



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Codificación de la palatabilidad y su potenciación
por pistas auditivas en el núcleo accumbens shell”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Miguel Angel Villavicencio Camarillo

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

FARMACOLOGÍA

Director de tesis:

Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza

Ciudad de México

Abril, 2018

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	JUSTIFICACIÓN	11
3	HIPÓTESIS	12
4	OBJETIVOS	12
5	METODOLOGÍA.....	13
5.1	Sujetos.....	13
5.2	Cirugía de implantación de electrodos.....	14
5.3	Histología	14
5.4	Materiales y montaje experimental	15
5.4.1	<i>Estímulos gustativos.....</i>	<i>15</i>
5.4.2	<i>Caja conductual y estímulos auditivos.....</i>	<i>16</i>
5.4.3	<i>Sistema de liberación de fluidos</i>	<i>16</i>
5.5	Tareas de Acceso Breve a Sacarosa.....	17
5.6	Tratamiento de los datos conductuales	19
5.6.1	<i>Medición de palatabilidad</i>	<i>19</i>
5.6.2	<i>Comparaciones del desempeño entre las tareas.....</i>	<i>20</i>
5.7	Registros electrofisiológicos.....	21
5.8	Tratamiento de los datos electrofisiológicos	22
5.8.1	<i>Neuronas relacionadas a la palatabilidad</i>	<i>22</i>

	5.8.2	<i>Neuronas relacionadas a la concentración de sacarosa</i>	23
	5.8.3	<i>Neuronas coherentes con el lengüeteo y su relación con las concentraciones de sacarosa</i>	24
	5.8.4	<i>Neuronas moduladas por el lengüeteo</i>	25
	5.8.5	<i>Activaciones/Inhibiciones fásicas ante pistas auditivas</i>	25
	5.8.6	<i>Decodificación poblacional del NAcsh de la sacarosa</i>	26
	5.9	<i>Análisis estadísticos</i>	28
6		RESULTADOS	29
	6.1	Resultados conductuales	29
	6.1.1	<i>Efectos de las pistas auditivas en las respuestas de palatabilidad</i>	31
	6.1.2	<i>Potenciamiento de la palatabilidad por pistas auditivas</i>	34
	6.1.3	<i>Estrategias conductuales en las tareas de acceso breve a sacarosa</i>	37
	6.2	Resultados electrofisiológicos	40
	6.3	Neuronas del NAcSh que monitorean las respuestas de palatabilidad de la sacarosa	40
	6.4	Neuronas del NAcSh que monitorean la concentración de sacarosa	43
	6.5	Neuronas que codifican los incrementos en sacarosa mediante un código de sincronía	45
	6.6	Neuronas moduladas por la alimentación: Activas e Inactivas	46
	6.6.1	<i>Neuronas Inactivas y su papel centinela del consumo de sacarosa</i>	49
	6.6.2	<i>Neuronas Activas y su papel durante el consumo de sacarosa</i>	49
	6.7	Decodificación de la sacarosa por parte de las poblaciones funcionales del NAcSh	50
	6.7.1	<i>La decodificación de la sacarosa por las poblaciones funcionales del NAcSh es afectada por el contexto</i>	52
	6.7.2	<i>La expresión de la palatabilidad y su correlato neuronal en el NAcSh son rápidos</i>	53

6.7.3	<i>Las neuronas de Palatabilidad contienen información irremplazable sobre la sacarosa</i>	54
6.8	Respuestas fásicas inhibitorias que monitorean el fin de la recompensa.....	56
7	DISCUSIÓN	59
8	CONCLUSIONES.....	65
9	LIMITACIONES	66
10	BIBLIOGRAFÍA.....	67
11	ANEXO.....	73
12	PUBLICACIÓN REALIZADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS77	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Dibujo esquemático de la vía gustativa.	3
Figura 2.	Las neuronas Activas e Inactivas con el lengüeteo son tipos celulares diferentes y juegan un rol distinto en la alimentación.....	5
Figura 3.	Roitman et al. (2005) postularon que las neuronas del NAcsh se inhiben o activan ante estímulos recompensantes o aversivos, respectivamente.	7
Figura 4.	Taha y Fields (2005) propusieron que distintas poblaciones neuronales del NAcSh codifican la recompensa y la alimentación.	8
Figura 5.	Localización representativa de los sitios de registro.	15
Figura 6.	Montaje experimental y las tres variantes de la tarea de acceso breve usadas en este estudio.	18
Figura 7.	La tasa de lengüeteos refleja la palatabilidad de la sacarosa en los ensayos Incompletos.	31
Figura 8.	Las respuestas de palatabilidad a la sacarosa fue modulada por las pistas auditivas.....	33
Figura 9.	Las Pistas Start y Stop, en combinación, incrementan el Índice de ráfagas y la ingesta calórica.	39
Figura 10.	Neuronas en el NAcSh monitorean la palatabilidad oro-motora evocada por la sacarosa.	42
Figura 11.	Independientes a las respuestas oro-motoras, una población distinta del NAcSh monitorea la concentración de la sacarosa.	44
Figura 12.	Neuronas en el NAcSh que incrementan su coherencia con el lengüeteo en función de la sacarosa.	46
Figura 13.	Las neuronas Inactivas con el lengüeteo respondieron fásicamente a las Pistas Start y Stop.....	48

Figura 14. La decodificación de la concentración/palatabilidad de la sacarosa por diferentes poblaciones neuronales en el NAcSh. 51

Figura 15. Una población de neuronas del NAcSh señala el fin de la recompensa mediante inhibiciones fásicas usando la primer pista disponible. 58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. La tasa de lengüeteo para las tres tareas de acceso breve en función de la concentración de sacarosa 35

Tabla 2. Análisis de la microestructura del lengüeteo 37

Tabla 3. Neuronas coherentes con el lengüeteo en el NAcSh que conllevan información sobre la concentración de sacarosa 46

RESUMEN

Aunque la palatabilidad de la sacarosa es la principal razón por la cual es sobre-consumida, no se entiende completamente cómo es codificada en el núcleo accumbens Shell (NAcSh), una región parte del circuito de recompensa del cerebro. Asimismo, ajenos a la investigación se encuentran las cuestiones de cómo un estímulo auditivo exteroceptivo afecta la palatabilidad de la sacarosa y los correlatos neuronales de esa conducta en el NAcSh. Los objetivos del presente trabajo fueron determinar si las respuestas neuronales del NAcSh pueden monitorear la palatabilidad de la sacarosa, su concentración y cómo se procesa la información auditiva relevante para la alimentación. Usando pruebas de acceso breve a sacarosa, nosotros encontramos que la palatabilidad de la sacarosa fue potenciada por pistas auditivas exteroceptivas que señalizan el inicio y fin de un periodo de recompensa. La pista de inicio presentada sola aceleró el rechazo hacia el agua y fragmentó el lengüeteo. En presencia de las pistas de inicio y de fin de la recompensa, los animales se alimentaron más e incrementaron la ingesta calórica. El análisis de la microestructura del lengüeteo confirmó que las pistas auditivas potenciaron la palatabilidad de la sacarosa. Mediante los registros de actividad unitaria en los animales en libre movimiento identificamos distintas poblaciones neuronales en el NAcSh que monitorean la palatabilidad o la concentración de la sacarosa. Otro grupo de neuronas dispararon de manera sincrónica con el lengüeteo, y su coherencia con esta conducta aumentó en función de la concentración de sacarosa. Además, sólo las neuronas que fueron *Inactivas* con el lengüeteo, pero no las que fueron *Activas*, respondieron fásicamente a las pistas auditivas lo que sugiere que juegan un papel centinela en la alimentación monitoreando pistas relevantes a la ingesta para incrementar la entrada calórica y la palatabilidad de la sacarosa. En resumen, encontramos que las pistas auditivas que señalan la disponibilidad de una recompensa pueden potenciar la palatabilidad de la sacarosa e incrementar la ingesta calórica; y el correlato neuronal de estas conductas puede encontrarse en el NAcSh. Estos hallazgos muestran que las pistas exteroceptivas

asociadas a la alimentación podrían contribuir a generar un ambiente obesogénico.

ABSTRACT

Although the palatability of sucrose is the primary reason of why it is over consumed, it is not well understood how it is encoded in the nucleus accumbens shell (NAcSh), a brain reward region. Similarly, untouched are issues regarding how an external auditory stimulus affects sucrose palatability and the neuronal correlates of this behavior in the NAcSh. To address these questions we investigated, in behaving rats, how food-related auditory cues modulate sucrose's palatability. The goals are to determine whether NAcSh neuronal responses would track sucrose's palatability (licking), sucrose concentration, and how it processes auditory information. Using brief-access tests, we found that sucrose's palatability was enhanced by exteroceptive auditory cues that signal the start and the end of a reward period. The start cue accelerated the rejection of water, fragmented licking patterns, and decreased caloric intake. In the presence of both start and stop cues, the animals fed continuously and increased their caloric intake. Analysis of the licking microstructure confirmed that auditory cues enhanced sucrose palatability. Recordings of extracellular single-unit activity identified several distinct populations of NAcSh responses that tracked either the sucrose palatability (licking) responses or the sucrose concentrations by increasing or decreasing their activity. Another neural population fired synchronously with licking and exhibited, with increasing sucrose concentrations, an enhancement in their coherence. The population of NAcSh's palatability-related neurons, with increasing or decreasing firing rates, and Lick-Inactive responses, were the most important for decoding sucrose's palatability. Only the Lick-Inactive neurons were phasically activated by both auditory cues and may play a sentinel role monitoring relevant auditory cues to increase caloric intake and sucrose's palatability. In summary, we found that auditory cues that signal the availability of tastants enhanced sucrose palatability and caloric intake and

have neural correlates in the NAcSh. These findings show that exteroceptive cues associated with feeding may be a contributing factor in an obesogenic environment.

1 INTRODUCCIÓN

En los últimos 30 años la prevalencia de la obesidad a nivel mundial casi se ha triplicado (Bleich et al., 2008). En particular, México se encuentra entre los primeros 10 países con más individuos obesos en el mundo (Ng et al., 2014), alcanzando, en hombres y mujeres adultos el 70.6 y 69.4 % de prevalencia de obesidad y sobrepeso (Barquera et al., 2013), respectivamente. Una de las principales causas que explican el incremento global de estos padecimientos es el sobreconsumo de azúcar (Popkin and Nielsen, 2003). En conformidad con esto, nuestro país representa uno de los principales consumidores de alimentos y bebidas con azúcares añadidos (Barquera et al., 2008; Ismail et al., 1997; Rivera et al., 2004). En gran parte, el consumo exacerbado del azúcar se debe a la experiencia placentera que produce su intenso sabor dulce (Berridge and Kringelbach, 2015; Drewnowski et al., 2012; Zuker, 2015). De ahí que para poder abatir este importante problema de salud pública que México y el mundo enfrentan es necesario entender las bases biológicas de nuestra atracción por el azúcar.

Bases biológicas que controlan el gusto por el azúcar

Se sabe que el agradable sabor dulce del azúcar (sacarosa) evoca respuestas oromotoras características en diferentes especies de primates humanos y no-humanos (Steiner et al., 2001), así como también en roedores (Berridge, 2000). Estas respuestas conductuales incluyen expresiones faciales estereotipadas y respuestas apetitivas (como el lengüeteo) (Davis, 1973; Pfaffmann and Norgren, 1977) y se ha establecido que pueden ser medidas directas de la palatabilidad de un estímulo gustativo (Spector et al., 1998). Tanto la palatabilidad de la sacarosa como su sabor dulce son codificados en diferentes regiones del cerebro.

La información del sabor dulce es transmitida hasta el cerebro por la vía gustativa (Simon et al., 2006)(Fig. 1). Brevemente, las sustancias dulces son detectadas por las células receptoras del sabor que se encuentran en las papilas gustativas de la lengua y el paladar (Nelson et al., 2001). Estas células comunican la detección del dulzor a las neuronas sensoriales del ganglio geniculado (Wu et al., 2015) quienes transmiten esta información por la *corda timpani* hacia el núcleo del tracto solitario (Roussin et al., 2012). En roedores, el siguiente relevo a donde viaja la información gustativa del sabor dulce es el núcleo parabraquial (Li et al., 2012). Luego, la información del sabor dulce se transmite a la región parvocelular del núcleo ventroposteriomedial del tálamo (el tálamo gustativo) (Samuelson et al., 2013) y de ahí viaja a la corteza gustativa primaria (o corteza insular) (Stapleton et al., 2006). El dulzor también es codificado en otras estructuras de alto nivel cognitivo como la corteza orbitofrontal (corteza gustativa secundaria) (Rolls, 1989) y la corteza prefrontal (Jezzini et al., 2013). Además, la información gustativa de la sacarosa puede ser enviada a través de distintas rutas a otras estructuras "no-gustativas" como el núcleo central de la amígdala, el hipotálamo lateral y el núcleo accumbens shell (NAcSh) (Kadohisa et al., 2005; van der Kooy et al., 1984; Li et al., 2005, 2012, 2012). De esta manera, la información sobre la sacarosa puede alcanzar a una gran variedad de estructuras cerebrales involucradas con el procesamiento gustativo y afectivo (Spetter et al., 2010).

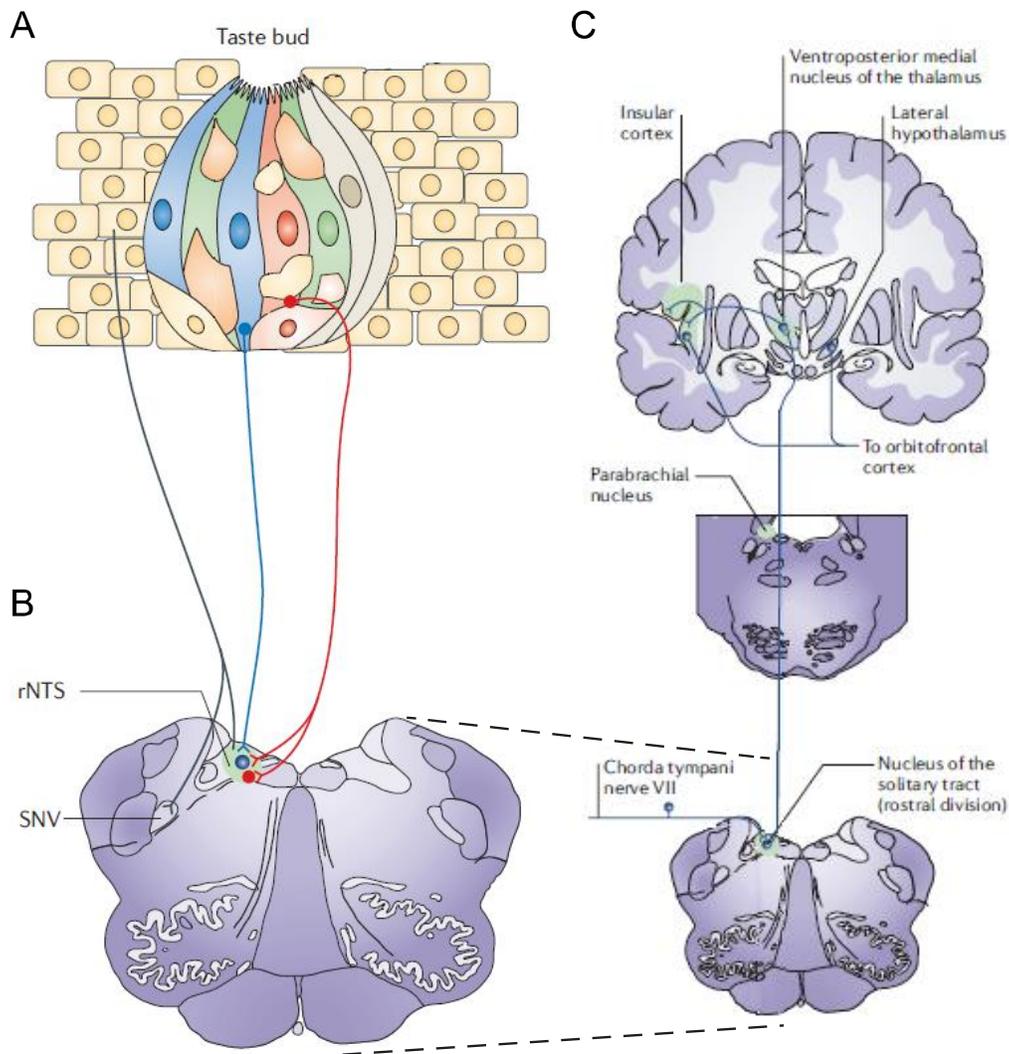


Figura 1. Dibujo esquemático de la vía gustativa.

A. Papila gustativa con células receptoras del sabor, las cuales se transmiten la información del dulzor a las neuronas de la cuerda del tímpano (proyección azul). **B.** La información gustativa acarreada por la cuerda el tímpano es transmitida al primer relevo central de la vía gustativa que es la porción rostral del núcleo de tracto solitario. **C.** A partir de que la información gustativa llega al sistema nervioso central es difundida a diversas estructuras (ver proyecciones en azul). Imagen modificada de Simon SA et al., 2006.

Por su parte, la palatabilidad de la sacarosa es procesada principalmente en regiones límbicas como el NAcSh. Esta región cerebral ha sido de particular interés en la codificación de la sacarosa como un estímulo hedónicamente positivo pues se ha encontrado que la actividad de sus neuronas se modula ante el valor

recompensante de esta sustancia (Taha and Fields, 2005) y su consumo produce cambios importantes en la concentración de dopamina en esta región del cerebro (Hajnal et al., 2004). Además, manipulaciones en la actividad opioide del NAcSh pueden potenciar las respuestas de palatabilidad (i.e., expresiones faciales apetitivas) que produce este endulzante (Castro and Berridge, 2014). Asimismo, las neuronas del NAcSh pueden responder tanto a la sacarosa, como a estímulos gustativos aversivos como la quinina (Roitman et al., 2005), lo que sugiere que esta estructura juega un papel general en la codificación de la palatabilidad de los estímulos sápidos. Sin embargo, en la actualidad no hay consenso sobre cómo las neuronas del NAcSh codifican la palatabilidad (Roitman et al., 2005; Taha and Fields, 2005). Una influyente teoría sostiene que el NAcSh transforma la información de palatabilidad/recompensa en el monitoreo de la ingesta (Mogenson et al., 1980). A continuación se abordará el conjunto de evidencia que ha apoyado esta aseveración.

