensa, aversión y alimentación. Por ejemplo, la activación de las neuronas glutaminérgicas de LHA deprime la alimentación y se presentan conductas de aversión [\(Jennings et al., 2013\)](#), mientras que su ablación genética potencia el consumo de alimento y la ganancia de peso [\(Stamatakis et al., 2016\)](#), lo que sugiere a estas células como un regulador negativo de la alimentación. Lo anterior se encuentra en concordancia con los resultados aquí presentados, denotando la posibilidad de que la población neuronal no identificada optogenéticamente (Ver **Figura 12**) que decrementa su tasa de disparo en función de la concentración de sacarosa, podría presentar el fenotipo glutaminérgico. Estudios futuros podrán determinar la identidad de la población con correlación negativa aquí observada.

Las neuronas GABAérgicas de LHA parecen ser un grupo celular funcionalmente opuesto a las neuronas glutaminérgicas. La activación de las neuronas GABAérgicas se han implicado tanto en conductas tanto apetitivas como consumatoria [\(Jennings et al., 2015\)](#), mientras que su inhibición o ablación genética reduce el consumo de alimento y resulta en conductas aversivas [\(Jennings et al., 2015; Navarro et al., 2016\)](#). El principal hallazgo de este trabajo describe que las neuronas GABAérgicas incrementan su tasa de disparo para monitorear el valor hedónico del alimento, y entonces las propone como un blanco farmacológico considerable para el tratamiento de la obesidad.

## CONCLUSIONES

Se encontraron dos poblaciones de neuronas con distintas respuestas relacionadas con la palatabilidad a la sacarosa: una que incrementa y otra que decrementa su tasa de disparo cuando incrementa la palatabilidad de la sacarosa.

47% de estas neuronas relacionadas con la palatabilidad fueron fotoidentificadas como neuronas LHA<sup>GABA</sup> e incrementan su tasa de disparo en función de la concentración de sacarosa, en condiciones fisiológicas. Una subpoblación de neuronas no-GABAérgicas en LHA (no fotoidentificadas, 32%) también monitorean el valor hedónico de la sacarosa. Debido a la gran importancia que tienen las neuronas LHA<sup>GABA</sup> en la alimentación, estos datos demuestran por primera vez que estas neuronas se activan más cuando la solución es más palatable, lo que las convierte en un blanco farmacológico potencial para disminuir la palatabilidad de los sabores (ver Fig. 13).

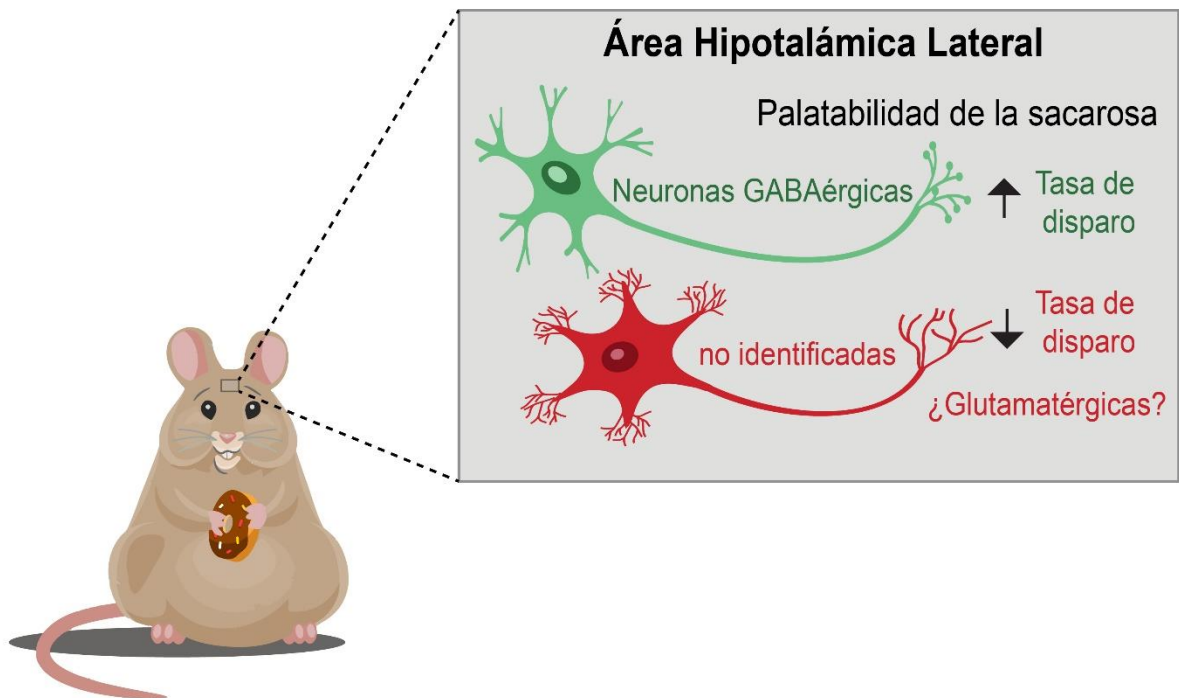


Figure 13. Las neuronas LHA<sup>GABA</sup> monitorean el valor hedónico de la sacarosa incrementando su tasa de disparo.