Participación del NAcSh en la ingesta

Como se ha apuntado, se ha relacionado al NAcSh en el control de la conducta apetitiva, de tal manera que se ha propuesto como un nodo límbico-motor (Mogenson et al., 1980). Evidencia directa sostiene tal aseveración. Por ejemplo, se ha mostrado que la inactivación farmacológica del NAcSh inducida por la inyección local de muscimol, un agonista de los receptores GABA_A, incrementa la ingesta de alimento en animales saciados (Stratford and Kelley, 1997). Consistentemente, la activación eléctrica de las neuronas de esta estructura cerebral (Krause et al., 2010) así como la activación de las fibras glutamatérgicas que allí proyectan (Prado et al., 2016) detienen inmediatamente el consumo de sacarosa. Por último, una importante proporción de las neuronas del NAcSh monitorean el consumo de alimentos líquidos aumentando su actividad (~ 13 %, que en este estudio llamamos neuronas Activas con el lengüeteo; ver Fig. 2A) o inhibiéndola (~ 30 %, neuronas Inactivas; Fig. 2B) (Krause et al., 2010; O'Connor et al., 2015; Tellez et al., 2012). Esta evidencia en

su conjunto ha permitido especular que el papel del NAcSh en el consumo es el de permitirlo o denegarlo (Krause et al., 2010; O'Connor et al., 2015).

Más aún, estudios optogenéticos han descifrado cómo participan ciertos tipos celulares específicos del NAcSh en la alimentación. O'Connor et al., (2015) reportaron que las neuronas GABAérgicas espinosas medianas (*medium spiny neurons*, MSNs) que expresan el receptor de dopamina D1 (MSND1+) son principalmente las neuronas que se Inactivan durante el lengüeteo, mientras que las neuronas que expresan el receptor de dopamina D2 son las neuronas Activas (Fig. 2). Además, mostraron que el silenciamiento optogenético de las neuronas MSND1+ prevenía la interrupción del lengüeteo evocada por un estímulo auditivo distractor. Asimismo, la activación de las mismas neuronas detenía abruptamente el lengüeteo. Estos hallazgos sugieren que el NAcSh juega un papel "centinela" de la alimentación y que mediante la integración de estímulos auditivos puede autorizar el consumo. Sin embargo, no se ha explorado totalmente la interacción entre las pistas auditivas, el consumo y la palatabilidad de la sacarosa en el NAcSh.

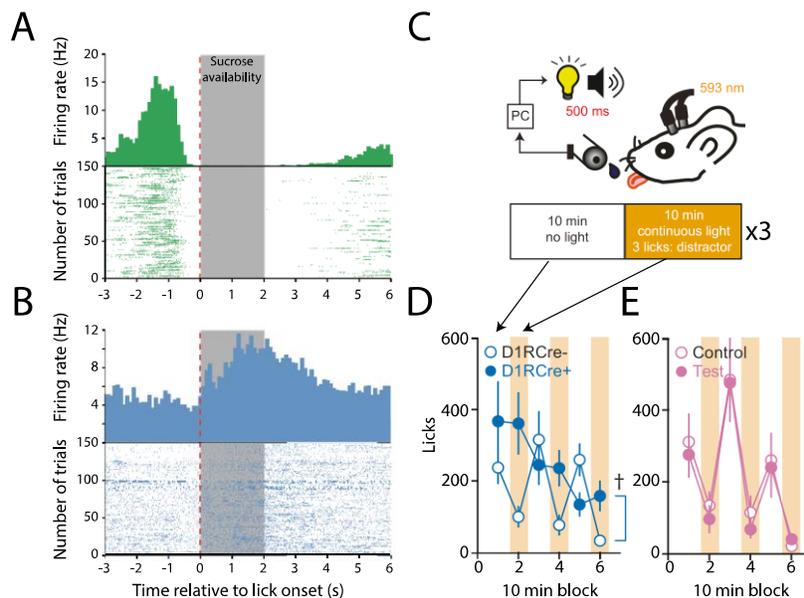


Figura 2. Las neuronas Activas e Inactivas con el lengüeteo son tipos celulares diferentes y juegan un rol distinto en la alimentación.

A-B. Ejemplos de respuestas neuronales, una que se Activa (panel A) y otra que se Inactiva (B) durante el consumo de sacarosa. La disponibilidad de este estímulo estaba limitada al periodo que cubre la sombra gris y el tiempo es relativo al primer lengüeteo recompensado (líneas rojas punteadas). Las modulaciones neuronales se extendieron más allá de dicho periodo porque los animales tienden a seguir lengüeteando. Gráficas tomadas de Krause et al., (2010). **C.** Esquema del diseño experimental usado por O'connor et al., (2015). En este experimento los ratones transgénicos bebían sacarosa por un bebedero. Los sujetos expresaban la bomba de protones sensible a luz naranja eArch-3.0 exclusivamente en las MSNs del NAcSh que expresan el receptor de dopamina D1 o en las que presentan el receptor D2. La sesión experimental fue dividida en 6 bloques de 10 min, durante los cuales se turnaban la condición control de consumo de sacarosa (bloque blanco) y la condición donde un sonido distractor interrumpía el consumo cada vez que este iniciaba (bloque amarillo), lo que estaba acompañado de foto-inhibición en el NAcSh. **D-E.** Consumo de sacarosa durante el experimento expuesto en C. El silenciamiento optogenético de las MSNs que expresan D1 (panel D), pero no el silenciamiento de las que expresan el receptor D2 (E), previno la interrupción de la ingesta de sacarosa por la presentación de un estímulo auditivo alarmante. Gráficas en los paneles C-D fueron tomadas de O'connor et al., (2015).

Teorías actuales sobre la codificación del NAcSh de la palatabilidad y recompensa

Como se ha mencionado anteriormente, no existe consenso sobre cómo las neuronas del NAcSh participan en la codificación de la palatabilidad y la recompensa de la sacarosa. A este respecto, usando tareas conductuales diferentes, dos estudios han propuesto mecanismos distintos de codificación de la recompensa/palatabilidad de la sacarosa por parte del NAcSh. Roitman et al., (2005) encontraron con una tarea de condicionamiento pavloviano (Fig. 3A) que las neuronas del NAcSh respondían innatamente de manera opuesta a estímulos gustativos recompensantes como la sacarosa o aversivos como la quinina (Fig. 3B). Específicamente, este grupo de investigación reportó que las neuronas del NAcSh se inhibían cuando la sacarosa se infundía en el interior de la boca de los roedores (por cánulas intra-orales) y se activaban cuando era infundida la quinina (Fig. 3B).

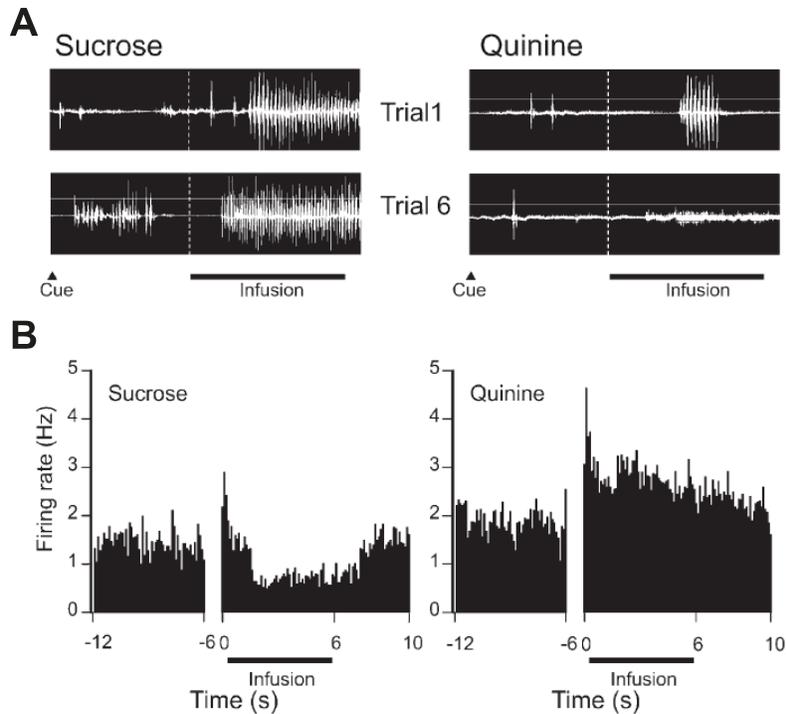


Figura 3. Roitman et al. (2005) postularon que las neuronas del NAcsh se inhiben o activan ante estímulos recompensantes o aversivos, respectivamente.

A. Actividad electromiográfica de la apertura de la cavidad oral (músculo digástrico anterior) relativa al inicio de las infusiones orales de sacarosa (izquierda) o quinina (derecha), las cuales eran anticipadas por un estímulo condicionado auditivo (flechas). Después de seis ensayos el condicionamiento pavloviano fue establecido como lo demuestran las respuestas motoras diferentes que evocaron los estímulos gustativos. **B.** Ejemplo representativo de una respuesta neuronal ante la infusión de los dos estímulos gustativos. Se puede apreciar que la sacarosa suprimió la actividad neuronal (raster a la izquierda) y la quinina la aumentó (derecha). Figuras tomadas de Roitman et al., 2005.

En contraste, Taha y Fields (2005) emplearon una tarea donde las ratas lengüeteaban para recibir tres concentraciones de sacarosa (0, 3 y 10 %; ver Fig. 4) y propusieron el escenario opuesto al estipulado por Roitman et al (2005). Esto es, que las neuronas del NAcSh que se activaban durante el consumo de sacarosa codificaban el valor recompensante de la sacarosa modulando su actividad de manera concentración-dependiente (Fig. 4B y C, paneles superiores). Además, señalaron que las neuronas que se inhibían durante el consumo no contribuían a

codificar el valor de recompensa pero sí controlaban el aspecto motor de la alimentación (Fig. 4B y C, paneles inferiores). En parte, el poco acuerdo sobre cómo las neuronas del NAcSh monitorean la palatabilidad de los sabores se debe a que no se ha evaluado este fenómeno usando una tarea conductual diseñada especialmente para medir palatabilidad (Davis, 1973; Smith et al., 1992; Young and Trafton, 1964).

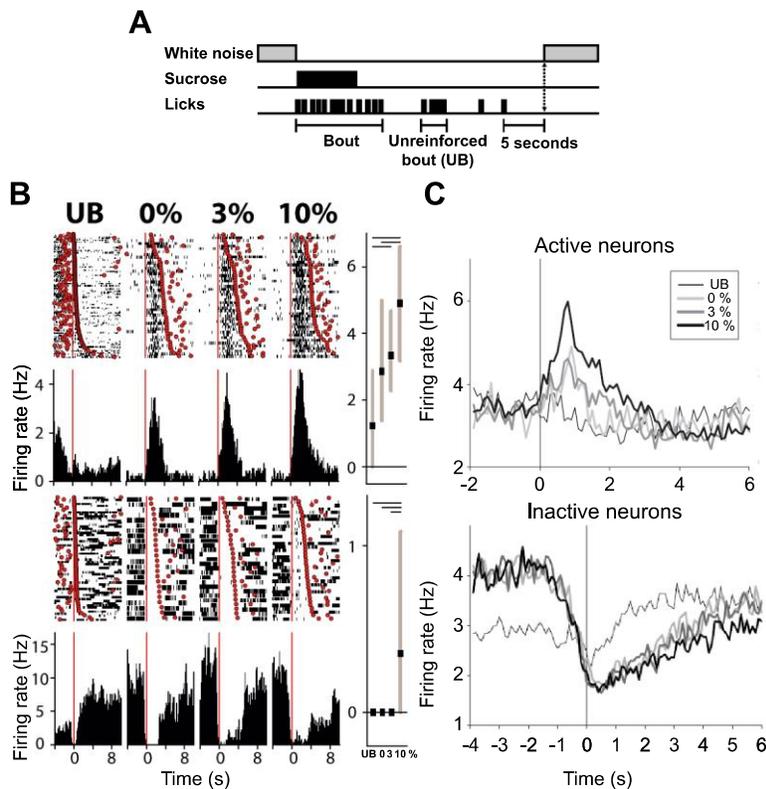


Figura 4. Taha y Fields (2005) propusieron que distintas poblaciones neuronales del NAcSh codifican la recompensa y la alimentación.

A. La tarea conductual usada en el estudio de Taha y Fields (2005). El primer lengüeteo de cada ensayo apagaba el ruido blanco, que era la señal de disponibilidad de una de las tres concentraciones de sacarosa (0, 3 o 10 %) durante un periodo de recompensa que era variable (1, 1.5 o 2 s). Las ráfagas de lengüeteos subsecuentes se denominaban UBs (*unreinforced bouts*) y los animales debían abstenerse de lengüetear por 5 s para iniciar un nuevo ensayo. **B.** Ejemplos de respuestas neuronales registradas en este estudio. Cada panel muestra una gráfica tipo raster y el histograma de la actividad neuronal ante los UBs o el consumo de las concentraciones de sacarosa. El tiempo es relativo al primer lengüeteo en cada

ráfaga y el último lengüeteo se muestra como círculos rojos. Además, a la derecha se muestra la frecuencia de disparo (mediana \pm un cuartil) en cada una de estas condiciones. La respuesta neuronal mostrada en los paneles superiores incrementó su frecuencia de disparo en función de la concentración de sacarosa. En contraste, la actividad neuronal de los paneles inferiores se inhibía durante el consumo de manera independiente a las condiciones evaluadas. **C.** Histogramas de la actividad poblacional de las neuronas que se activaron (arriba) y se inactivaron (abajo) en función de las condiciones evaluadas (tiempo relativo al primer lengüeteo como en B). La actividad de las neuronas Activas fue dependiente de la concentración, mientras que la supresión en la actividad de las neuronas Inactivas ocurrió de manera similar ante el consumo de todas las soluciones y más pronunciadamente que durante los UBs. Figuras tomadas y modificadas de Taha y Fields (2005).

Evaluación de la palatabilidad y su modulación por pistas ambientales

Como se ha señalado, la palatabilidad de un estímulo gustativo como la sacarosa es representado por el aumento de las respuestas oro-motoras y apetitivas como el aumento en el lengüeteo (Davis, 1973; Pfaffmann and Norgren, 1977; Spector et al., 1998). Partiendo de este hecho se han establecido dos maneras de medir directamente la palatabilidad. La primera es el análisis de la microestructura del lengüeteo (Spector et al., 1998), que consiste en permitir a los roedores beber libremente una solución en un bebedero. De manera natural, los roedores emiten lengüeteos a una frecuencia constante (6-7 Hz) que se agrupan en ráfagas. Cuando la latencia entre un lengüeteo y el siguiente es ≥ 0.5 s, se considera que ha terminado una ráfaga y ha comenzado otra. Así, el número y tamaño de las ráfagas de lengüeteos que el sujeto emite durante una sesión experimental se usa para medir la palatabilidad del estímulo gustativo, pues a menor número de ráfagas y mayor su tamaño la palatabilidad del estímulo es mayor (Spector et al., 1998). Sin embargo, esta aproximación permite evaluar sólo un estímulo gustativo a la vez, lo cual no es conveniente para los estudios de electrofisiología in-vivo, en donde, para poder comparar las respuestas neuronales con suficiente poder estadístico, es necesario registrar la actividad neuronal ante presentaciones repetidas de cada estímulo.

Por otro lado, la tarea de acceso breve (Smith et al., 1992, 1992; Young and Trafton, 1964), también se ha empleado para medir la palatabilidad. Cada ensayo de esta tarea consiste en dar acceso al sujeto a una solución, aleatoriamente elegida de una batería de sabores de interés, por un periodo breve de tiempo (5-30 s). Así, la palatabilidad de los estímulos gustativos se mide por el número de lengüeteos (o la tasa de lengüeteos) que el sujeto emitió durante los periodos en los que estaban disponibles las soluciones sápidas. Esta tarea tiene la ventaja de poder evaluar en una misma sesión las respuestas neuronales cuando los sujetos experimentaron los diferentes estímulos. Además, los periodos cortos de acceso limitan el efecto que podría tener la saciedad en la palatabilidad (Davis, 1973). En conclusión, la tarea de acceso breve es una herramienta ideal para medir la actividad del NAcSh y relacionarla con la palatabilidad de la sacarosa. Más aún, esta tarea conductual también puede ser de utilidad para estudiar el efecto de pistas auditivas en la palatabilidad, así como su correlato neuronal en el NAcSh.

Aunque no se ha explorado directamente el efecto de pistas ambientales en la palatabilidad de la sacarosa, ni su correlato en el NAcSh, sí existe evidencia que muestra que las pistas ambientales pueden modificar los patrones de alimentación y el valor hedónico de un estímulo gustativo. Específicamente, se ha demostrado en ratas que una pista auditiva que previamente se ha asociado al inicio de una comida, puede evocar un episodio de alimentación, aun cuando los sujetos se encuentran saciados (Weingarten, 1984). En ratas también, se ha mostrado que un estímulo auditivo, que previamente señalaba la infusión intra-oral de sacarosa, puede hacer que la infusión de agua provoque más expresiones faciales afectivas que las que produce el agua sola (Delamater et al., 1986). Extendiendo este fenómeno en humanos, Nitschke et al., hallaron que cuando un estímulo gustativo desagradable es precedido por una pista visual falsa, que originalmente señala la liberación de un estímulo no tan aversivo, provoca que la valoración que los sujetos hacen sobre el sabor sea menos negativa que la valoración del mismo sabor pero antecedido por la pista visual que lo predice acertadamente (Nitschke et al., 2006).

Más aún, en la vida cotidiana podemos observar que la atmosfera de un restaurante puede influenciar la percepción de los sabores así como la expectativa sobre el origen étnico de un platillo (Spence, 2015). Todo aunado soporta la hipótesis de que las pistas ambientales pueden modificar el valor hedónico de los alimentos, así como su codificación en el cerebro (Livneh et al., 2017; Nitschke et al., 2006). Es por ello, que es crucial investigar cómo ocurre la integración de la palatabilidad y las pistas ambientales que la modifican en una región tan relevante para la alimentación como el NAcSh. Una vez más, para alcanzar esta meta debe usarse una tarea conductual apropiada, como lo es la tarea de acceso breve a sacarosa.