## PERSPECTIVAS

Debido a que las neuronas LHA<sup>GABA</sup> se activan más cuando la solución es más palatable, las convierte en un blanco farmacológico potencial para disminuir la palatabilidad de los sabores. Se propone el siguiente trabajo a futuro:

- Identificar a la población aquí clasificada como no-GABAérgica. Utilizando el ratón transgénico Vglut2-IRES-Cre ([Vong et al., 2011](#)), bajo el mismo esquema metodológico (Prueba de Acceso Breve y posteriormente la Fotoidentificación, descrito aquí con detalle).
- Monitorear la actividad neuronal de las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas, en los sujetos Vgat-IRES-Cre y Vglut2-IRES-Cre ([Vong et al., 2011](#)) respectivamente, mediante la técnica de Fotometría mientras los sujetos consumen distintas concentraciones de azúcar.

Con esta serie de experimentos se determinará de forma contundente y definitiva, si las neuronas GABAérgicas del Área Hipotalámica Lateral son las responsables de nuestro gusto exacerbado por el azúcar.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Adamantidis, A.; de Lecea, L., 2009: The hypocretins as sensors for metabolism and arousal. *Journal of Physiology.*, **587**, 33–40.
- Adamantidis, A. R.; Zhang, F.; Aravanis, A. M.; Deisseroth, K.; De Lecea, L., 2007: Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature.*, **450**, 420–424.
- Anand, B. K.; Brobeck, J. R., 1951: Hypothalamic Control of Food Intake in Rats and Cats. *Yale Journal of Biology and Medicine.*, 123–140.
- Asin, K. E.; Davis, J. D.; Bednarz, L., 1992: Differential effects of serotonergic and catecholaminergic drugs on ingestive behavior. *Psychopharmacology.*, **109**, 415–421.
- Baimel, C.; Bartlett, S. E.; Chiou, L. C.; Lawrence, A. J.; Muschamp, J. W.; Patkar, O.; Tung, L. W.; Borgland, S. L., 2015: Orexin/hypocretin role in reward: Implications for opioid and other addictions. *British Journal of Pharmacology.*, **172**, 334–348.
- Balcita-Pedicino, J. J.; Sesack, S. R., 2002: Orexin Axons in the Rat Ventral Tegmental Area Synapse Infrequently Onto Dopamine and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Neurons. *The Journal of Comparative Neurology.*, **503**, 668–684.
- Berk, M. L.; Finkelstein, J. A., 1982: Efferent connections of the lateral hypothalamic area of the rat: An autoradiographic investigation. *Brain Research Bulletin.*, **8**, 511–526.
- Bernardis, L. L.; Bellinger, L. L., 1993: The Lateral Hypothalamic Area Revisited: Neuroanatomy, Body Weight Regulation, Neuroendocrinology and Metabolism. *Neuroscience and biobehavioral reviews.*, **17**, 141–193.
- Bernardis, L. L.; Bellinger, L. L., 1996: The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews.*, **20**, 189–287.
- Berridge, K. C.; Grill, H. J., 1983: Alternating ingestive and aversive consummatory responses suggest a two-dimensional analysis of palatability in rats. *Behavioral neuroscience.*, **97**, 563–573.
- Berridge, K. C.; Fentress, J. C., 1985: Trigeminal-Taste Interaction in Palatability Processing. *Science.*, **228**, 747–750.
- Berridge, K. C., 1991: Modulation of taste affect by hunger, caloric satiety, and sensory-specific satiety in the rat. *Appetite.*, **16**, 103–120.
- Berthoud, H. R., 2004: Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiology and Behavior.*, **81**, 781–793.
- Berthoud, H. R.; Münzberg, H., 2011: The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: From electrical self-stimulation to optogenetics. *Physiology and Behavior.*, **104**, 29–39.
- Bittencourt, J.; Presse, F.; Arias, C.; Peto, C.; Vaughan, J.; Nahon, J.; Vale, W.;

- Sawchenko, P., 1992: The melanin concentrating hormone system of the rat brain An immuno and hybridisation histochemical characterisation.pdf. *The Journal of Comparative Neurology.*, **319**, 218–245.
- Bittencourt, J. C.; Frigo, L.; Rissman, R. A.; Cassatti, C. A.; Nahon, J. L.; Bauer, J., 1998: The distribution of melanin-concentrating hormone in the monkey brain. *Brain research.*, 140–143.
- Blundell, J.; Rogers, P., 1991: Hunger, hedonics and the control of satiation and satiety.
- Bonnaïon, P.; Mickelsen, L. E.; Fujita, A.; de Lecea, L.; Jackson, A. C., 2016: Hubs and spokes of the lateral hypothalamus: cell types, circuits and behaviour. *Journal of Physiology.*, **594**, 6443–6462.
- Boughter, J.; Smith, D., 2002: A brief-access test for bitter taste in mice. *Chemical Senses.*, **27**, 133–142.
- Boyle, P. C.; Keeseey, R. E., 1975: Chronically reduced body weight in rats sustaining lesions of the lateral hypothalamus and maintained on palatable diets and drinking solutions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology.*, **88**, 218–223.
- Breslin, P. A. S.; Spector, A. C.; Grill, H. J., 1992: A Quantitative Comparison of Taste Reactivity Behaviors to Sucrose Before and After Lithium Chloride Pairings: A Unidimensional Account of Palatability. *Behavioral Neuroscience.*, **106**, 820–836.
- Broberger, C.; De Lecea, L.; Sutcliffe, J. G.; Hokfelt, T., 1998: Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: Relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *Journal of Comparative Neurology.*, **402**, 460–474.
- Brown, J. A.; Woodworth, H. L.; Leininger, G. M., 2015: To ingest or rest? Specialized roles of lateral hypothalamic area neurons in coordinating energy balance. *Frontiers in Systems Neuroscience.*, **9**, 1–25.
- Buchwald, H.; Avidor, Y.; Braunwald, E.; Jensen, M. D.; Pories, W.; Fahrenbach, K.; Shoelles, K., 2004: Bariatric Surgery A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA.*, **292**, 257–258.
- Burdakov, D.; Karnani, M. M.; Gonzalez, A., 2013: Lateral hypothalamus as a sensor-regulator in respiratory and metabolic control. *Physiology and Behavior.*, **121**, 117–124.
- Cabanac, M., 1989: Palatability of Food and the Ponderostat. *Annals of the New York Academy of Sciences.*, **575**, 340–352.
- Chandrashekar, J.; Hoon, M. A.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S., 2006: The receptors and cells for mammalian taste. *Nature.*, **444**, 288–294.
- Chang, S. H.; Stoll, C. R. T.; Song, J.; Varela, J. E.; Eagon, C. J.; Colditz, G. A., 2014:

- The effectiveness and risks of bariatric surgery an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012. *JAMA Surgery.*, **149**, 275–287.
- Chee, M. J. S.; Arrigoni, E.; Maratos-Flier, E., 2015: Melanin-Concentrating Hormone Neurons Release Glutamate for Feedforward Inhibition of the Lateral Septum. *Journal of Neuroscience.*, **35**, 3644–3651.
- Chometton, S.; Franchi, G.; Houdayer, C.; Mariot, A.; Poncet, F.; Fellmann, D.; Tillet, Y.; Risold, P. Y., 2014: Different distributions of preproMCH and hypocretin/orexin in the forebrain of the pig (*Sus scrofa domestica*). *Journal of Chemical Neuroanatomy.*, **61**, 72–82.
- Chometton, S.; Croizier, S.; Fellmann, D.; Risold, P. Y., 2016: The MCH neuron population as a model for the development and evolution of the lateral and dorsal hypothalamus. *Journal of Chemical Neuroanatomy.*, **75**, 28–31.
- Clifton, P. G., 2017: Neural circuits of eating behaviour: Opportunities for therapeutic development. *Journal of Psychopharmacology.*, **31**, 1388–1402.
- Collin, M.; Bäckberg, M.; Ovesjö, M. L.; Fisone, G.; Edwards, R. H.; Fujiyama, F.; Meister, B., 2003: Plasma membrane and vesicular glutamate transporter mRNAs/proteins in hypothalamic neurons that regulate body weight. *European Journal of Neuroscience.*, **18**, 1265–1278.
- Davis, J. D., 1973: The effectiveness of some sugars in stimulating licking behavior in the rat. *Physiology and Behavior.*, **11**, 39–45.
- Davis, J. D.; Smith, G. P., 1992: Analysis of the Microstructure of the Rhythmic Tongue Movements of Rats Ingesting Maltose and Sucrose Solutions. *Behavioral Neuroscience.*, **106**, 217–228.
- Davis, J. D.; Perez, M. C., 1993: Food deprivation- and palatability-induced microstructural changes in ingestive behavior. *The American journal of physiology.*, **264**, R97-103.
- de Araujo, I. E.; Gutierrez, R.; Oliveira-Maia, A. J.; Pereira, A.; Nicolelis, M. A. L.; Simon, S. A., 2006: Neural Ensemble Coding of Satiety States. *Neuron.*, **51**, 483–494.
- de Lecea, L.; Kilduff, T. S.; Peyron, C.; Gao, X. B.; Foye, P. E.; Danielson, P. E.; Fukuhara, C.; Battenberg, E. L. F.; Gautvik, V. T.; Bartlett, F. S.; Frankel, W. N.; van den Pol, A. N.; Bloom, F. E.; Gautvik, K. M.; Sutcliffe, J. G., 1998: The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, **95**, 322–327.
- Delgado, J. M. R.; Anand, B. K., 1953: Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *The American journal of physiology.*, **172**, 162–168.
- Elias, C. F.; Saper, C. B.; Maratos-flier, E.; Tritos, N. a; Lee, C.; Kelly, J.; Tatro, J. B.; Hoffman, G. E.; Ollmann, M. M.; Barsh, G. S.; Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Elmquist, J. K., 1998: Chemically Defined Projections Linking the Mediobasal Hypothalamus and the Lateral Hypothalamic Area, **402**, 442–459.