2 JUSTIFICACIÓN

Una de las principales razones por las que se abusa del consumo de la sacarosa es la experiencia placentera que evoca su intenso sabor dulce. Se ha identificado que el creciente sobreconsumo de este endulzante es uno de los factores clave que explican la epidemia de obesidad que México y el mundo enfrentan. Sin embargo, todavía se conoce poco sobre cómo operan los circuitos cerebrales que codifican la palatabilidad de la sacarosa, lo que puede ser de gran utilidad para combatir dicho padecimiento de la alimentación.

Aunque ya se ha establecido que el NAcSh juega un papel crucial en la codificación de la palatabilidad, al día de hoy no existe consenso sobre cómo esta región cerebral participa en la ingesta y la palatabilidad del azúcar. Más aún, el estudio de esta estructura límbica se hace más necesario cuando se toma en cuenta que sus neuronas pueden integrar información auditiva para autorizar (o detener) la ingesta de sacarosa. Es así que se debe esclarecer como el NAcSh codifica la palatabilidad de la sacarosa y su potenciamiento por pistas auditivas. Por último, para alcanzar

esta meta es necesario usar una tarea conductual apropiada para estudiar la palatabilidad de la sacarosa, como la tarea de acceso breve.

3 HIPÓTESIS

La palatabilidad de la sacarosa puede ser potenciada por pistas auditivas exteroceptivas que señalen cuando inicia y termina el periodo donde la sacarosa estará disponible.

Las neuronas del NAcSh pueden codificar la palatabilidad de la sacarosa y su concentración. Además, su actividad puede monitorear las pistas auditivas que guían la ingesta de azúcar. Por último, se puede hallar el correlato neuronal del potenciamiento de la palatabilidad por pistas auditivas en el NAcSh.

4 OBJETIVOS

Como primer objetivo general nos propusimos establecer cómo es modulada la conducta de ingesta de la sacarosa y su palatabilidad por pistas ambientales. Para concretar esta meta delineamos los siguientes objetivos particulares:

- Diseñar una estrategia conductual que nos permita evaluar el efecto de pistas auditivas exteroceptivas en la palatabilidad de la sacarosa.
- Caracterizar conductualmente el efecto de pistas auditivas exteroceptivas en la palatabilidad de la sacarosa.

El segundo objetivo general fue el de entender cómo interaccionan en el NAcSh la codificación de la palatabilidad y de las pistas ambientales que la modulan, así como

determinar de qué manera el NAcSh usa esta información para dirigir la conducta de ingesta. Esta meta se desglosó en los siguientes objetivos particulares:

- En la tarea conductual establecida, encontrar el código empleado por las neuronas del NAcSh para monitorear la palatabilidad de la sacarosa y su concentración.
- Hallar en el NAcSh el correlato neuronal del efecto de pistas auditivas exteroceptivas en la palatabilidad de la sacarosa.
- Determinar cómo interactúan las neuronas del NAcSh que acarrean información sobre la palatabilidad/concentración de la sacarosa y sobre los estímulos ambientales para dirigir la alimentación.

5 METODOLOGÍA

5.1 Sujetos

Se usaron treinta ratas ingenuas de la cepa Sprague-Dawley que al inicio del experimento pesaban entre 300-350 g. Los sujetos fueron sometidos a una cirugía de implantación de electrodos (ver abajo) y, después de un periodo de recuperación de 7 días el periodo de experimentación (de 13 días, ver abajo) comenzó. Durante todo el tiempo los sujetos fueron alojados en cajas-hogar individuales y mantenidos a una temperatura ambiental de $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Además, el ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas al que los sujetos estaban expuestos iniciaba su fase luminosa a partir de las 7:00 h. Las sesiones experimentales que duraban 55 min ocurrían una vez al día y tomaron lugar a la misma hora para cada animal, siempre entre las 17:00 y las 19:00 h. Durante los 13 días de experimentación a los sujetos se les impuso un protocolo de restricción de agua. En él, los sujetos eran privados de agua por 22 h diarias después de las cuales las sesiones experimentales ocurrían. Inmediatamente después de cada sesión experimental a los sujetos se les daba acceso a agua por 1:05 h en sus cajas-hogar. Este procedimiento de restricción de agua en ratas es necesario para mantener altos niveles de motivación para tareas

de condicionamiento operante (Hughes et al., 1994) y no afecta la salud de los animales (Rowland, 2007). Todo el tiempo los animales tuvieron acceso a alimento chow (LabDiet 5008) en sus cajas-hogar.

5.2 Cirugía de implantación de electrodos

Los sujetos fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de un coctel de ketamina (90 mg/Kg)/xylacina (8 mg/Kg) y una vez anestesiados eran montados en un sistema de fijación estereotáxico para roedores. Para la implantación de electrodos se realizaba una craneotomía por la cual eran insertados en el cerebro un arreglo de 16 electrodos (construido en nuestro laboratorio) en las siguientes coordenadas relativas a bregma: eje antero-posterior: +1.4 mm, eje medio-lateral: -1 mm y, eje dorso-ventral: -7.5 mm (Tellez et al., 2012). El arreglo era fijado al cráneo con cemento de uso dental. Por tres días a partir del día de cirugía los sujetos recibieron inyecciones diarias de enrofloxacin (45 mg/Kg). El periodo de recuperación del procedimiento quirúrgico fue de siete días durante los cuales la salud de los sujetos estuvo bajo monitoreo. Estos procedimientos contaron con la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV.

5.3 Histología

Para verificar la posición de los electrodos durante el registro, al final del periodo de experimentación los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (150 mg/Kg) y perfundidos con PBS y paraformaldehído. Su cerebro fue extraído y cortado en secciones de 50 μ M. Las rebanadas obtenidas fueron sometidas a tinción mediante el método de Nissl y fijadas. Finalmente, la verificación se hizo con ayuda de un microscopio de luz clara. La Figura 5 muestra la ubicación representativa de un implante de electrodo en el NAcSh.

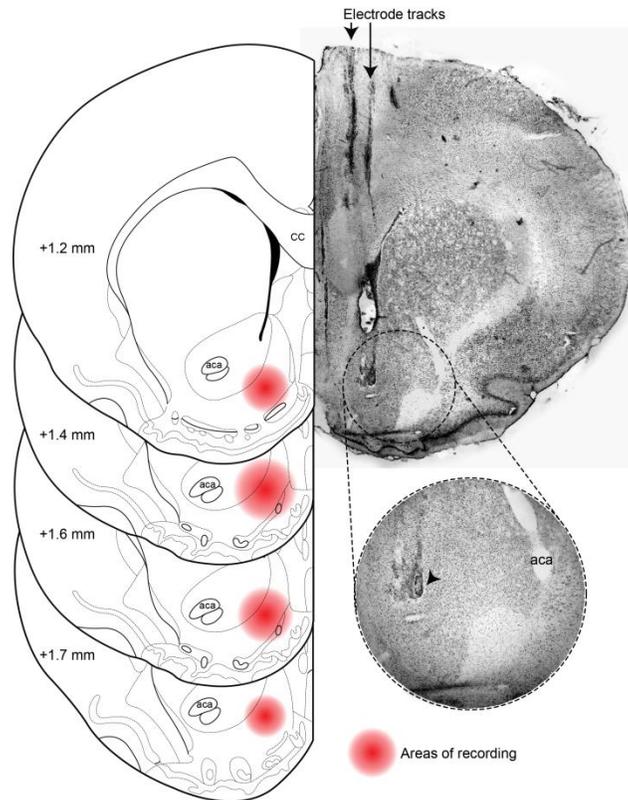


Figura 5. Localización representativa de los sitios de registro.

Esquemas (izq.; tomadas de (Paxinos and Watson, 1997)) de secciones coronales del cerebro de rata donde se resalta en rojo las áreas aproximadas de registro de todos los sujetos con base a las histologías correspondientes. A la derecha se muestra una fotografía de un ejemplo representativo de una rebanada coronal del cerebro de una rata (~1.2 mm AP desde bregma) en la que se puede apreciar el trazo de dos electrodos (arriba) y un sitio de registro (ver magnificación abajo) en el NAcSh. CC, cuerpo calloso; aca, comisura anterior.

5.4 Materiales y montaje experimental

5.4.1 Estímulos gustativos

Los estímulos gustativos consistieron en soluciones de sacarosa grado reactivo (Sigma-Aldrich México) disuelta en agua bi-distilada y agua bi-distilada sola. Nuestra batería de estímulos gustativos consistió en agua y cuatro concentraciones de sacarosa separadas semi-logarítmicamente: 3, 5.8, 10.7 y 20 g / vol. % (0.087,

0.168, 0.31, 0.58 M, respectivamente). Todas ellas fueron preparadas diariamente y fueron usadas a temperatura ambiente.

5.4.2 Caja conductual y estímulos auditivos

Los sujetos fueron entrenados en una caja conductual (Fig. 6A) de acrílico contenida dentro de un gabinete cerrado, ventilado y aislado del sonido ambiental (Med Associates). En uno de los frentes de la caja conductual se encontraban un puerto en forma de "V" en el cual era colocado el bebedero que dispensaba los estímulos gustativos. Los sujetos siempre tenían acceso a dicho bebedero, pero la liberación de los estímulos gustativos estaba bajo el control de la tarea conductual. Un haz infrarrojo (Med Associates) estaba dispuesto en este puerto de tal manera que pudiera ser cortado por cada lengüeteo para registrarlo. Arriba de este puerto se encontraba un generador de sonido tipo "click" y el panel opuesto se encontraba una bocina que emitía ruido blanco (a un nivel de presión sonora de 80 dB). Una luz iluminaba el interior de la caja durante las sesiones experimentales. El registro de los lengüeteos, el encendido de los dispositivos de audio y las válvulas solenoides que liberaban los fluidos (ver abajo) eran controlados de manera computarizada a través de una interfaz de Med Associates.

5.4.3 Sistema de liberación de fluidos

Las líneas que dispensaban el agua y las cuatro soluciones de sacarosa eran independientes, de manera que los estímulos gustativos no se mezclaban y eran liberados directamente en la lengua de las ratas a través del bebedero (Fig. 6A). Éste constaba de cinco agujas romas de 20 gauges dispuestas en racimo y unidas con acrílico dental sin espacios muertos. Cada aguja estaba conectada, a través de tubería de silicón, a una válvula solenoide cuya apertura permitía el flujo de los fluidos en pulsos de 10 ms. Para garantizar que las gotas obtenidas fueran siempre de 10 μ L, cada línea contaba con presión de aire positiva controlada independientemente por manómetros que eran calibrados antes de cada sesión

experimental. Las líneas eran llenadas con una solución diferente cada día, para controlar por las diferencias entre los sonidos de cada válvula.

5.5 Tareas de Acceso Breve a Sacarosa

Para esta investigación se emplearon tres variantes del paradigma conductual conocido como tarea de acceso breve (Davis, 1973; Smith et al., 1992; Young and Trafton, 1964) y en las tres variantes se usaron como estímulos gustativos las cuatro soluciones de sacarosa (3, 5.8, 10.7 y 20 %) y agua bi-destilada (que aquí nos referiremos como solución de 0 % de sacarosa). La Figura 6B. Muestra la estructura de los ensayos de estas variantes, las cuales llamamos Gustativa, Start y Start/Stop. En las tres tareas la estructura de cada ensayo era idéntica y contaba con los siguientes periodos: Iniciación, Recompensa, Lengüeteos secos y No lengüeteos. En cada ensayo de la variante Gustativa el sujeto debía lengüetear el bebedero, lo que iniciaba con el primer lengüeteo el periodo de Recompensa que siempre duraba 5 s y durante el cual cada lengüeteo dispensaba una gota de una de las soluciones (elegida semi-aleatoriamente en cada ensayo). Al inicio y término del periodo de Recompensa le llamamos RS y RE (*Reward Start* y *Reward End*, respectivamente; ver Fig. 6B). Al periodo de Recompensa le seguía el periodo de Lengüeteos secos. En él, se suspendía la liberación de líquido sin importar que el sujeto continuara lengüeteando. Para iniciar un nuevo ensayo (y disponer nuevamente de líquido) el sujeto debía dejar de lengüetear por un lapso programado aleatoriamente de 1-3 s (periodo de No lengüeteos). Para desalentar el lengüeteo durante este periodo, cada nuevo lengüeteo que ocurría reiniciaba el tiempo de espera nuevamente por 1-3 s. El sujeto podía lengüetear libremente durante el periodo de Recompensa, por lo que podía producir una sola ráfaga de lengüeteos continuos (con intervalos menores a 0.5 s) que abarcara la totalidad del periodo. Los ensayos en los que esto se presentaba fueron denominados "Completos". En cambio, si el sujeto pausaba su lengüeteo una o más veces por más de 0.5 s desarrollando una o más ráfagas pequeñas, el ensayo se denominaba "Incompleto".

Para evaluar el impacto de pistas auditivas sobre la palatabilidad de la sacarosa, nosotros diseñamos dos variantes de la tarea de acceso breve adicionales a la variante Gustativa. En ellas, la estructura y las condiciones de cada ensayo eran idénticas a las descritas en la tarea Gustativa, excepto que algunos estímulos auditivos fueron agregados. En la variante Start un sonido tipo click era emitido al inicio de cada ensayo (al empezar el periodo de Iniciación) anunciando que la liberación de líquido estaba disponible nuevamente. Este estímulo fue llamado Pista Start. En la tarea Start/Stop la misma Pista Start era presentada y, adicionalmente, una Pista Stop (ruido blanco) era presentada encendiéndose desde el RE hasta el término del periodo de No lengüeteos.

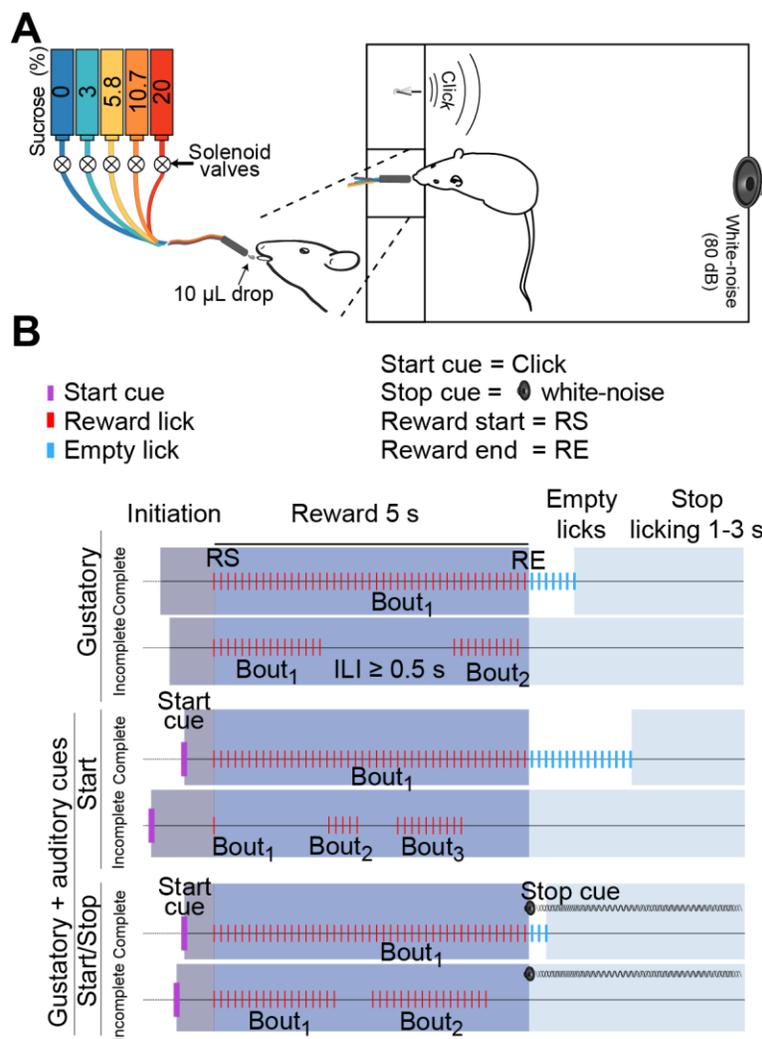


Figura 6. Montaje experimental y las tres variantes de la tarea de acceso breve usadas en este estudio.

A. Dibujo esquemático mostrando a una rata en una caja conductual con el sistema de liberación de fluidos. La caja estaba equipada con un bebedero que liberaba, en cada lengüeteo, una gota de 10 μL de agua o de alguna de las concentraciones de sacarosa (representadas por colores). Además se muestran dos instrumentos que producían las Pistas Start (click) y Stop (ruido blanco). **B.** Esquemas de la estructura de los ensayos en la variante Gustativa (arriba) y las dos variantes con estímulos auditivos (Start y Start/Stop) de la tarea de acceso breve a sacarosa. En los ensayos representados se muestran en colores los periodos conductuales en estas tareas: Iniciación (gris), Recompensa (azul), Lengüeteos secos (blanco) y No lengüeteos (cian). Nótese que los ensayos Completos se diferencian de los Incompletos al no contener Intervalos entre Lengüeteos (ILIs) ≥ 0.5 s dentro del periodo de Recompensa. En la variante Gustativa no hubo pistas auditivas, mientras que en la tarea Start se presenta la Pista Start (marcas moradas) y en la tarea Start/Stop se presentaban las Pistas Start y Stop (bocina).

5.6 Tratamiento de los datos conductuales

5.6.1 Medición de palatabilidad

En este trabajo la palatabilidad es definida como el incremento de las respuestas oromotoras que reflejan un incremento positivo en el valor hedónico al incrementar la concentración de sacarosa (Berridge and Grill, 1983; Spector et al., 1998). En específico dichas respuestas oromotoras incluyen incrementos en la tasa de lengüeteos e incrementos en el tamaño de las ráfagas de lengüeteos. Estas medidas fueron calculadas siempre en función de los ensayos que tuvieron la misma concentración de sacarosa (que en adelante llamaremos Tipos de Ensayo).

La tasa de lengüeteos fue analizada de dos maneras. En la primera (Fig. 8) los histogramas de tiempo peri-estímulo (*Peri-Stimulus Time Histograms*, PSTHs) de la tasa de lengüeteos fueron generados alrededor (tiempo = 0 s) de RS. Esto se hizo contemplando todos los ensayos, sólo los Completos o sólo los Incompletos. La segunda manera de abordar los datos fue generar funciones de distribución acumulada (CDFs; Fig. 8B y C) de la tasa de lengüeteo durante el periodo de Recompensa (número de lengüeteos/5 s) mediante el método de Kaplan-Meier. Esta última aproximación fue utilizada también para analizar el tamaño de las

ráfagas de lengüeteos (Fig. 8C). Las medianas y los rangos inter-cuartil fueron usados para describir las características de las distribuciones de la tasa de lengüeteos y el tamaño de las ráfagas.

Para corroborar el impacto que tuvieron las pistas auditivas en la palatabilidad de la sacarosa, siguiendo a Spector et al., (1998), analizamos la microestructura del lengüeteo (Tabla 2). Para ello, tomamos todas las ráfagas del lengüeteo ocurridas durante el periodo de Recompensa de cada ensayo (definidas como trenes de lengüeteos contiguos con intervalos entre lengüeteos < 0.5 s). El número de ráfagas y su duración fueron calculadas por Tipo de Ensayo y estos valores fueron tomados como medidas directas de palatabilidad de cada concentración de sacarosa (Davis and Smith, 1992). La duración de las ráfagas de lengüeteos fue estimada como el tiempo transcurrido entre el primer y último lengüeteo que las compone.

5.6.2 Comparaciones del desempeño entre las tareas

Para comparar las estrategias conductuales que las ratas emplearon para resolver cada tarea de acceso breve, por cada una de ellas, por sesión experimental y por Tipo de Ensayo el Índice de Ráfagas fue calculado (Fig. 9A). Este índice es el número de ensayos Completos entre el número total de ensayos en la sesión (Completos+Incompletos).

Para comparar la dinámica con la que los animales recibieron recompensas a lo largo de las sesiones, por tarea conductual se calculó la suma acumulativa de los lengüeteos recompensados (ocurridos en el periodo de Recompensa) a través de los 55 min. de cada sesión (Fig. 9B). Asimismo, a partir del conteo de los lengüeteos recompensados de obtuvo, por sesión, la ingesta calórica en función de las concentraciones de sacarosa (Fig. 9C).

Por último, la latencia con la que los animales detenían el lengüeteo en el periodo de Lengüeteos secos fue usada para comparar el tiempo en que los animales demoraban para detectar el fin de la recompensa y fue determinada solamente a partir de los ensayos Completos (Fig. 9D).

5.7 Registros electrofisiológicos

Los electrodos usados para el registro electrofisiológico fueron diseñados y contruidos en nuestro laboratorio. Constaban de 16 filamentos de tungsteno ordenados en arreglos de 4 x 4 que cubrían un área de registro de $\sim 750 \mu\text{M}^2$. Dichos filamentos estaban recubiertos por teflón excepto en su punta. Previo a su implantación en el cerebro, los electrodos eran sometidos a un tratamiento de electrodeposición de oro (nanoZ Impidance Tester, Plexon) con el objetivo de ajustar su impedancia (en una solución de Au^+ al 5 % en polietilenglicol) en un rango de 70-150 k Ω .

La actividad extracelular unitaria del NAcSh fue registrada durante las sesiones de entrenamiento en las tareas de acceso breve con la ayuda de un Procesador de Adquisición Multicanal (Plexon, Texas, USA). Para ello las señales de voltaje fueron muestradas a 40 kHz, filtradas (en un rango de 0.3-3 kHz) y digitalizadas a una resolución de 12 bits. Sólo la actividad neuronal unitaria con potenciales de acción con un tasa señal-ruido $> 3:1$ fue adquirida y procesada. Los potenciales de acción fueron aislados en línea usando umbrales en ventanas de tiempo-voltaje y un algoritmo de plantillas de formas basado en tres componentes principales (Gutierrez et al., 2010). Finalmente, con base en una selección post-registro (Offline Sorter 2.8.8 Plexon), se incluyeron para los análisis ulteriores la actividad neuronal que presentó estabilidad en la forma de los potenciales de acción durante toda la sesión de registro (Gutierrez et al., 2010).

5.8 Tratamiento de los datos electrofisiológicos

Para identificar a las neuronas del NAcSh con información acerca de la palatabilidad (entendida como diferencias en las respuestas oromotoras), o que se modularon con los incrementos en las concentraciones de sacarosa, desarrollamos un nuevo análisis que separa los componentes oromotor de la alimentación y el relacionado a la concentración de la sacarosa.

5.8.1 Neuronas relacionadas a la palatabilidad

Para identificar a las neuronas cuya frecuencia de disparo correlacionó con las respuestas oromotoras de cada Tipo de Ensayo, se empleó el siguiente análisis. Un Índice de Palatabilidad (Fig. 10) fue calculado por cada sesión experimental conformado por las medias de la tasa de lengüeteo durante el Periodo de recompensa (esto es número de lengüeteos/5 s) en función del Tipo de ensayo, usando todos los ensayos (Completo + Incompleto). Luego, por neurona, buscamos todas las ventanas de tiempo (en pasos de 0.5 s con duración mínima de 0.5 s) dentro del periodo de Recompensa en donde la tasa de disparo presentara un efecto significativo (Kruskal-Wallis, $\alpha = 0.05$) en al menos un Tipo de Ensayo. Además, en cada ventana temporal, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r , observaciones = ensayos, $\alpha = 0.05$) entre el Índice de Palatabilidad y la tasa de disparo. Para todas las ventanas que tuvieron efectos significativos en las pruebas estadísticas (específicamente para Kruskal-Wallis y correlación de Pearson) y por cada prueba estadística, se corrió una prueba de corrección de pruebas múltiples por permutación (Davison and Hinkley, 1997). Dicha corrección consistió en barajar los Tipos de Ensayo 20,000 veces (mediante la función de Matlab *shuffle*) y en cada iteración se repitieron las pruebas estadísticas con los ensayos barajados. De este procedimiento se obtenía un valor de p corregido siguiendo la fórmula $p = (k+1) / (n+1)$, donde k es el número de veces en las que, de una distribución permutada (de datos barajados), se obtenía un valor de p menor al valor de p de la estadística de los datos originales (no barajados) (North et al., 2002); y n es el número de iteraciones. Se conservaban sólo las ventanas de

tiempo con ambas p 's < 0.05 (del Kruskal-Wallis y la correlación de Pearson, corregidos). Nótese que si una respuesta neuronal fue significativa en dos pruebas estadísticas con un alfa de 0.05, el nivel de alfa final es $0.05 \times 0.05 = 0.0025$. Aquéllas neuronas que en alguna ventana temporal presentara efectos significativos en ambas pruebas (posterior a la corrección de los valores de p), fueron clasificadas como neuronas relacionadas a la palatabilidad. Finalmente, de estas ventanas de tiempo fue elegida aquélla con el valor de r de Pearson absoluto más grande, es decir, aquélla en donde la tasa de disparo correlacionó maximamente con el Índice de Palatabilidad (ver rectángulos verdes en Fig. 10A y B). Las respuestas neuronales que correlacionaron positiva o negativamente fueron clasificadas en Incrementos o Decrementos, respectivamente.

5.8.2 Neuronas relacionadas a la concentración de sacarosa

Para determinar si en ausencia de diferencias en respuestas oromotoras (entre ensayos Completos) las neuronas del NAcSh podrían discriminar las concentraciones de sacarosa, nosotros repetimos en mismo análisis usado para identificar a las neuronas relacionadas a la palatabilidad (Fig. 11). Sin embargo, esta vez, las concentraciones de sacarosa (en vez del Índice de Palatabilidad) fueron la variable independiente para la regresión lineal (r de Pearson) y sólo se empleó la actividad neuronal ocurrida durante los ensayos Completos. De esta manera garantizamos que los cambios en las respuestas neuronales en cada ventana temporal son producidos por incrementos monotónicos en la concentración de sacarosa y no por las diferencias en las respuestas oromotoras (Fig. 7). La misma prueba de permutación descrita arriba fue usada para corregir por pruebas múltiples y todas las neuronas con efectos significativos corregidos en ambas pruebas (Kruskal-Wallis y correlación de Pearson) fueron consideradas como neuronas relacionadas a la concentración. De igual manera, fue elegida la ventana significativa con la r de Pearson absoluta más grande. Las neuronas que correlacionaron con el Índice de Palatabilidad y con las concentraciones de sacarosa (la intersección entre ambas categorías fue de 20.9 % [69/330 neuronas

significativas en algún grupo]) fueron asignadas al grupo en cuya correlación de Pearson fue más grande. Las correlaciones positivas y negativas fueron consideradas como Incrementos y Decrementos.

5.8.3 Neuronas coherentes con el lengüeteo y su relación con las concentraciones de sacarosa

Partiendo de estudios donde se había reportado que existen neuronas en el NAcSh cuya actividad oscilaba en sincronía con el lengüeteo (Gutierrez et al., 2010), decidimos evaluar si la sincronía en la actividad de estas neuronas aumentaba o disminuía en función de la concentración de sacarosa (Fig. 12 y Tabla 3). Un análisis espectral *multitaper* se usó para determinar la coherencia entre el lengüeteo y la actividad neuronal durante el periodo de Recompensa, segmentando los PSTHs de ambas señales en porciones (Jarvis and Mitra, 2001). La coherencia (C) entre los lengüeteos y los trenes de espigas fue calculada empleando la siguiente fórmula: $C(f) = I_{xy}/(I_{xx} I_{yy})$, donde I_{xx} representa el espectro del lengüeteo, I_{yy} es el espectro de las espigas y I_{xy} es el cros-espectro de los espectros del lengüeteo y las espigas. Así, el valor de coherencia resultante está normalizado entre 0 y 1. Finalmente, f es la banda de frecuencias (4-7 Hz, que corresponde a la frecuencia del lengüeteo) en la que la coherencia es calculada. Además, la $C(f)$, los intervalos de confianza y el umbral de significancia ($\alpha = 0.05$) fueron obtenidos con el método de *jackknife* con una corrección de tamaño finito. Todo esto con base a los procedimientos desarrollados por Jarvis y Mitra (2001). Las neuronas fueron clasificadas como coherentes con el lengüeteo sólo si su intervalo de confianza inferior (95 %) estaba por arriba del umbral de significancia.

Mediante este análisis también era posible obtener la coherencia ensayo por ensayo durante el periodo de Recompensa. A partir de estos valores se determinó si existían diferencias significativas entre Tipos de Ensayos (Kruskal-Wallis, $\alpha = 0.05$) corrigiendo nuevamente con un procedimiento de corrección de pruebas múltiples

por permutación (ver sección 5.8.1). Las neuronas que presentaron diferencias significativas en al menos un Tipo de Ensayo fueron denominadas neuronas coherentes que codifican sabor. Luego, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r , $\alpha = 0.05$, corregido por la prueba de permutación) entre los valores de coherencia y los Tipos de Ensayo. Aquéllas neuronas coherentes que codifican sabor que exhibieron correlaciones significativas fueron clasificadas en Incrementos o Decrementos en función del signo de la r de Pearson.

5.8.4 Neuronas moduladas por el lengüeteo

De acuerdo a reportes anteriores (Krause et al., 2010; Tellez et al., 2012), las neuronas del NAcSh fueron caracterizadas en función de su perfil típico de modulación durante la conducta del lengüeteo (esto es, Activas o Inactivas; ver Fig. 13). Para ello usamos un ANOVA de una vía (con dos factores, $\alpha = 0.05$) para comparar la tasa de disparo de cada neurona durante una línea base (de -1.5 a -0.5 s, relativa a RS) contra la tasa de disparo ocurrida durante el periodo de Recompensa (de 0 a 5 s). La actividad ocurrida justo antes de iniciar el lengüeteo (de -0.5 a 0 s) fue excluida de la línea base para evitar contaminación producida por modulaciones anticipatorias al lengüeteo. Todos los Tipos de Ensayo fueron combinados para este análisis. Las neuronas que incrementaron su tasa de disparo después del RS fueron llamadas Activas y las neuronas que disminuyeron su actividad fueron llamadas Inactivas. Las neuronas sin modulaciones significativas fueron llamadas No moduladas (Tellez et al., 2012).

5.8.5 Activaciones/Inhibiciones fásicas ante pistas auditivas

Para identificar neuronas que acarrean información sobre las Pistas Start y Stop (Fig. 13C y D) empleamos el método estadístico denominado *cumsum* (Gutierrez et al., 2006). Con este procedimiento se identificaron a las ventanas temporales (de 50 ms de resolución) posteriores al momento del accionamiento de una pista auditiva (tiempo = 0 s) en las que la actividad neuronal incrementó

significativamente con respecto a una línea base (de -3 a 0 s). Dado que en la tarea Gustativa no se emitieron pistas auditivas y en la tarea Start no se emitió la Pista Stop, los PSTHs de la actividad neuronal en esas tareas fueron alineados al momento en que teóricamente hubieran ocurrido. Este análisis sólo se enfocó a las modulaciones positivas, por lo que, de las respuestas bifásicas se seleccionaron las que iniciaban con activaciones significativas.

Se exploraron las inhibiciones fásicas ocurridas después del RE (Fig. 15). Estas modulaciones se determinaron usando la estadística *cumsum*, buscando decrementos significativos en la actividad neuronal ocurrida después del RE (0 a 1.5 s después) comparada con dos líneas bases. La primera establecida antes del RS (-1.5 a 0.5 s) y la segunda antes del RE (-2 a 0 s). Las respuestas neuronales que cumplieran con los dos criterios eran clasificadas como inhibidas fásicamente. Esto garantizó que las inhibiciones ocurridas después del RE estuvieran por debajo de una línea base libre de actividad oromotora. Además, para descartar modulaciones tónicas, los decrementos significativos que se prolongaran por más de 1.5 s después del RE fueron ignorados.

5.8.6 Decodificación poblacional del NAcsh de la sacarosa

Para averiguar si la actividad poblacional de las neuronas del NAcSh eran capaces de decodificar los atributos de concentración + palatabilidad de la sacarosa, se empleó un algoritmo de decodificación poblacional (*Toolbox* de Matlab, versión 1.0 de *Neural Decoding Toolbox*, www.readout.info) (Meyers, 2013). En este instrumento analítico, todas las neuronas registradas en sesiones diferentes fueron agrupadas juntas como si se hubieran registrado al mismo tiempo (Fig. 14). De manera paralela, se cuantificó la información contenida en la actividad oromotora sobre la palatabilidad + concentración de la sacarosa, utilizando el mismo algoritmo de decodificación pero utilizando los PSTHs del lengüeteo. Las neuronas fueron asignadas de acuerdo a su pertenencia a los grupos que arriba se describieron a

diferentes poblaciones neuronales: Palatabilidad, Concentración, Coherentes, Activas, Inactivas, Moduladas (que agrupa a todas las que pertenecen a las poblaciones anteriores) y No Moduladas (que agrupa a todas las que no pertenecen a alguna de las poblaciones anteriores). Note que una neurona puede pertenecer a más de una población neuronal. Luego los PSTHs de la actividad de cada población y los del lengüeteo fueron calculados (de -1.5 a 8 s relativos a RS, en ventanas de 50 ms), normalizados a números "Z" (usando la función del toolbox `zscore_normalize_FP` de Matlab) y promediados en función de cada clase (Tipos de Ensayo). Después, un clasificador (función `max_correlation_ciefficient_CL`) fue entrenado con el promedio de subgrupos de ensayos de cada clase (templados) y probado mediante la correlación (de Pearson) de estos templados y la actividad en un ensayo con el que no entrenó el clasificador. La clase que obtenía la mayor correlación era elegida por el clasificador como un valor de decisión para predecir el Tipo de Ensayo. Para incrementar el poder estadístico, la clasificación fue repetida tres veces y, en cada una, un procedimiento de *cross-validation* fue llevado a cabo partiendo los ensayos k veces (siendo k el número de ensayos). Por tanto, el clasificador era entrenado con $k-1$ ensayos y probado con el ensayo restante. Este proceso era repetido hasta que todos los ensayos hayan sido probados. El desempeño obtenido (% de ensayos correctamente clasificados en cada ventana de tiempo) se muestra en las Figuras 14A y B. Note que los valores son medias \pm sem. Esto se deriva de ejecutar la decodificación descrita arriba varias veces, estableciendo en cada una un número diferente de particiones k de ensayos (de 10 a 17; que es el número mínimo de ensayos que podía ocurrir en todas las clases en cada población). Asimismo, esto nos permitió evaluar, por cada ventana de tiempo, si el desempeño fue significativamente diferente con respecto al nivel del azar (20 %, dado que existían cinco clases) usando la estadística de *t* de student de cola derecha.

Para determinar la contribución relativa de cada población neuronal en la decodificación obtenida de todas las neuronas Moduladas, se condujo, para cada tarea de acceso breve, un análisis que desarrollamos llamado "baja de una población" (Fig. 14C). Para ello, se repitió el cálculo del desempeño de la

decodificación de las neuronas Moduladas durante el periodo de Recompensa, pero ahora quitando una población funcional por vez (por ejemplo, Palatabilidad, Concentración, Coherentes, Activas o Inactivas). De esta manera se comparó el desempeño de todas las neuronas Moduladas con el desempeño que se obtenía quitando cada población. Como un procedimiento control que contempla el efecto que tiene la mera reducción en el número de neuronas que participan en la decodificación, se desarrolló una prueba de “baja de población aleatoria”. En ella, se repitió la decodificación quitando un número (n) aleatorio de neuronas. El tamaño de n se basó en el tamaño de la población funcional que, cuando se dio de baja, afectó más el desempeño (mejor población). Este procedimiento control se repitió 100 veces, dando de baja una población aleatoria nueva en cada iteración. Al final, el promedio del desempeño de decodificación de dichas repeticiones se comparó (Kruskal-Wallis, $\alpha = 0.05$) con el de la mejor población.

5.9 Análisis estadísticos

Todas las pruebas estadísticas se efectuaron estableciendo un nivel de alfa de 0.05. Las correlaciones de Pearson (r 's) que aparecen en las Figs. 8A y B fueron calculadas usando como variable independiente los Tipos de Ensayo y variables dependientes la tasa de lengüeteo durante el periodo de Recompensa (panel A) y la duración de la primera ráfaga de lengüeteos (panel B). Además, la tasa de lengüeteos y el tamaño de la primer ráfaga de lengüeteos, así como el Índice de Ráfagas (Fig. 9A) y la ingesta calórica (Fig. 9C) fueron comparadas usando ANOVAs de dos vías (con las tareas de acceso breve el Nivel 1 [con tres factores = tres tareas conductuales] y los Tipos de Ensayo en el Nivel 2 [con cinco factores = cinco Tipos de ensayo; excepto para la ingesta calórica donde sólo se excluyó a los ensayos de 0 %]), combinando sesiones y sujetos. Una prueba *pos hoc* de Fisher LSD fue aplicada posteriormente. Las comparaciones entre proporciones de ensayos con lengüeteos únicos fueron hechas mediante la prueba de la chi cuadrada (tablas de contingencia; Fig. 8C). Las latencias para detener los lengüeteos secos después de RE (Fig. 9D) se determinó con un ANOVA de una vía

(con las tareas de acceso breve como los tres factores). Para comparar las distribuciones de suma acumulativas de lengüeteos recompensados fue usada la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Fig. 9B).