- Elias, C. F.; Lee, C. E.; Kelly, J. F.; Ahima, R. S.; Kuhar, M.; Saper, C. B.; Elmquist, J. K., 2001: Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology.*, **432**, 1–19.
- Flegal, K. M.; Kruszon-Moran, D.; Carroll, M. D.; Fryar, C. D.; Ogden, C. L., 2016: Trends in Obesity Among Adults in the United States, 2005 to 2014. *JAMA.*, **115**, 2284–2291.
- Fontanini, A.; Grossman, S. E.; Figueroa, J. A.; Katz, D. B., 2009: Distinct Subtypes of Basolateral Amygdala Taste Neurons Reflect Palatability and Reward. *Journal of Neuroscience.*, **29**, 2486–2495.
- Fortis-Santiago, Y.; Rodwin, B. A.; Neseliler, S.; Piette, C. E.; Katz, D. B., 2010: State dependence of olfactory perception as a function of taste cortical inactivation. *Nature Neuroscience.*, **13**, 158–159.
- Galef, B. G., 1986: Social Interaction Modifies Learned Aversions, Sodium Appetite, and Both Palatability and Handling-Time Induces Dietary Preference in Rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology.*, **100**, 432–439.
- Giardino, W. J.; de Lecea, L., 2014: Hypocretin (orexin) neuromodulation of stress and reward pathways. *Current Opinion in Neurobiology.*, **29**, 103–108.
- Gloy, V. L.; Briel, M.; Bhatt, D. L.; Kashyap, S. R.; Schauer, P. R.; Mingrone, G.; Bucher, H. C.; Nordmann, A. J., 2013: Bariatric surgery versus non-surgical treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Bmj.*, **347**, f5934–f5934.
- Grill, H. J.; Norgren, R., 1978: The Taste Reactivity Test. Mimetic Responses to Gustatory Stimuli in Neurologically Normal Rats. *Brain research.*, **143**, 263–279.
- Guan, J. L.; Uehara, K.; Lu, S.; Wang, Q. P.; Funahashi, H.; Sakurai, T.; Yanagizawa, M.; Shioda, S., 2002: Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: A novel circuit implicated in feeding regulation. *International Journal of Obesity.*, **26**, 1523–1532.
- Hara, J.; Beuckmann, C. T.; Nambu, T.; Willie, J. T.; Chemelli, R. M.; Sinton, C. M.; Sugiyama, F.; Yagami, K. I.; Goto, K.; Yanagisawa, M.; Sakurai, T., 2001: Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron.*, **30**, 345–354.
- Harris, G. C.; Wimmer, M.; Aston-Jones, G., 2005: A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature.*, **437**, 556–559.
- Harrison, T. A.; Chen, C. T.; Dun, N. J.; Chang, J. K., 1999: Hypothalamic orexin A-immunoreactive neurons project to the rat dorsal medulla. *Neuroscience Letters.*, **273**, 17–20.
- Harthoorn, L. F.; Sañé, A.; Nethe, M.; Van Heerikhuizen, J. J., 2005: Multi-transcriptional profiling of melanin-concentrating hormone and orexin-containing neurons.

*Cellular and Molecular Neurobiology.*, **25**, 1209–1223.