Las proporciones de neuronas relacionadas a la Palatabilidad (Fig. 10), a la Concentración (Fig. 11), que fueron coherentes con el lengüeteo (Tabla 3) que fueron Inactivas o Activas con el lengüeteo (Fig. 13) y que respondieron fásicamente (activándose o inhibiéndose) ante las pistas auditivas (Figs. 13 y 15) fueron comparadas entre tareas de acceso breve usando la prueba de chi cuadrada (por tablas de contingencia). Los valores de coherencia de todas las neuronas coherentes con el lengüeteo (Tabla 3) fueron comparados entre tareas de acceso breve usando una ANOVA de una vía (con tres factores) seguido de una prueba *post hoc* (Fisher LSD). Las latencias con las que las modulaciones inhibitorias fásicas iniciaron después del RE fueron comparadas entre tareas conductuales usando un ANOVA de una vía (con tres factores; Fig. 15). La decodificación total de los Tipos de Ensayo por parte de las poblaciones neuronales (Fig. 14) fue comparado con un ANOVA de dos vías con las tareas conductuales en el Nivel 1 (con tres factores = tres tareas de acceso breve) y las poblaciones neuronales en el Nivel 2 (con cinco factores = Palatabilidad, Concentración, Coherentes, Activas e Inactivas). La decodificación obtenida a partir de las neuronas Moduladas y del lengüeteo (Fig. 14B) fue comparada, a través de las tareas de acceso breve, con un ANOVA de una vía (con tres factores). Por último, los desempeños de decodificación obtenidos a partir de las poblaciones neuronales surgidas del análisis de "dar de baja a una población" (Fig. 14C) fueron comparadas con ayuda de un Kruskal-Wallis.

6 RESULTADOS

6.1 Resultados conductuales

La conducta de las ratas fue estudiada en las tres variantes de la tarea de acceso breve a sacarosa (Fig. 6). Estas tareas conductuales fueron diseñadas para (1) determinar cómo una pista auditiva puede modular las respuestas de palatabilidad de la sacarosa, y (2) evaluar los efectos de reducir la incertidumbre temporal por la adición de pistas auditivas que anuncian el inicio y término del periodo de Recompensa.

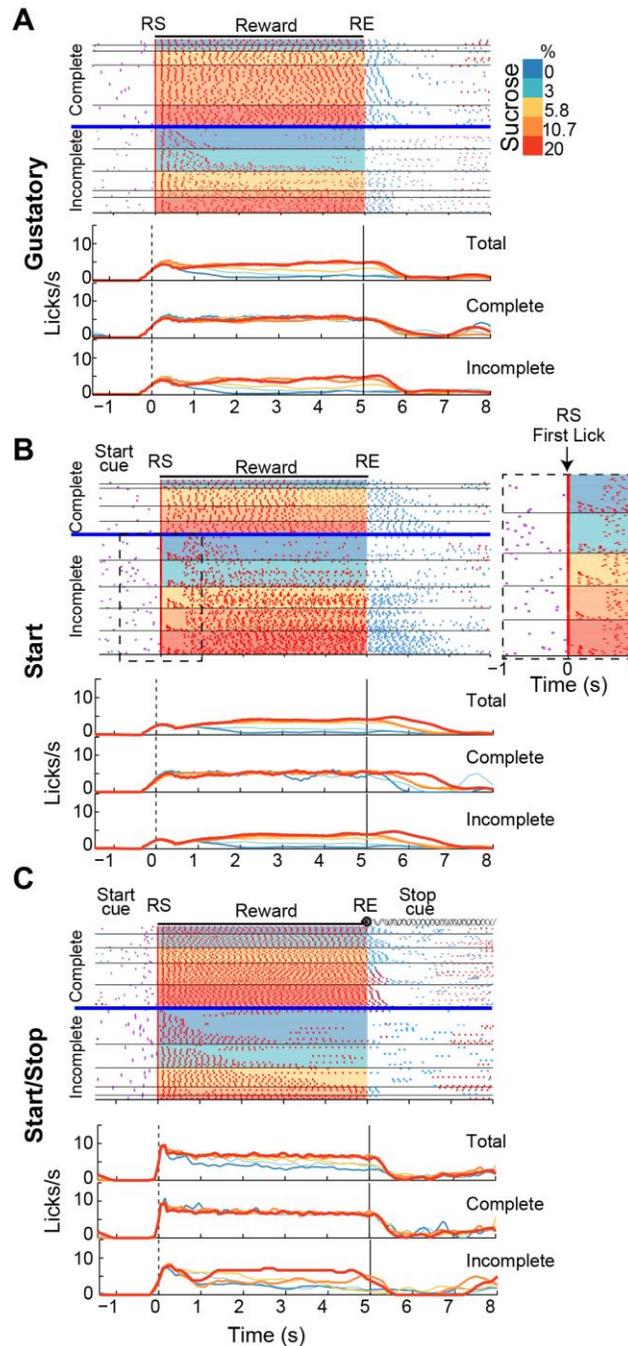


Figura 7. La tasa de lengüeteos refleja la palatabilidad de la sacarosa en los ensayos Incompletos.

A-C. Gráficas tipo raster (paneles superiores) y PSTHs (inferiores) alineados a RS (Tiempo = 0 s) de tres ratas diferentes que muestran la conducta de lengüeteo (marcas rojas en rasters) en las variantes Gustativa (A), Start (B) y Start/Stop (C) de la tarea de acceso breve a sacarosa. Los ensayos en los rasters fueron reordenados por la concentración de sacarosa recibida (representados por color en el periodo de Recompensa) y por el tamaño de la primera ráfaga de lengüeteos. Por arriba de la línea azul horizontal se encuentran los ensayos Completos y por abajo los Incompletos. El recuadro punteado en B es el acercamiento del inicio de los ensayos en la tarea Start y resalta que en numerosas ocasiones la rata inició el periodo de Recompensa con un solo lengüeteo. Los PSTHs superiores exponen la conducta de todos los ensayos, y los medios e inferiores son para los ensayos Completos e Incompletos, respectivamente.

6.1.1 Efectos de las pistas auditivas en las respuestas de palatabilidad

Las gráficas tipo raster (y los PSTHs de las tasas de lengüeteo) presentadas en la Figura 7 muestran, para cada prueba de acceso breve, ejemplos representativos de la conducta de tres ratas y en estos ejemplos se destacará el efecto de las pistas auditivas sobre el potenciamiento de la palatabilidad de sacarosa. Es notable de estas gráficas que, en los ensayos Completos, la tasa de lengüeteos no se modula por las concentraciones de sacarosa. En contraste, en los ensayos Incompletos la tasa de lengüeteos incrementa al aumentar las concentraciones de sacarosa. Es decir, las respuestas de palatabilidad se revelan sólo en los ensayos Incompletos.

Este efecto se mantiene al analizar los datos conductuales de todas las sesiones. Los PSTHs poblacionales de la Figura 8A muestran que en los ensayos Completos las tasas de lengüeteo no correlacionan con los Tipos de Ensayo (paneles medios de arriba a abajo; r 's de Pearson: $r = -0.06$ tarea Gustativa, $r = -0.12$ Start, y $r = 0.007$ Start/Stop). En contraste, en los ensayos Incompletos la tasa de lengüeteo incrementó de manera lineal por la concentración de sacarosa para las tres tareas de acceso breve (paneles inferiores; $r = 0.39$ tarea Gustativa, $r = 0.5$ Start y $r = 0.36$ Start/Stop; p 's < 0.001). Estos resultados demuestran que la palatabilidad se expresa en los ensayos Incompletos, pero no en lo Completos; y que la tasa de

lengüeteo correlacionó más con los Tipos de Ensayo en la tarea Start que en las otras dos pruebas de acceso breve.

Además, se observaron otras diferencias conductuales entre las tareas. Se puede apreciar en el raster de la tarea Start (Fig. 7B) que la rata inició el 61 % de los ensayos Incompletos con lengüeteos únicos (ver también la expansión a la derecha del área enmarcada por el rectángulo punteado) y después de una pausa variable (> 0.5 s) se enganchaba nuevamente con una segunda ráfaga más grande, especialmente en los ensayos con 20 % de sacarosa. La misma conducta fue observada a nivel poblacional. Los PSTHs de la tarea Start de la Figura 8A muestran que en el periodo de Recompensa la tasa de lengüeteos experimentó un incremento inicial seguido de un súbito descenso que corresponde a una pausa en el lengüeteo. Después de ello el lengüeteo volvió a aumentar de manera concentración dependiente. De las tres tareas conductuales, en la tarea Start es donde se observa el mayor decremento en la tasa de lengüeteo (ver flecha en PSTH de tarea Start en Fig. 8A). Estos datos sugieren que la Pista Start anticipatoria al periodo de Recompensa promovió que las ratas tomaran muestras de líquido con un lengüeteo para decidir si continuar consumiendo o abortar el ensayo, con base a la concentración de sacarosa.

Las pistas auditivas también produjeron diferencias en la conducta al final del periodo de Recompensa. Como se puede ver en la Figura 8A las ratas detuvieron el lengüeteo más rápido en la tarea Start/Stop al terminar el periodo de Recompensa, en comparación con las ratas de las otras tareas (ver flecha en PSTH de Start/Stop). Específicamente, las latencias para detener los lengüeteos secos fueron (en medianas (IQRs)) 0.9 s (1.06) en la tarea Gustativa, 1.12 s (0.98) en la tarea Start y 0.58 s (0.63) en la tarea Start/Stop. Estos datos muestran que los animales en la tarea Start/Stop aprendieron a usar la Pista Stop para detener el lengüeteo más rápido.

En conjunto estos datos muestran que los diferentes contextos producidos por las pistas auditivas tuvieron un impacto diferente en la conducta de ingesta.

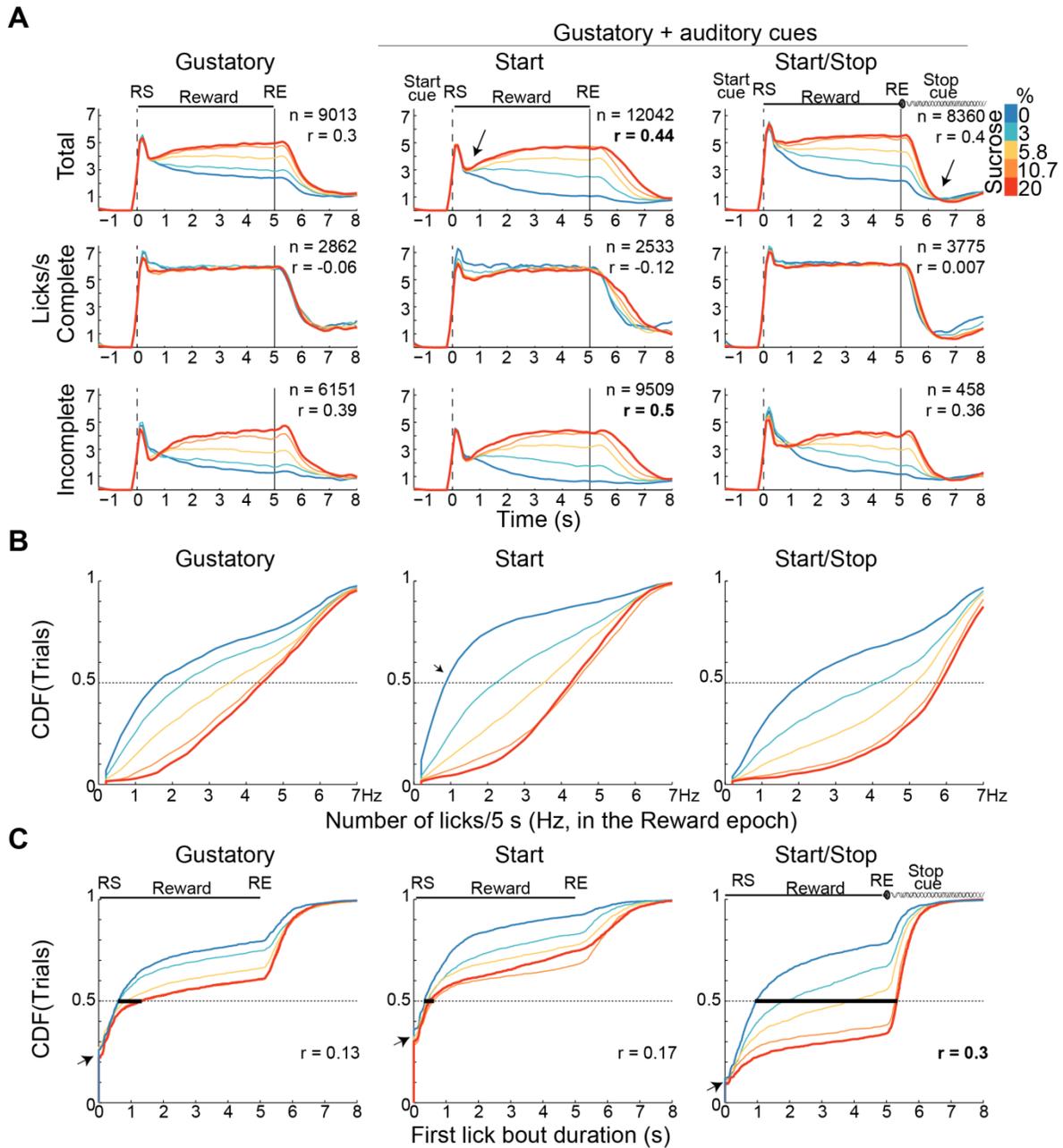


Figura 8. Las respuestas de palatabilidad a la sacarosa fueron moduladas por las pistas auditivas.

A. PSTHs poblacionales de la tasa de lengüeteos, alineados a RS (Tiempo = 0 s; líneas punteadas verticales), en función de la concentración. Se muestra esta conducta, de izquierda a derecha, para las tareas Gustativa, Start y Start/Stop y, de arriba a abajo, para todos los ensayos, para los Completos y para los Incompletos. Las *n*'s son el número de ensayos con los que se construyeron las gráficas (todos los sujetos y todas las sesiones). Las *r*'s (de Pearson) son la correlación entre las tasas de lengüeteo en el periodo de Recompensa y los Tipos de Ensayo. La flecha en Start señala la caída abrupta en el lengüeteo después de la cual la tasa de lengüeteo refleja la palatabilidad. La flecha en Start/Stop destaca que los animales detuvieron los lengüeteos secos rápidamente en esta prueba conductual. **B.** Funciones de distribución acumuladas (CDFs) de la tasa de lengüeteo en el periodo de Recompensa. La flecha en Start resalta que en esta tarea la mediana para 0 % fue más baja en comparación con las otras tareas. **C.** CDFs de la duración de la primera ráfaga de lengüeteos en las tres pruebas conductuales. Las líneas resaltadas horizontales al nivel de 0.5 en y recalcan cómo se separan las medianas entre los Tipos de Ensayo, siendo mayor esta diferencia en la tarea Start/Stop. Las flechas enfatizan la cantidad de ensayos con ráfagas de lengüeteo = 0 s (de un solo lengüeteo).

6.1.2 Potenciamiento de la palatabilidad por pistas auditivas

La palatabilidad fue comparada entre tareas mediante la tasa de lengüeteo durante los 5 s del periodo de Recompensa en función de los Tipos de Ensayo (Fig. 8B). A este respecto se encontró que, en todas las tareas la tasa de lengüeteo fue concentración dependiente (ANOVA de dos vías; $F_{(2,4)} = 1325$, $p < 0.0001$). Sin embargo, existieron diferencias entre tareas pues la tasa de lengüeteo total fue mayor en la tarea Start/Stop seguida de la Gustativa y estas dos fueron mayores en la tarea Start (p 's < 0.0001). Nótese que en la tarea Start la tasa de lengüeteo correlacionó más con los Tipos de Ensayo (panel A), indicando que la palatabilidad en esa tarea también se potenció por la pista de inicio. La baja tasa de lengüeteo total que se encontró en esa tarea puede ser explicada al notar que las distribuciones (CDFs en Fig. 8B) se sesgaron para los ensayos de 0 % pero no para los de 20 %. Específicamente, las medianas para 0 % de sacarosa fue de 1.6 y de 0.8 lengüeteos/5 s en las tareas Gustativa y Start, respectivamente, mientras que en los ensayos de 20 % las medianas fueron casi idénticas (4.3 y 4.4 lengüeteos/5 s, respectivamente). Estos resultados sugieren que la Pista Start facilitó el rechazo del agua, pero no modificó drásticamente la tasa de lengüeteo de concentraciones

más altas. Normalizando la tasa de lengüeteos a la ocurrida en los ensayos de agua (ver en Tabla 1 la tasa de lengüeteo de sacarosa/agua) se observa que la palatabilidad en la tarea Start también fue potenciada.