- Hassani, O. K.; Henny, P.; Lee, M. G.; Jones, B. E., 2010: GABAergic neurons intermingled with orexin and MCH neurons in the lateral hypothalamus discharge maximally during sleep. *European Journal of Neuroscience.*, **32**, 448–457.
- Haynes, A. C.; Chapman, H.; Taylor, C.; Moore, G. B. T.; Cawthorne, M. A.; Tadayyon, M.; Clapham, J. C.; Arch, J. R. S., 2002: Anorectic, thermogenic and anti-obesity activity of a selective orexin-1 receptor antagonist in ob/ob mice. *Regulatory Peptides.*, **104**, 153–159.
- Herzog, L. E.; Pascual, L. M.; Scott, S. J.; Mathieson, E. R.; Katz, D. B.; Jadhav, S. P., 2018: Interaction of taste and place coding in the hippocampus. *bioRxiv.*, 431353.
- Hetherington, A. W.; Ranson, S. W., 1940: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record.*, **78**, 149–172.
- Hoebel, B. G.; Teitelbaum, P., 1961: Hypothalamic Control of Feeding and Self-Stimulation. *Science.*, **541**, 375–376.
- Hoebel, B. G., 1965: Hypothalamic lesions by electrocauterization: Disinhibition of feeding and self-stimulation. *Science.*, **149**, 452–453.
- Horst, G. J. T.; De Boer, P.; Luiten, P. G. M.; Van Willigen, J. D., 1989: Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience.*, **31**, 785–797.
- Hurley, S. W.; Johnson, A. K., 2014: The role of the lateral hypothalamus and orexin in ingestive behavior: a model for the translation of past experience and sensed deficits into motivated behaviors. *Frontiers in Systems Neuroscience.*, **8**, 1–10.
- Jego, S.; Glasgow, S. D.; Herrera, C. G.; Ekstrand, M.; Reed, S. J.; Boyce, R.; Friedman, J.; Burdakov, D.; Adamantidis, A. R., 2013: Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. *Nature Neuroscience.*, **16**, 1637–1643.
- Jennings, J. H.; Rizzi, G.; Stamatakis, A. M.; Ung, R. L.; Stuber, G. D., 2013: The inhibitory Circuit Architecture of the Lateral Hypothalamus Orchestrates Feeding. *Science.*, **341**, 1517–1522.
- Jennings, J. H.; Ung, R. L.; Resendez, S. L.; Stamatakis, A. M.; Taylor, J. G.; Huang, J.; Veleta, K.; Katak, P. A.; Aita, M.; Shilling-Scrivero, K.; Ramakrishnan, C.; Deisseroth, K.; Otte, S.; Stuber, G. D., 2015: Visualizing Hypothalamic Network Dynamics for Appetitive and Consummatory Behaviors.
- Johnson, A. W.; Sherwood, A.; Smith, D. R.; Wosiski-Kuhn, M.; Gallagher, M.; Holland, P. C., 2010: An analysis of licking microstructure in three strains of mice. *Appetite.*, **52**, 320–330.
- Kampe, J.; Tschöp, M. H.; Hollis, J. H.; Oldfield, B. J., 2009: An anatomic basis for the



- communication of hypothalamic, cortical and mesolimbic circuitry in the regulation of energy balance. *European Journal of Neuroscience.*, **30**, 415–430.
- Karnani, M. M.; Szabó, G.; Erdélyi, F.; Burdakov, D., 2013: Lateral hypothalamic GAD65 neurons are spontaneously firing and distinct from orexin- and melanin-concentrating hormone neurons. *Journal of Physiology.*, **591**, 933–953.
- Katz, D. B.; Simon, S. a; Nicolelis, M. A. L.; Carolina, N., 2001: Dynamic and multimodal responses of gustatory cortical neurons in awake rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.*, **21**, 4478–4489.
- Khan, A. M., 2013: Controlling feeding behavior by chemical or gene-directed targeting in the brain: What's so spatial about our methods? *Frontiers in Neuroscience.*, **7**, 1–49.
- Knight, Z. A.; Tan, K.; Birsoy, K.; Schmidt, S.; Garrison, J. L.; Wysocki, R. W.; Emiliano, A.; Ekstrand, M. I.; Friedman, J. M., 2012: Molecular profiling of activated neurons by phosphorylated ribosome capture. *Cell.*, **151**, 1126–1137.
- Lawrence, A. J.; De Lecea Editors, L., 2017: *Behavioral Neurosciences of Orexin/Hypocretin*.
- Le Magnen, J., 1987: Palatability: concept, terminology, and mechanisms. *Eating habits : food, physiology and learned behaviour / edited by Robert A. Boakes, David A. Popplewell, Michael J. Burton*.
- Lee, A. K.; Chowdhury, R.; Welsh, J. A., 2015: Sugars and adiposity: the long-term effects of consuming added and naturally occurring sugars in foods and in beverages. *Obesity Science & Practice.*, **1**, 41–49.
- Li, J. X.; Yoshida, T.; Monk, K. J.; Katz, D. B., 2013: Lateral Hypothalamus Contains Two Types of Palatability-Related Taste Responses with Distinct Dynamics. *Journal of Neuroscience.*, **33**, 9462–9473.
- Ludwig, D. S.; Tritos, N. A.; Mastaitis, J. W.; Kulkarni, R.; Kokkotou, E.; Elmquist, J.; Lowell, B.; Flier, J. S.; Maratos-Flier, E., 2001: Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation.*, **107**, 379–386.
- Malik, V. S.; Popkin, B. M.; Bray, G. A.; Després, J. P.; Hu, F. B., 2010: Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation.*, **121**, 1356–1364.
- Margules, D. L.; Olds, J., 1961: Identical 'Feeding' and 'Rewarding' Systems in the Lateral Hypothalamus of Rats. *Science.*, **135**, 374–375.
- Marie Ng, Tom Fleming, Margaret Robinson, Blake Thomson, Nicholas Graetz, Christopher Margono, Erin C Mullany, S. B.; Cristiana Abbafati\*, Semaw Ferede Abera\*, Jerry P Abraham\*, Niveen M E Abu-Rmeileh\*, Tom Achoki\*, Fadia S AlBuhairan\*, Z. A. A.; Rafael Alfonso\*, Mohammed K Ali\*, Raghil Ali\*, Nelson Alvis Guzman\*, Walid Ammar\*, Palwasha Anwari\*, A. B.; Simon Barquera\*,