Tabla 1. La tasa de lengüeteo para las tres tareas de acceso breve en función de la concentración de sacarosa

	Sacarosa (%)				
	0	3	5.8	10.7	20
Todos					
Gustativa	2.65±0.05	3.1±0.05	3.7±0.05	4.24±0.04	4.44±0.04
Start	1.73±0.04	2.85±0.04	3.53±0.04	4.22±0.04	4.23±0.03
Start/Stop	3.01±0.06	3.94±0.06	4.63±0.05	5.35±0.04	5.56±0.04
Completos					
Gustativa	6.07±0.05	6.21±0.04	6.00±0.04	5.87±0.04	6.00±0.04
Start	6.14±0.05	5.92±0.04	5.72±0.04	5.79±0.03	5.67±0.03
Start/Stop	6.44±0.04	6.39±0.03	6.32±0.03	6.35±0.03	6.43±0.03
Incompletos					
Gustativa	1.75±0.04	2.04±0.04	2.51±0.04	3.17±0.04	3.43±0.04
Start	1.35±0.03	2.22±0.03	2.90±0.04	3.48±0.04	3.73±0.03
Start/Stop	2.07±0.04	2.75±0.05	3.29±0.06	3.75±0.07	3.92±0.07

	Tasa Sacarosa/Agua				
	0	3	5.8	10.7	20
Todos					
Gustatory	1±0	1.19±0.03	1.47±0.04	1.74±0.07	1.83±0.08
Start	1±0	1.81±0.06 *	2.32±0.1 *	2.85±0.15*	2.83±0.13*
Start/Stop	1±0	1.44±0.04	1.71±0.05	1.99±0.08	2.07±0.08

Los valores son medias ± sem. Los datos en negrita significan $p < 0.05$, contra la tarea Gustativa. Todas las tasas de lengüeteo fueron estadísticamente diferentes contra 0 % a un nivel de alfa de 0.05. En los datos de la tasa Sacarosa/Agua, * indica $p < 0.05$, en comparación con la tarea Start/Stop

Por otro lado, el tamaño de la primera ráfaga de lengüeteos (Fig. 8C), que también fue tomada como una medida de palatabilidad (Spector et al., 1998), se vio más potenciada en la tarea Start/Stop, por sobre la tarea Gustativa y estas dos sobre la tarea Start (ANOVA de dos vías; efecto de tareas, $F_{(2,4)} = 686.5$; p 's < 0.001 ; efecto de Tipos de Ensayo, $F_{(2,4)} = 316.4$, $p < 0.0001$). Quizá, una forma más fácil de ver

este efecto es notar el distanciamiento más pronunciado entre las medianas de las distribuciones de 0 y 20 % de sacarosa (ver líneas negras gruesas en Fig. 8C) en la tarea Start/Stop en comparación con las otras tareas, lo que sugiere una mayor potenciación de la palatabilidad. Además, también fue la tarea Start/Stop aquella que presentó mayor correlación con los Tipos de Ensayo ($r = 0.13$, para la tarea Gustativa; $r = 0.17$, para Start; $r = 0.3$, para Start/Stop).

De la Figura 8C también se desprende la observación de que, en la tarea Gustativa, el 25 % de los ensayos comenzaron con ráfagas de 0 s (ver flecha), es decir, de un solo lengüeteo. Esta conducta fue más común en la tarea Start (31.5 %, flecha) y menos común en la tarea Start/Stop (11 %, flecha). Estas proporciones fueron estadísticamente diferentes contra la tarea Start/Stop (chi cuadrada; $\chi^2 = 4.09$, $p = 0.04$ contra la tarea Gustativa, y $\chi^2 = 8.16$, $p = 0.0043$ contra la tarea Start) pero no entre las tareas Gustativa y Start ($\chi^2 = 0.79$, $p = 0.37$). Estos datos sugieren nuevamente que la Pista Start promueve la conducta de muestrear el sabor con un solo lengüeteo y después de una pausa reanudar el consumo dependiendo de la concentración de sacarosa.

Por último, la palatabilidad fue medida directamente en función de los contextos conductuales. Para ello cuantificamos el número y duración de las ráfagas de lengüeteos durante el periodo de Recompensa (Tabla 2). Como era esperado, para las tres tareas conductuales la palatabilidad de la sacarosa se incrementó en función de su concentración. Sin embargo, existieron diferencias entre tareas. En comparación con la tarea Gustativa, en las tareas Start y Start/Stop las ratas hicieron ráfagas de más duración para las concentraciones más altas de sacarosa, siendo aún mayor en la tarea Start/Stop además de que el número de las ráfagas emitidas en esta prueba fue menor en comparación con las otras dos tareas. Dado que a menor el número de ráfagas y mayor su duración la palatabilidad de una solución es mayor (Spector et al., 1998), nuestros datos demuestran que la

palatabilidad de la sacarosa fue potenciada bajo la influencia de los estímulos auditivos Start y Stop, siendo más intenso este efecto en la tarea Start/Stop.

Tabla 2. Análisis de la microestructura del lengüeteo

Tipos de Ensayo	Gustativa		Start		Start/Stop	
	Número de ráfagas	Duración de las ráfagas (s)	Número de ráfagas	Duración de las ráfagas (s)	Número de ráfagas	Duración de las ráfagas (s)
0 %	1.98 (± 0.03)	1.23 (± 0.03)	1.8 (± 0.02)	0.82 (± 0.02)	1.52 (± 0.02)	1.63 (± 0.04)
3 %	2.23 (± 0.03)*	1.3 (± 0.03)	2.23 (± 0.02)*	1.23 (± 0.03)*	1.59 (± 0.02)*	2.13 (± 0.04)*
5.8 %	2.38 (± 0.04)*	1.53 (± 0.03)*	2.4 (± 0.03)*	1.55 (± 0.03)*	1.59 (± 0.02)*	2.61 (± 0.04)*
10.7 %	2.31 (± 0.04)*	1.88 (± 0.04)*	2.14 (± 0.02)*	2.13 (± 0.03)*	1.53 (± 0.02)	3.19 (± 0.05)*
20 %	2.27 (± 0.03)*	2.01 (± 0.04)*	2.27 (± 0.02)*	2.11 (± 0.03)*	1.51 (± 0.02)	3.34 (± 0.05)*

Los valores son medias (± sem). Los datos en negrita indican diferencia estadística contra la tarea Gustativa. * Indica diferencia estadística relativa al agua (0 %). El nivel de alfa siempre fue igual a 0.05.

En resumen, estos datos demuestran que las pistas exteroceptivas auditivas potencian la palatabilidad de la sacarosa pero de diferentes maneras. Mientras que en la tarea Start la detección y rechazo del agua mejoró, en la tarea Start/Stop se potenció la tasa de lengüeteo total y el alargamiento de las ráfagas de lengüeteos.

6.1.3 Estrategias conductuales en las tareas de acceso breve a sacarosa

Una vez que caracterizamos cómo la palatabilidad de la sacarosa se potenció por las pistas auditivas, decidimos explorar el impacto que tuvieron estos estímulos en el consumo total de recompensa y la ingesta calórica.

El Índice de ráfagas (Fig. 9A; Índice de ráfagas = #Completos / #Completos + #Incompletos) es la medida con la que los animales realizaron ensayos Completos y se calculó por Tipo de Ensayo y por tarea conductual. Se encontró que, comparado con la tarea Gustativa, la tarea Start/Stop promovió un Índice de ráfagas más grande y la tarea Start un Índice más pequeño (ANOVA de dos vías; efecto de tareas, $F_{(2,4)} = 132.4$; p 's < 0.001), lo que significa que las ratas en la tarea Start/Stop

completaban más ensayos . Como era esperado, el índice de ráfagas creció con la concentraciones de sacarosa (efecto de Tipos de Ensayo, $F_{(2,4)} = 92.3$, $p < 0.0001$), excepto en las soluciones de 10.7 y 20 % en las que no existieron diferencias estadísticas ($p = 0.28$). Estos resultados muestran que el lengüeteo fue promovido en la tarea Start/Stop generando más ensayos Completos, probablemente porque las Pistas Start y Stop redujeron la incertidumbre temporal sobre la duración del periodo de Recompensa.

En concordancia con lo anterior, también encontramos que los contextos conductuales influenciaron la ingesta calórica. La Figura 9B muestra que en la tarea Start/Stop la suma acumulativa de los lengüeteos recompensados incrementó más rápido conforme iba transcurriendo la sesión experimental, comparada con las sumas acumulativas de las otras dos pruebas de acceso breve. Además, al cabo de los 55 minutos de sesión, las ratas en la tarea Start/Stop habían emitido más lengüeteos recompensados comparados con las ratas en las tarea Gustativa y Start (Kolmogorov-Smirnov; $D = 0.23$, $p=0.083$, para Gustativa vs. Start; $D = 0.25$, $p=0.05$, para Gustativa vs. Start/Stop; $D = 0.41$, $p<0.0001$, para Start vs. Start/Stop). Asimismo, las calorías consumidas (Fig. 9C) fueron significativamente diferentes entre las tareas de acceso breve (ANOVA; $F_{(2,3)} = 72$, $p < 0.000$). A este respecto encontramos que en la tarea Start/Stop hubo más ingesta calórica que en las otras dos pruebas (p 's < 0.001) y en la tarea Start hubo menos (p 's < 0.001). Recapitulando, estos datos muestran que la ingesta calórica y las estrategias conductuales fueron dependientes de los contextos conductuales.

Por último, notamos que las pistas auditivas tuvieron impacto en otros aspectos de la alimentación. Específicamente, comparadas con las ratas de la tarea Gustativa, las ratas de la tarea Start/Stop detuvieron los lengüeteos secos (después del periodo de Recompensa) más rápido (ver Fig. 9D) y las de la tarea Start más lento (ANOVA de una vía; $F_{(2,291)} = 46.5$, $p < 0.0001$; $p = 0.002$, Gustativa vs. Start; $p <$

0.01, Gustativa vs. Start/Stop). Las latencias más cortas en la tarea Start/Stop también pueden apreciarse en los PSTHs de la Figura 8A (ver flecha en la columna derecha). Esos datos muestran que las estrategias conductuales se vieron afectadas por la incorporación de pistas auditivas que reducen la incertidumbre temporal.

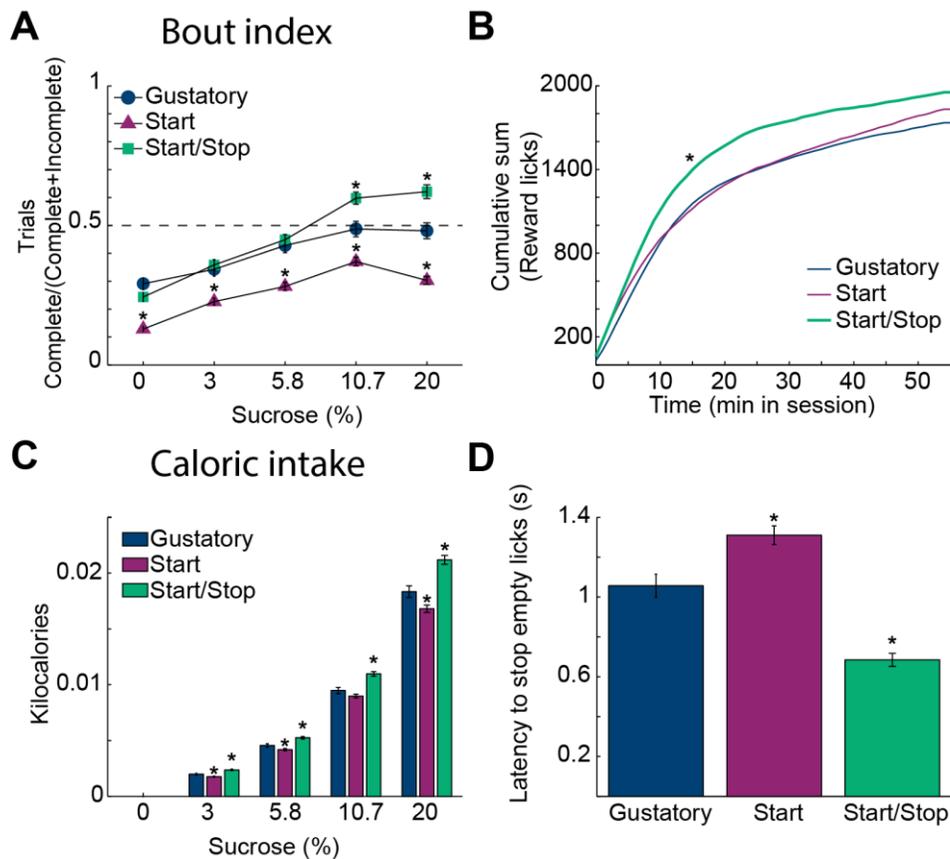


Figura 9. Las Pistas Start y Stop, en combinación, incrementan el Índice de ráfagas y la ingesta calórica.

A. Índice de ráfagas para las tres pruebas conductuales en función de la concentración de sacarosa. El orden encontrado fue Start/Stop (verde) > Gustativa (azul) > Start (morado), p 's < 0.001. **B.** La sumas acumuladas de los lengüeteos en el periodo de Recompensa a lo largo de los 55 min de la sesión experimental para cada tarea. En la tarea Start/Stop las ratas obtuvieron estadísticamente más recompensas que en las otras pruebas (p 's \leq 0.05). **C.** Histograma de la ingesta calórica promedio en función de la concentración de sacarosa para las tres tareas. En la tarea Start/Stop significativamente más calorías fueron obtenidas (p 's < 0.0001). **D.** Latencia para detener los lengüeteos en seco emitidos después de RE

para las tres pruebas conductuales. * indica siempre diferencias estadísticas contra la tarea Gustativa ($\alpha = 0.05$).

6.2 Resultados electrofisiológicos

En total, fueron registradas 421, 304 y 265 neuronas del NAcSh durante las tareas Gustativa, Start y Start/Stop, respectivamente. En este trabajo se caracterizaron cinco poblaciones neuronales que se modulaban durante el consumo de sacarosa. Los tres primeros grupos codificaron diferentes aspectos de los Tipos de Ensayo. El primer grupo son las neuronas relacionadas con la palatabilidad (Fig. 10), el segundo son las relacionadas con la concentración (Fig. 11) y el tercero son neuronas cuya sincronía con el lengüeteo incrementó con la concentración de sacarosa (Fig. 12). Los grupos cuarto y quinto fueron modulados por el lengüeteo positiva o negativamente (neuronas Activas o Inactivas, respectivamente; Fig. 13). Mientras que éstos dos últimos grupos son mutuamente excluyentes, sus neuronas pueden pertenecer a los grupos de Palatabilidad, Concentración y Coherentes.

6.3 Neuronas del NAcSh que monitorean las respuestas de palatabilidad de la sacarosa

Para saber si existen neuronas en el NAcSh que acarrean información sobre la palatabilidad de la sacarosa se desarrolló en este trabajo un análisis que identifica las mejores ventanas temporales en donde las respuestas neuronales correlacionaran con las respuestas de palatabilidad (lengüeteo) de la sacarosa (Fig. 10). Note que, la mejor ventana temporal no necesariamente tiene que ser el primer momento en que una neurona comienza a codificar la palatabilidad (el desarrollo temporal de la codificación de la palatabilidad se muestra en Fig. 14). En las Figuras 10A y 10B se muestran dos ejemplos representativos de respuestas neuronales que correlacionaron con la palatabilidad, una en forma de Incremento (Fig. 10A) y la otra como Decremento (Fig. 10B). La actividad neuronal mostrada en la Figura 10A comenzó a incrementar a manera de "rampa" desde 1 s antes de RS de manera similar en todos los Tipos de Ensayo. Luego de 0.3 s a partir de RS, se observa que

esta respuesta neuronal comienza a codificar la palatabilidad. No obstante, para esta neurona, la mejor ventana temporal para codificar la palatabilidad ocurrió en la ventana de 1-4 s ($r = 0.67$; ver rectángulo verde en el los PSTHs y panel inferior). Para el caso de la respuesta neuronal graficada en la Figura 10B, se observó una correlación negativa que comenzó a 1.2 s relativo a RS y se sostuvo durante el resto del periodo de Recompensa, pero la mejor ventana ocurrió en entre 2 y 3 s ($r = -0.65$). El porcentaje de neuronas que mostraron correlación con la palatabilidad de sacarosa, ya sea como Incrementos o Decrementos, es graficado en la Figura 10C. Entre las tareas Start y Start/Stop existieron diferencias significativas en el porcentaje total de neuronas relacionadas a la palatabilidad (chi cuadrada; $\chi^2 = 3.93$, $p = 0.047$). En cambio, ninguna otra comparación entre pruebas conductuales alcanzó significancia estadística ($\chi^2 = 2.12$, $p = 0.14$, para Gustativa vs. Start; y $\chi^2 = 0.56$, $p = 0.45$, para Gustativa vs. Start/Stop). Más interesante es el hecho de que, las respuestas poblacionales de todas las neuronas relacionadas a la palatabilidad de las tres tareas de acceso breve correlacionaron, ensayo por ensayo, con la palatabilidad (Fig. 10D; $r = 0.3$ para las neuronas que incrementan y $r = -0.35$, para las que decrementan; p 's < 0.01 ; a este respecto no existieron diferencias entre tareas conductuales). Estos datos indican que existe una población neuronal en el NAcSh que monitorea la palatabilidad de la sacarosa.

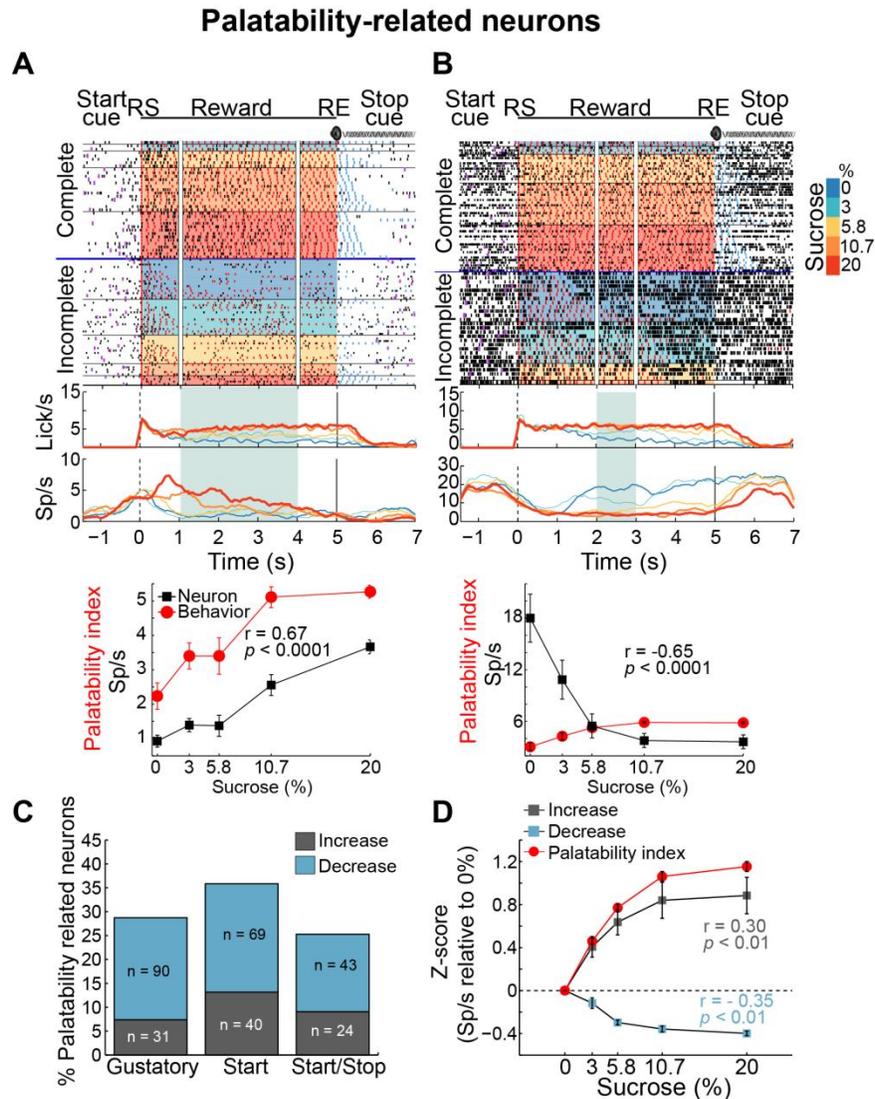


Figura 10. Neuronas en el NAcSh monitorean la palatabilidad oro-motora evocada por la sacarosa.

A. Gráfica tipo raster (arriba) que muestra una respuesta neuronal obtenida durante la tarea Start/Stop. Las convenciones son las mismas que en la Figura 7 y los potenciales de acción son las marcas negras. Abajo los PSTHs de la tasa de lengüeteo y los PSTHs de la tasa de disparo. La ventana temporal enmarcada por líneas blancas verticales en el raster y por el cuadro verde en los PSTHs es el momento en el que ocurrió la máxima correlación (de Pearson) entre la actividad neuronal y el Índice de Palatabilidad. El panel inferior muestra el Índice de Palatabilidad (en rojo) y las medias (\pm sem) de la actividad neuronal durante la ventana temporal con mejor correlación ($r = 0.67$, $p < 0.0001$). **B.** Ejemplo de respuesta neuronal representativa con una correlación negativa con el Índice de Palatabilidad ($r = -0.65$, $p < 0.0001$). **C.** Histograma del porcentaje de neuronas relacionadas a la palatabilidad que correlacionaron (Incrementos, $r > 0$, gris) o anti-correlacionaron (Decrementos, $r < 0$, azul) con el Índice de Palatabilidad en las tres

tareas de acceso breve. Las n's son los conteos de neuronas en cada categoría. Gustativa vs. Start, $p = 0.14$; Gustativa vs. Start/Stop, $p = 0.45$; and Start vs. Start/Stop, $p = 0.047$. **D.** Medias \pm sem de la actividad normalizada (en números Z con respecto a los ensayos de 0 %) de todas las neuronas relacionadas a la Palatabilidad que fueron Incrementos o Decrementos. La actividad normalizada correlacionó o anti-correlacionó, ensayo por ensayo, con el Índice de Palatabilidad (línea roja; $r = 0.3$ y $r = -0.35$, respectivamente; p 's < 0.01).

6.4 Neuronas del NAcSh que monitorean la concentración de sacarosa

Después de identificar una población neuronal del NAcSh cuya actividad correlaciona con la palatabilidad de la sacarosa, se identificó una población de neuronas que contenían información sobre su concentración (o intensidad), de manera independiente a la palatabilidad. Para ello se empleó un análisis que detectaba las mejores ventanas donde las neuronas acarreaban dicha información, pero sólo en ensayos Completos (donde no existen diferencias en palatabilidad, ver Fig. 7). En las Figuras 11A y 11B se pueden apreciar dos respuestas neuronales que correlacionaron, en manera de Incremento ($r = 0.9$) o Decremento ($r = -0.56$; p 's < 0.01), respectivamente, con la concentración. Los porcentajes de neuronas relacionadas a la concentración hallados no fueron diferentes entre tareas (Fig. 11C; chi cuadrada; $\chi^2 = 0.03$, $p = 0.86$, para Gustativa vs. Start; $\chi^2 = 0.32$, $p = 0.57$, para Gustativa vs. Start/Stop; y $\chi^2 = 0.14$ $p = 0.7$ para Start vs. Start/Stop), lo que sugiere que la codificación de las concentraciones de sacarosa en el NAcSh es independiente de los contextos conductuales. Además, la codificación poblacional de este grupo también correlacionó, ensayo por ensayo, con las concentraciones de sacarosa (Fig. 11D; $r = 0.43$ y $r = -0.45$, para los Incrementos y Decrementos, respectivamente; p 's < 0.01). Por último, se determinó que la frecuencia con la que se observaron las respuestas neuronales que codifican concentración fue menor que la frecuencia para hallar neuronas relacionadas a la palatabilidad (297 neuronas relacionadas a la palatabilidad vs. 138 neuronas relacionadas a la concentración; chi cuadrada; $\chi^2 = 47.8$, $p < 0.001$). Con estos datos se estipuló que existen neuronas en el NAcSh que monitorean la concentración de la sacarosa, independientemente a la palatabilidad.

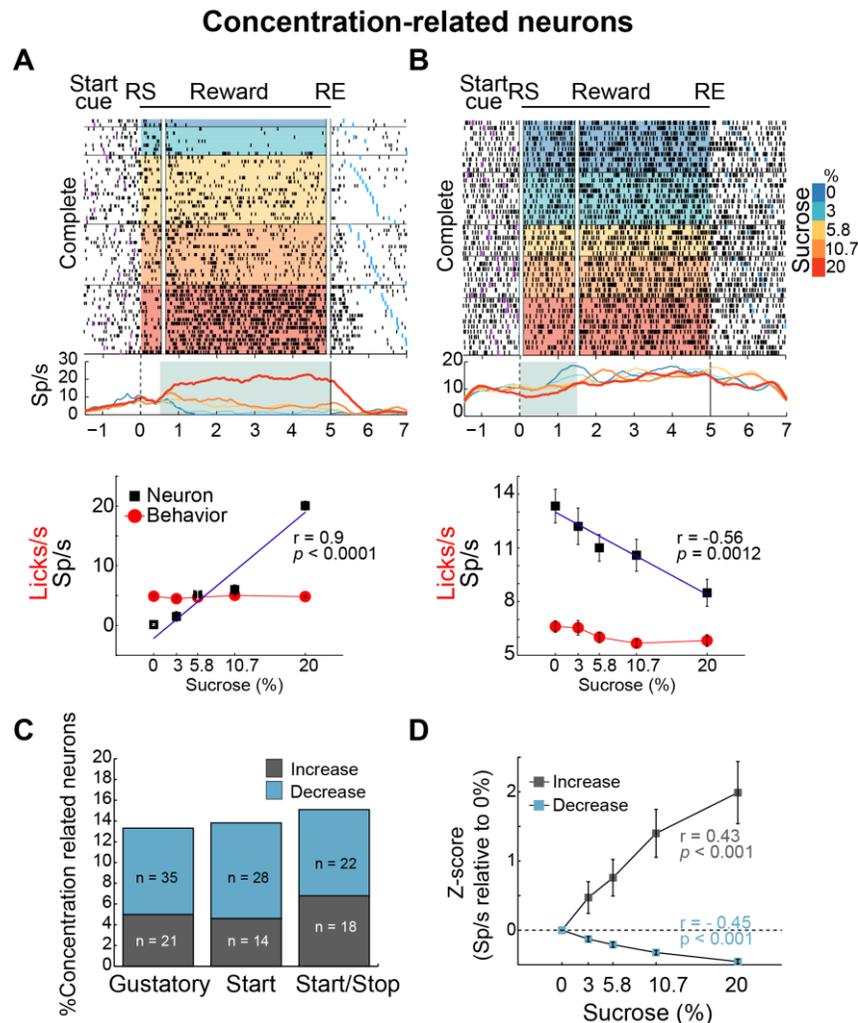


Figura 11. Independientes a las respuestas oro-motoras, una población distinta del NAcSh monitorea la concentración de la sacarosa.

A. Gráfica tipo raster de una respuesta neuronal registrada en la tarea Start construida sólo con los ensayos Completos. En esos ensayos, la tasa de lengüeteos es independiente a la concentración de sacarosa. Las convenciones son las mismas que en la Figura 10 pero, por motivos de visualización, no se muestran los lengüeteos excepto el último de cada ensayo (marcas azules). El panel inferior muestra la tasa de lengüeteos (en rojo) y la actividad neuronal (negro) durante la "mejor" ventana temporal. La correlación fue $r = 0.9$, $p < 0.0001$. **B.** Respuesta neuronal cuya tasa de disparó anti-correlacionó con la concentración de sacarosa ($r = -0.56$, $p = 0.0012$). **C.** Histograma del porcentaje de respuestas en Incrementos o Decrementos correlacionando con la concentración de sacarosa. Las n's indican los conteos de neuronas. **D.** Promedio (\pm sem) de la actividad normalizada de todas las neuronas relacionadas a la concentración. Las correlaciones fueron de $r = 0.43$ y $r = -0.45$, respectivamente, p 's < 0.001 .

6.5 Neuronas que codifican los incrementos en sacarosa mediante un código de sincronía

Se sabe que existen neuronas en el NAcSh cuya actividad oscila en fase con el lengüeteo (Gutierrez et al., 2010). Por ello se investigó si esta correlación con la conducta del lengüeteo contiene información sobre la palatabilidad/concentración de la sacarosa. Primero la coherencia (C; medida normalizada entre 0 y 1) fue calculada durante el periodo de Recompensa. Como se muestra en la Tabla 3, un total de 8.5 % (84/990) de todas las neuronas registradas fueron coherentes con el lengüeteo y la media total de coherencia fue 0.44. Además, no existieron diferencias en las proporciones halladas de este tipo de neuronas en función de las tareas de acceso breve (p 's > 0.05). La sincronía con el lengüeteo de la mayoría de las neuronas no cambió con las concentraciones de sacarosa (ver ejemplo en el panel superior de Fig. 12A), sin embargo, un subgrupo de neuronas coherentes con el lengüeteo (14/84) discriminaron los Tipos de Ensayo modulando monótonicamente su coherencia. Un ejemplo de este tipo de respuesta neuronal se muestra en el panel inferior de la Figura 12B (para las proporciones de estas respuestas ver Tabla 3).

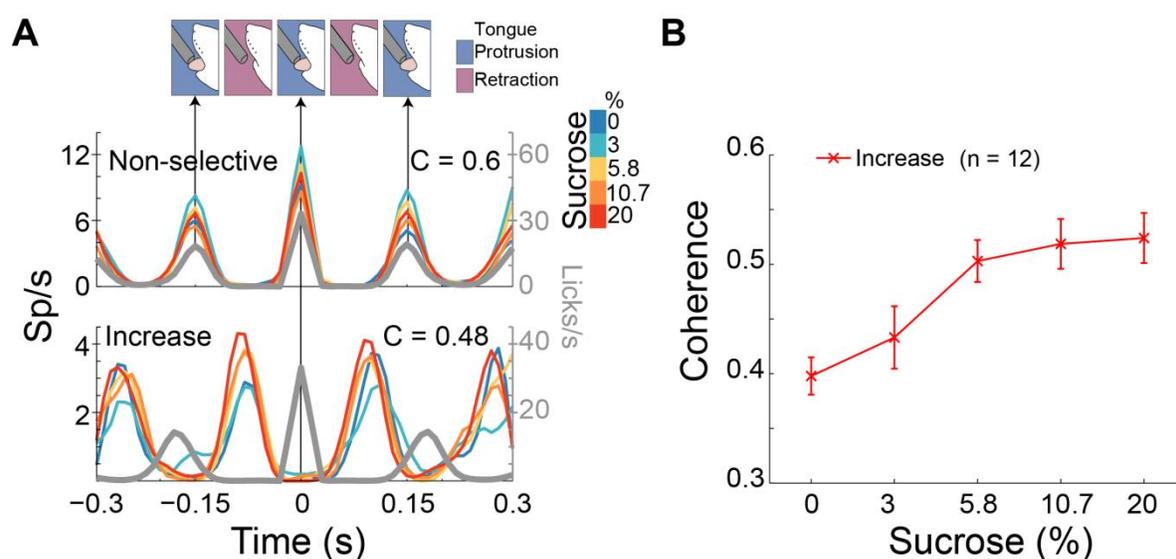


Figura 12. Neuronas en el NAcSh que incrementan su coherencia con el lengüeteo en función de la sacarosa.

A. (Arriba) Representación esquemática de la secuencia temporal de una rata lengüeteando un bebedero. Abajo se muestran los PSTHs de la actividad de dos neuronas coherentes con el lengüeteo alienados a todos los lengüeteos ocurridos en el periodo de Recompensa. El ejemplo superior es una respuesta obtenida de la tarea Gustativa cuya coherencia fue similar en todos los Tipos de Ensayo ($r = 0.03$, $p > 0.05$). En el ejemplo inferior se aprecia una respuesta neuronal (registrada en la tarea Start/Stop) que incrementó su coherencia se manera concentración-dependiente ($r = 0.45$, $p < 0.05$). Los disparos de esta neurona se alienaban a la retracción de la lengua. Los trazos grises representan la tasa de lengüeteo (eje de abscisas derecho). **B.** La media (\pm sem) de la coherencia de las doce neuronas coherentes con el lengüeteo que incrementaron estadísticamente su sincronía con la concentración de sacarosa.

La mayor parte de este subgrupo de neuronas (12/14) incrementó su sincronía con el lengüeteo en función de la concentración de sacarosa (Fig. 12B), mientras que sólo dos neuronas decremento su coherencia monotónicamente. En resumen, se halló una población en el NAcSh de neuronas coherentes con el lengüeteo que contiene un código de sincronía que se modula con la concentración/palatabilidad de la sacarosa.

Tabla 3. Neuronas coherentes con el lengüeteo en el NAcSh que conllevan información sobre la concentración de sacarosa

	Todas las neuronas coherentes		Coherentes que codifican sabor n (%)	Dirección de la modulación	
	n (%)	Coherencia media \pm sem		Incrementos	Decrementos
Gustativa (N = 421)	32 (7.6)	0.46 \pm 0.01	5/32 (15.6)	4	1
Start (N = 304)	27 (8.8)	0.44 \pm 0.01	4/27 (14.8)	3	1
Start/Stop (N = 265)	25 (9.3)	0.43 \pm 0.01	5/25 (20)	5	0

Las N's seguidas del nombre de las tareas conductuales indican el número total de neuronas registradas en cada una de ellas. Para "Todas las neuronas coherentes", los (%) son relativos a las N's. Para las "Coherentes que codifican sabor" los (%) son relativos a todas las neuronas coherentes. Los valores de coherencia son presentados como medias \pm sem. Los valores en Incrementos y Decrementos son conteos de neuronas.

6.6 Neuronas moduladas por la alimentación: Activas e Inactivas

Una vez que exploramos cómo el NAcSh monitorea diferentes aspectos de la sacarosa, se decidió evaluar el correlato neuronal del efecto de las pistas auditivas en la alimentación. De acuerdo con otros estudios (Krause et al., 2010; Roitman et al., 2005; Tellez et al., 2012), encontramos dos poblaciones de neuronas cuya actividad se incrementa (neuronas Activas) o se disminuye (neuronas Inactivas) durante la conducta del lengüeteo. La Figura 13A muestra los PSTHs poblacionales de la actividad de las neuronas Activas e Inactivas alineados (tiempo = 0 s) al inicio del ensayo, al RS y al RE, por cada tarea de acceso breve. A pesar de que la probabilidad de hallar a cada población fue similar entre las tareas conductuales (~18 % de neuronas activas y ~40 % de Inactivas; p 's > 0.05; ver Fig. 13B), existieron diferencias en cuanto a su resposividad a las pistas auditivas. Como era esperado, en la tarea Gustativa (ver fila superior de la Fig. 13A) las neuronas Activas e Inactivas no se modularon al inicio del ensayo (pues no era anunciado con alguna pista en esa tarea). En cambio, su actividad se vio modificada ~300 ms antes de RS y durante el periodo de Recompensa. Además, se observa que, la actividad promedio de las neuronas Activas osciló marcadamente con los dos primeros lengüeteos y, en la medida con la que la variación se fue acumulando en el lengüeteo, dichas oscilaciones gradualmente disminuyeron. Por último, cuando la actividad de las neuronas se alineó a RE se reveló que la actividad de las neuronas Activas regresó al nivel basal en 1.5 s, en la medida que los animales detenían los lengüeteos secos; mientras que las neuronas Inactivas demoraron aún más su retorno a niveles basales.