Sanjay Basu\*, Derrick A Bennett\*, Zulfi qar Bhutta\*, Jed Blore\*, Norberto Cabral\*, Ismael Campos Nonato\*, J. C. C.; Rajiv Chowdhury\*, Karen J Courville\*, Michael H Criqui\*, David K Cundiff \*, Kaustubh C Dabhadkar\*, Lalit Dandona\*, A. D.; Anand Dayama\*, Samath D Dharmaratne\*, Eric L Ding\*, Adnan M Durrani\*, Alireza Esteghamati\*, Farshad Farzadfar\*, D. F. J. F.; Valery L Feigin\*, Abraham Flaxman\*, Mohammad H Forouzanfar\*, Atsushi Goto\*, Mark A Green\*, Rajeev Gupta\*, N. H. N.; Graeme J Hankey\*, Heather C Harewood\*, Rasmus Havmoeller\*, Simon Hay\*, Lucia Hernandez\*, Abdullatif Husseini\*, B. T. I.; Nayu Ikeda\*, Farhad Islami\*, Eiman Jahangir\*, Simerjot K Jassal\*, Sun Ha Jee\*, Mona Jeff reys\*, Jost B Jonas\*, E. K. K.; Shams Eldin Ali Hassan Khalifa\*, Andre Pascal Kengne\*, Yousef Saleh Khader\*, Young-Ho Khang\*, Daniel Kim\*, R. W. K.; Jonas M Kinge\*, Yoshihiro Kokubo\*, Soewarta Kosen\*, Gene Kwan\*, Taavi Lai\*, Mall Leinsalu\*, Yichong Li\*, Xiaofeng Liang\*, S. L.; Giancarlo Logroscino\*, Paulo A Lotufo\*, Yuan Lu\*, Jixiang Ma\*, Nana Kwaku Mainoo\*, George A Mensah\*, Tony R Merriman\*, A. H. M.; Joanna Moschandreas\*, Mohsen Naghavi\*, Aliya Naheed\*, Devina Nand\*, K M Venkat Narayan\*, Erica Leigh Nelson\*, M. L. N.; Muhammad Imran Nisar\*, Takayoshi Ohkubo\*, Samuel O Oti\*, Andrea Pedroza\*, Dorairaj Prabhakaran\*, Nobhojit Roy\*, U. S.; Hyeyoung Seo\*, Sadaf G Sepanlou\*, Kenji Shibuya\*, Rahman Shiri\*, Ivy Shiue\*, Gitanjali M Singh\*, Jasvinder A Singh\*, V. S.; Nicolas J C Stapelberg\*, Lela Sturua\*, Bryan L Sykes\*, Martin Tobias\*, Bach X Tran\*, Leonardo Trasande\*, H. T.; Steven van de Vijver\*, Tommi J Vasankari\*, J Lennert Veerman\*, Gustavo Velasquez-Melendez\*, Vasiliy Victorovich Vlassov\*, S. E. V.; Theo Vos\*, Claire Wang\*, XiaoRong Wang\*, Elisabete Weiderpass\*, Andrea Werdecker\*, Jonathan L Wright\*, Y Claire Yang\*, H. Y.; Jihyun Yoon\*, Seok-Jun Yoon\*, Yong Zhao\*, Maigeng Zhou\*, Shankuan Zhu\*, Alan D Lopez†, Christopher J L Murray†, E. G., 2014: Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet.*, **384**, 766–781.

McIntire, S. L.; Reimer, R. J.; Schuske, K.; Edwards, R. H.; Jorgensen, E. M., 1997: Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature.*, **389**, 870–876.

Mickelsen, L. E.; Kolling, F. W.; Chimileski, B. R.; Fujita, A.; Norris, C.; Chen, K.; Nelson, C. E.; Jackson, A. C., 2017: Neurochemical Heterogeneity Among Lateral Hypothalamic Hypocretin/Orexin and Melanin-Concentrating Hormone Neurons Identified Through Single-Cell Gene Expression Analysis. *Eneuro.*, **4**, ENEURO.0013-17.2017.

Monti, J. M.; Torterolo, P.; Lagos, P., 2013: Melanin-concentrating hormone control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews.*, **17**, 293–298.

Moran, A.; Katz, D. B., 2014: Sensory Cortical Population Dynamics Uniquely Track Behavior across Learning and Extinction. *Journal of Neuroscience.*, **34**, 1248–1257.

Nakamura, Y.; Katakura, N., 1995: Generation of masticatory rhythm in the brainstem. *Neuroscience Research.*, **23**, 1–19.

- Navarro, M.; Olney, J. J.; Burnham, N. W.; Mazzone, C. M.; Lowery-Gionta, E. G.; Pleil, K. E.; Kash, T. L.; Thiele, T. E., 2016: Lateral hypothalamus GABAergic neurons modulate consummatory behaviors regardless of the caloric content or biological relevance of the consumed stimuli. *Neuropsychopharmacology.*, **41**, 1505–1512.
- O'Connor, E. C.; Kremer, Y.; Lefort, S.; Harada, M.; Pascoli, V.; Rohner, C.; Lüscher, C., 2015: Accumbal D1R Neurons Projecting to Lateral Hypothalamus Authorize Feeding. *Neuron.*, **88**, 553–564.
- OECD, 2017: Obesity Update 2017. *Diabetologie.*, **13**, 331–341.
- Perez, I. O.; Villavicencio, M.; Simon, S. a; Gutierrez, R., 2013: Speed and accuracy of taste identification and palatability: impact of learning, reward expectancy, and consummatory licking. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology.*, **305**, R252-70.
- Pfaffmann, C., 1960: The pleasures of sensation. *Psychological review.*, **67**, 253–268.
- Pfaffmann, C.; Norgre, R.; Grill, H. J., 1977: Sensory Affect and Motivation. *The Rockefeller University.*, **14**, 18–34.
- Pissios, P.; Bradley, R. L.; Maratos-Flier, E., 2006: Expanding the scales: The multiple roles of MCH in regulating energy balance and other biological functions. *Endocrine Reviews.*, **27**, 606–620.
- Popkin, B. M.; Nielsen, S. J., 2003: The Sweetening of the World ' s Diet. *Obesity Research.*, **11**, 1325–1332.
- Qu, D.; Ludwing, D. S.; Gammentoft, S.; Piper, M.; Pellemounter, M. A.; Cullen, M. J.; Mathes, W. F.; Przypek, J.; Kanarek, R.; Maratos-Flier, E., 1996: A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour.
- Rosin, D. L.; Weston, M. C.; Sevigny, C. P.; Stornetta, R. L.; Guyenet, P. G., 2003: Hypothalamic orexin (hypocretin) neurons express vesicular glutamate transporters VGLUT1 or VGLUT2. *Journal of Comparative Neurology.*, **465**, 593–603.
- Sakurai, T.; Amemiya, A.; Ishii, M.; Matsuzaki, I.; Chemelli, R. M.; Tanaka, H.; Williams, S. C.; Richardson, J. A.; Kozlowski, G. P.; Wilson, S.; Arch, J. R. S.; Buckingham, R. E.; Haynes, A. C.; Carr, S. A.; Annan, R. S.; McNulty, D. E.; Liu, W. S.; Terrett, J. A.; Elshourbagy, N. A. et al., 1998: Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior Recent efforts in genomics research have identified a large number of cDNA sequences that encode &quot; orphan &quot;. *Cell.*, **92**, 573–585.
- Sakurai, T.; Mieda, M., 2011: Connectomics of orexin-producing neurons: Interface of systems of emotion, energy homeostasis and arousal. *Trends in Pharmacological Sciences.*, **32**, 451–462.
- Sakurai, T., 2014: The role of orexin in motivated behaviours. *Nature Reviews*

*Neuroscience.*, **15**, 719–731.

- Sánchez-Pimienta, T. G.; Batis, C.; Lutter, C. K.; Rivera, J. A., 2016: Sugar-Sweetened Beverages Are the Main Sources of Added Sugar Intake in the Mexican Population. *The Journal of Nutrition.*, **146**, 1888S–1896S.
- Saper, C. B.; Chou, T. C.; Elmquist, J. K.; Homeostasis, W., 2002: The Need to Feed : Homeostatic and Hedonic Control of Eating Leptin : A Peripheral Signal Regulating Body. *October.*, **36**, 199–211.
- Sapin, E.; Béroud, A.; Léger, L.; Herman, P. A.; Luppi, P. H.; Peyron, C., 2010: A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia. *PLoS ONE.*, **5**.
- Schwartz, G. J.; Grill, H. J., 1984: Relationships between taste reactivity and intake in the neurologically intact rat. *Chemical Senses.*, **9**, 249–272.
- Shin, S. Y.; Yang, J. H.; Lee, H.; Erdélyi, F.; Szabó, G.; Lee, S. Y.; Ryu, P. D., 2007: Identification of the adrenoceptor subtypes expressed on GABAergic neurons in the anterior hypothalamic area and rostral zona incerta of GAD65-eGFP transgenic mice. *Neuroscience Letters.*, **422**, 153–157.
- Spector, a C.; Klumpp, P. a; Kaplan, J. M., 1998: Analytical issues in the evaluation of food deprivation and sucrose concentration effects on the microstructure of licking behavior in the rat. *Behav Neurosci.*, **112**, 678–694.
- Spector, A. C.; Breslin, P.; Grill, H. J., 1988: Taste Reactivity as a Dependent Measure of the Rapid Formation of Conditioned Taste Aversion: A Tool for the Neural Analysis of Taste-Visceral Associations. *Behavioral Neuroscience.*, **102**, 942–952.
- Stamatakis, A. M.; Van Swieten, M.; Basiri, M. L.; Blair, G. A.; Katak, P.; Stuber, G. D., 2016: Lateral Hypothalamic Area Glutamatergic Neurons and Their Projections to the Lateral Habenula Regulate Feeding and Reward. *Journal of Neuroscience.*, **36**, 302–311.
- Steiner, J. E., 1973: The gustofacial response: observation on normal and anencephalic newborn infants. *Symposium on Oral Sensation and Perception.*, 254–278.
- Steiner, J. E., 1979: *Human facial expressions in response to taste and smell stimulation. Advances in Child Development and Behavior.*, Vol. 13.
- Stellar, E., 1954: The Physiology of Motivation. *Psychological review.*, **101**, 301–311.
- Sternson, S. M.; Eisel, A. K., 2017: Three Pillars for the Neural Control of Appetite. *Annual Review of Physiology.*, **79**, 401–423.
- Stuber, G. D.; Wise, R. A., 2016: Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nature Neuroscience.*, **19**, 198–205.
- Swanson, L. W., 2000: Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain*

- research.*, **886**, 113–164.
- Te Morenga, L.; Mallard, S.; Mann, J., 2012: Dietary sugars and body weight: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. *Bmj.*, **346**, e7492–e7492.
- Teitelbaum, P.; Epstein, A. N., 1962: The lateral hypothalamic syndrome: Recovery of feeding and drinking after lateral hypothalamic lesions. *Psychological Review.*, **69**, 74–90.
- Travers, J. B.; Norgren, R., 1986: Electromyographic Analysis of the Ingestion and Rejection of Sapid Stimuli in the Rat. *Behavioral Neuroscience.*, **100**, 544–555.
- Travers, S. P.; Norgren, R., 1991: Coding the sweet taste in the nucleus of the solitary tract: differential roles for anterior tongue and nasoincisor duct gustatory receptors in the rat. *Journal of Neurophysiology.*, **65**, 1372–1380.
- Villavicencio, M.; Moreno, M. G.; Simon, S. A.; Gutierrez, R., 2018: Encoding of sucrose's palatability in the nucleus accumbens shell and its modulation by exteroceptive auditory cues. *Frontiers in Neuroscience.*, **12**.
- Volkow, N. D.; Wise, R. A., 2005: How can drug addiction help us understand obesity? *Nature Commentary.*, **8**, 555–560.
- Vong, L.; Ye, C.; Yang, Z.; Choi, B.; Chua, S.; Lowell, B. B., 2011: Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. *Neuron.*, **71**, 142–154.
- Wallroth, R.; Ohla, K., 2018: As soon as you taste it – evidence for sequential and parallel processing of gustatory information. *eNeuro.*, in press.
- Wang, Y.; Kakizaki, T.; Sakagami, H.; Saito, K.; Ebihara, S.; Kato, M.; Hirabayashi, M.; Saito, Y.; Furuya, N.; Yanagawa, Y., 2009: Fluorescent labeling of both GABAergic and glycinergic neurons in vesicular GABA transporter (VGAT)-Venus transgenic mouse. *Neuroscience.*, **164**, 1031–1043.
- Whiting, D. M.; Tomycz, N. D.; Bailes, J.; de Jonge, L.; Lecoultre, V.; Wilent, B.; Alcindor, D.; Prostko, R.; Cheng, B. C.; Angle, C.; Cantella, D.; Whiting, B. B.; Mizes, J. S.; Finnis, K. W.; Ravussin, E.; Oh, M. Y., 2013: Lateral hypothalamic area deep brain stimulation for refractory obesity: a pilot with preliminary data of safety, body weight, and energy metabolism.
- Wyrwicka, W., 1969: Sensory regulation of food intake. *Physiology and Behavior.*, **4**, 853–858.
- Yamanaka, A.; Beuckmann, C. T.; Willie, J. T.; Hara, J.; Tsujino, N.; Mieda, M.; Tominaga, M.; Yagami, K. I.; Sugiyama, F.; Goto, K.; Yanagisawa, M.; Sakurai, T., 2003: Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron.*, **38**, 701–713.
- Young, P. T.; Greene, J. T., 1953: Quantity of food ingested as a measure of relative acceptability. *Journal of Comparative and Physiological Psychology.*, **46**, 288–

294.

Young, P. T., 1959: The role of affective processes in learning and motivation.

Young, P. T.; Trafton, C. L., 1964: Activity contour maps as related to preferences in four gustatory stimulus areas of the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology.*, **58**, 68–75.

Ziegler, D. R.; Cullinan, W. E.; Herman, J. P., 2002: Distribution of vesicular glutamate transporter mRNA in rat hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology.*, **448**, 217–229.