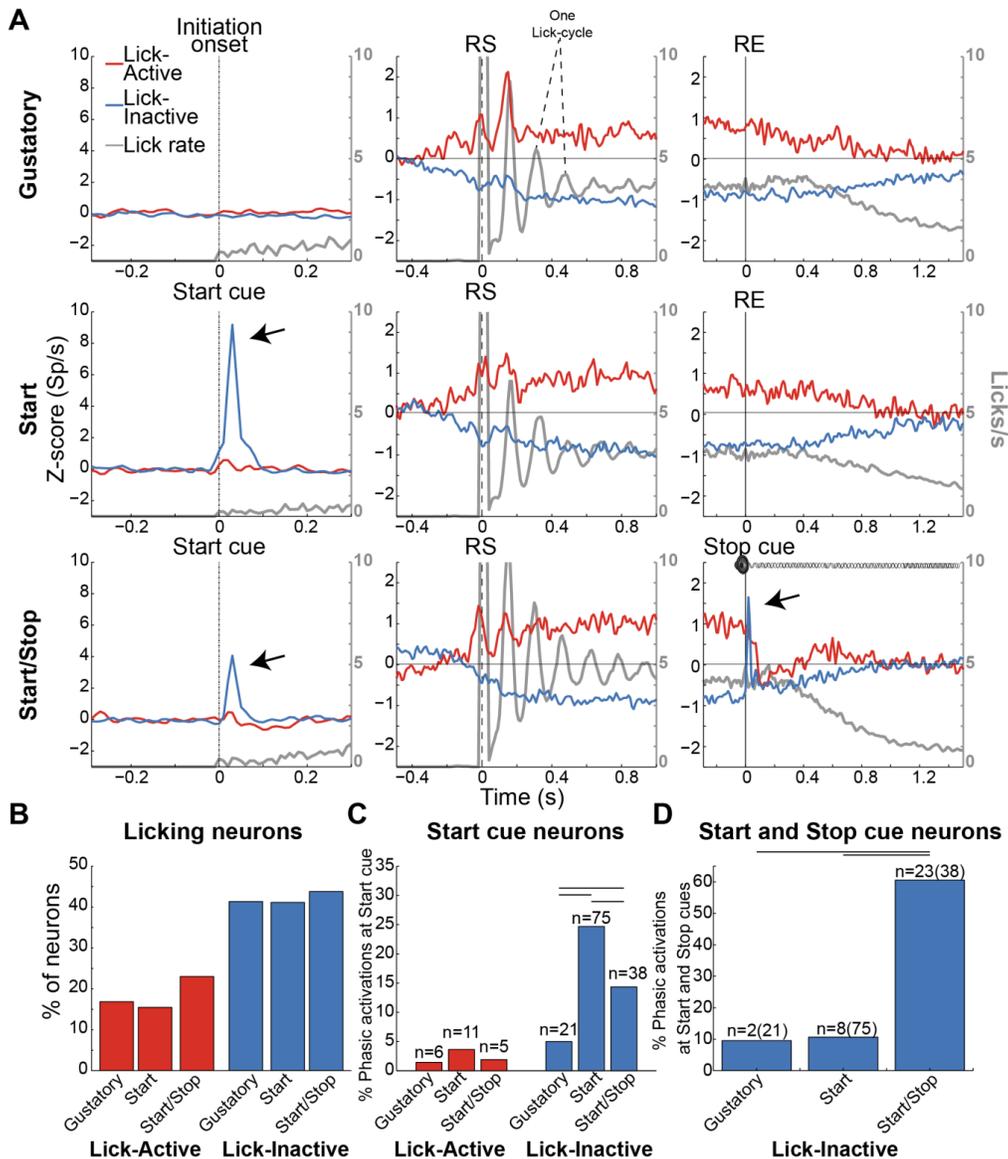


Figura 13. Las neuronas Inactivas con el lengüeteo respondieron fásicamente a las Pistas Start y Stop.

A. La actividad poblacional normalizada (a números Z) de las neuronas que fueron Activas (trazos rojos) o Inactivas (azules) con el lengüeteo. También se muestra la tasa de lengüeteos (en gris, abscisas derechas). Los PSTHs fueron alineados (Tiempo = 0 s), para cada prueba de acceso breve (Gustativa fila superior, Start fila media y Start/Stop fila inferior), al inicio del periodo de Iniciación (columna izquierda), al inicio del periodo de Recompensa (RS, columna media) y a fin del mismo (RE, columna derecha). El periodo de -1.5 a -0.5 s con respecto al inicio del periodo de Iniciación fue usado como línea base para establecer la normalización de la actividad neuronal en todos los paneles. **B.** Histograma del porcentaje de neuronas Activas e Inactivas con el lengüeteo para las tres tareas de acceso breve. **C.** Histograma del porcentaje de neuronas Activas o Inactivas que respondieron fásicamente ante la Pista Start. **D.** Porcentaje de neuronas Inactivas que

respondieron fásicamente a las Pistas Start y Stop. Las líneas horizontales en C y D indican diferencias estadísticas en los porcentajes entre tareas conductuales (prueba de chi cuadrada, $\alpha = 0.05$).

6.6.1 Neuronas Inactivas y su papel centinela del consumo de sacarosa

Para conocer el correlato neuronal del efecto de las pistas auditivas en la alimentación, comparamos cómo las neuronas Activas e Inactivas respondieron a estos estímulos exteroceptivos (Fig. 13A) y observamos mayor responsividad en las neuronas Inactivas (ver flechas). En concreto, la frecuencia con la que las neuronas Inactivas respondieron fásicamente fue mayor, en comparación con las Activas ($\chi^2 = 8.08$, $p = 0.004$ (prueba Gustativa); $\chi^2 = 42.08$, $p < 0.0001$ (prueba Start) and $\chi^2 = 23.5$, $p < 0.0001$ (prueba Start/Stop)). Además, de acuerdo con la Figura 13C, en la tarea Start 24.7 % (75/304) de las neuronas fueron Inactivas y respondieron a la Pista Start (ver flecha en Fig. 13A). Estas neuronas representan el 60.4 % (75/124) de las neuronas Inactivas detectadas en la tarea Start, de las cuales 45 % (34/75) eran además neuronas relacionadas a la palatabilidad. En la tarea Start/Stop, sólo el 14.3% (38/265) del total de neuronas registradas fueron Inactivas y respondieron fásicamente a la Pista Start (ver flecha en Fig. 13A). Estas neuronas representan el 33.3 % (38/114) de todas las neuronas Inactivas y el 50 % de ellas fueron neuronas relacionadas a la palatabilidad. Además, el 60.5 % (23/38; Fig. 13D) de este subgrupo de neuronas también respondieron a la Pista Stop (ver flecha en Fig. 13A, tarea Start/Stop) y de ellas el 56.2 % (13/23) fueron neuronas relacionadas a la palatabilidad. En conjunto, estos datos indican que una subpoblación de neuronas Inactivas puede integrar información auditiva y relacionada a la palatabilidad para monitorear (a manera de centinelas) la conducta de ingesta.

6.6.2 Neuronas Activas y su papel durante el consumo de sacarosa

Como se mencionó anteriormente, la frecuencia de respuestas fásicas en las neuronas Activas fue baja (entre el 1 y el 4 % en las tres tareas conductuales). Sin embargo, se observa en la Figura 13A que, en la tarea Start/Stop, la actividad de

las neuronas Activas fue reprimida abruptamente tras el final del periodo de Recompensa seguido de un rebote, hasta que finalmente regresaba a niveles basales. Por su parte, también en la tarea Start/Stop, las neuronas Inactivas regresaban más rápidamente a su línea base (en ~ 0.9 s), en comparación con las otras pruebas conductuales (> 1.5 s en las tareas Gustativa y Start). Estas modulaciones abruptas en la actividad de las neuronas Activas, así como el rápido retorno a niveles basales en las Inactivas, podrían explicar el hecho de que, en la tarea Start/Stop, los animales aceleren la suspensión de los lengüeteos en seco (Fig. 8A y 9D).

6.7 Decodificación de la sacarosa por parte de las poblaciones funcionales del NAcSh

Tras haber descrito diferentes poblaciones neuronales en el NAcSh que contienen información sobre la palatabilidad y la concentración de la sacarosa, así como información auditiva y de la conducta de ingesta, se cuantificó la cantidad de información (medida como desempeño en porcentaje de ensayos correctamente decodificados) sobre los cinco estímulos gustativos que cada una de estas poblaciones acarrea durante el periodo de Recompensa. Este análisis no distinguió la información proveniente de la palatabilidad de la sacarosa y la concentración de la misma, pero sí proveyó evidencia de la cantidad de información total de dicho estímulo que contienen las poblaciones neuronales.

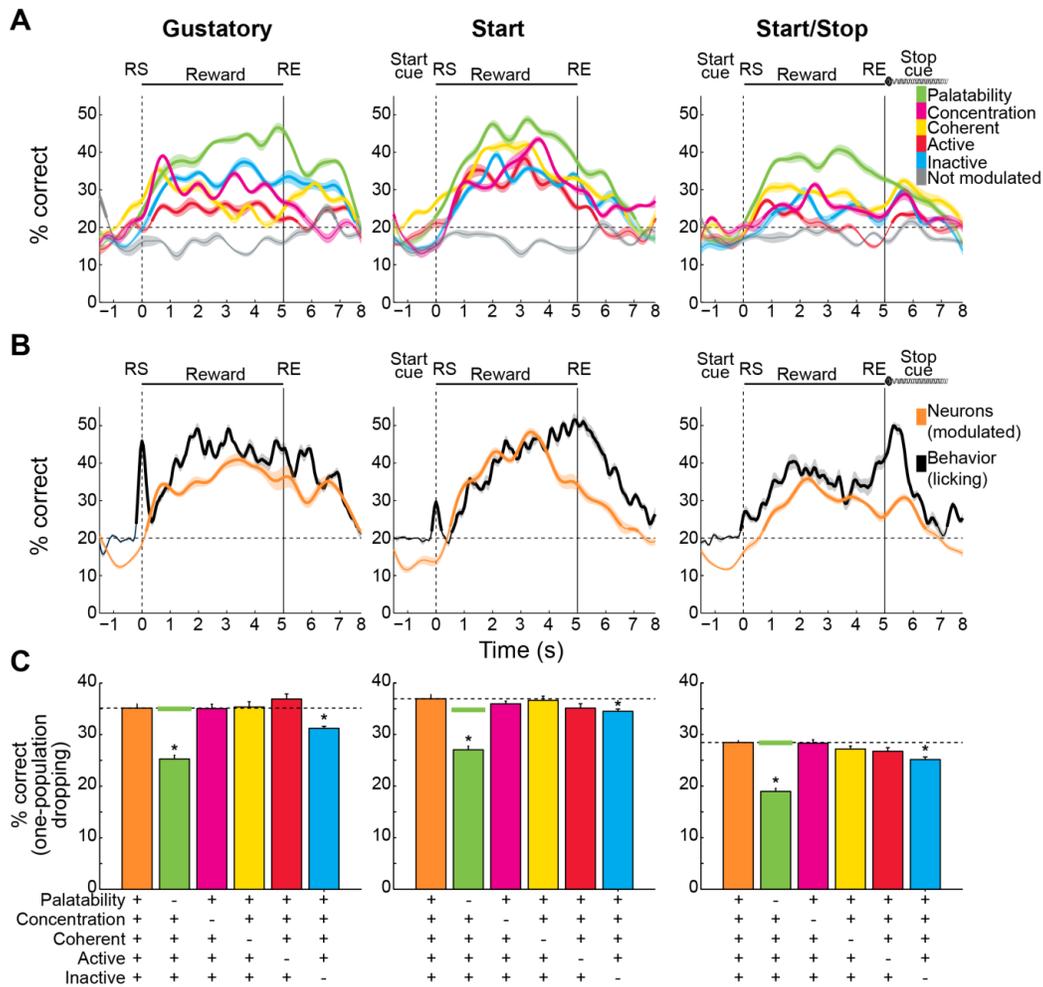


Figura 14. La decodificación de la concentración/palatabilidad de la sacarosa por diferentes poblaciones neuronales en el NAcSh.

A. Las dinámicas temporales de decodificación alcanzadas por las cinco poblaciones neuronales descritas en este trabajo y una población adicional de neuronas sin pertenencia a las anteriores (No moduladas, trazos grises) para las tres tareas de acceso breve. Los valores son los promedios \pm sem del porcentaje de ensayos correctamente clasificados alrededor del inicio del periodo de Recompensa (RS). El engrosamiento en los trazos indica que el desempeño en esas porciones fue estadísticamente diferente contra el nivel de azar (20 %, líneas punteadas horizontales) como se comprobó por medio de una t de student de cola derecha ($\alpha = 0.05$). **B.** El curso temporal del desempeño de decodificación de la sacarosa alcanzado por la población de todas las neuronas Moduladas (naranja) y por las respuestas de lengüeteo per se (negro). Convenciones como en A. **C.** Decodificación total durante el periodo de Recompensa en las tres tareas conductuales de las neuronas Moduladas (barras naranjas y líneas punteadas horizontales) y del mismo grupo neuronal pero sin la participación de cada ensamble funcional. Las líneas horizontales verdes representan el desempeño promedio de decodificación conseguido dando de baja (100 veces) a una población aleatoria de

neuronas del tamaño de la población de Palatabilidad. * indica diferencias significativas con respecto a la población de neuronas Moduladas ($\alpha = 0.05$).

6.7.1 La decodificación de la sacarosa por las poblaciones funcionales del NAcSh es afectada por el contexto

La Figura 14A muestra los cursos temporales del desempeño de decodificación en cada tarea de acceso breve en función de las poblaciones neuronales (de Palatabilidad, Concentración, Coherentes, Activas, Inactivas y No Moduladas (población compuesta de todas las neuronas que no pertenecen a alguna de las poblaciones mencionadas)). Empleando esta metodología se encontró en las tres pruebas conductuales que las neuronas No moduladas (Fig. 14A) no decodifican la sacarosa mejor que el azar (20 %; líneas punteadas horizontales; t de student de cola derecha, p 's > 0.05). En contraste, el resto de las poblaciones neuronales decodificaron la sacarosa mejor que el azar, en diferentes momentos durante el periodo de Recompensa (ver los engrosamientos en las líneas en la Fig. 14A). La población de neuronas de Palatabilidad fue la que acarrió más información sobre la sacarosa en las tres pruebas conductuales comparado con las otras poblaciones neuronales, de las que, las neuronas Activas decodificaron en menor medida dicho estímulo gustativo (ANOVA de dos vías; efecto de poblaciones, $F_{(2,4)}=215.9$, $p < 0.0001$).

Además, el desempeño de decodificación fue dependiente del contexto conductual pues en la tarea Start la decodificación de las poblaciones neuronales fue más alta y más homogénea, mientras que en la tarea Start/Stop la decodificación fue más baja y más heterogénea. En resumen, la decodificación siguió el orden Start > Gustativa > Start/Stop ($F_{(2,4)}=262.5$, $p < 0.0001$; p 's < 0.0001). También existieron diferencias estadísticas entre poblaciones neuronales (p 's < 0.05) excepto entre las neuronas Coherentes y las neuronas de Concentración ($p = 0.067$) y entre las Inactivas y las de Concentración ($p = 0.25$). Es sobresaliente que pese de estar conformada por pocas neuronas, la población de Coherentes decodificó la sacarosa

a niveles similares que otras poblaciones más grandes, lo que sugiere que el código de sincronía empleado por ellas acarrea información relevante sobre la sacarosa.

Más adelante, por tarea de acceso breve, agrupamos a las poblaciones neuronales en una población más grande que denominamos neuronas Moduladas y cuyo desempeño de decodificación se aprecia en la Figura 14B. Adicionalmente, calculamos la información sobre la sacarosa contenida en el lengüeteo *per se* (ver Métodos). Encontramos en la tarea Start que los cursos temporales de decodificación de las neuronas Moduladas superaron estadísticamente el azar antes que la decodificación de la conducta del lengüeteo. Por el contrario la decodificación del lengüeteo antecedió a la de las neuronas Moduladas en la tarea Start/Stop. Estos resultados se ven confirmados por los datos conductuales que sugieren que las ratas de la tarea Start usaron la pista de Inicio para detectar de manera más eficiente (en un solo lengüeteo) los estímulos gustativos. En línea con lo anterior, encontramos una correlación significativa entre la decodificación de las neuronas Moduladas y la del lengüeteo durante el periodo de Recompensa en las tres tareas conductuales ($r = 0.87$, $r = 0.8$ y $r = 0.86$, en las tareas Gustativa, Start y Star/Stop, respectivamente; p 's < 0.05). En un análisis control, la decodificación de las neuronas No moduladas no correlacionó significativamente con la información de la conducta ($r = -0.25$, $r = -0.06$ y $r = 0.03$ respectivamente, p 's > 0.05), lo que sugiere que la actividad específicamente de las neuronas Moduladas contiene el correlato neuronal de la conducta durante las tareas de acceso breve.

6.7.2 La expresión de la palatabilidad y su correlato neuronal en el NAcSh son rápidos

A continuación nos enfocamos a estudiar el desarrollo temporal de la decodificación (Fig. 14B). A diferencia del análisis empleado para encontrar a las neuronas relacionadas a la palatabilidad y concentración (Figs. 10 y 11) en el que se detectaba la ventana temporal en la que las neuronas codificaban mejor los

estímulos, el análisis de decodificación empleado aquí nos permite estimar los momentos en los que las neuronas comienzan y terminan de acarrear información sobre la sacarosa. A este respecto encontramos que el inicio de la decodificación fue diferente entre las tareas conductuales (ver inicio del engrosamiento de las líneas naranjas en Fig. 14B), siendo 150 ms para la tarea Gustativa, 500 ms para la tarea Start y 700 ms para la tarea Start/Stop. Por su parte, en las tres tareas conductuales el lengüeteo decodificó la sacarosa justo después de iniciado el periodo de Recompensa (en menos de 150-300 ms; ver líneas negras en Fig. 14B), sugiriendo que la codificación de la palatabilidad es rápida. En la tarea Gustativa, y de manera más notoria en la tarea Start, se observó que después de un súbito incremento en la decodificación al inicio del periodo de Recompensa ocurrió un descenso que llegó al nivel del azar (~500 ms después de RS). Este patrón corresponde al patrón de lengüeteo que se observó en esas tareas (ver Figs. 7 y 8A), lo que sugiere que esta estrategia conductual empleada por las ratas en las tareas Gustativa y Start conlleva información de la palatabilidad de la sacarosa que estos animales pueden usar para resolver las tareas de acceso breve. Es notable que la decodificación comenzó a divergir significativamente del azar antes del inicio del periodo de Recompensa. Sin embargo esto es atribuible a que los datos eran decodificados en ventanas móviles (ver Métodos), pues si omitimos este suavizado de los datos toda decodificación significativa antes de tiempo = 0 s se desvanece (datos no mostrados). En suma, estos datos indican que la palatabilidad es procesada por el NAcSh y expresada conductualmente de manera rápida y que la velocidad de la decodificación de la sacarosa puede ser modificada por el contexto ambiental.

6.7.3 Las neuronas de Palatabilidad contienen información irremplazable sobre la sacarosa

Finalmente, establecimos la contribución parcial de cada población funcional a la decodificación de las neuronas Moduladas. Para ello diseñamos un análisis que denominamos “Baja de una población” (Fig. 14C). Brevemente, este análisis

consistió en calcular la decodificación de las neuronas Moduladas dando de baja (quitando) una población funcional a la vez. Estas nuevas poblaciones fueron comparadas con la decodificación de la población original de neuronas Moduladas (barras naranjas y líneas punteadas horizontales en Fig. 14C). Mediante este procedimiento encontramos que, en comparación con el desempeño de las neuronas Moduladas (en promedio, 35 % en la tarea Gustativa, 36.9 % en la tarea Start, y 28.4% en la tarea Start/Stop) el desempeño de decodificación fue estadísticamente menor cuando fueron dadas de baja las neuronas de Palatabilidad (a 20.3 %, 27 %, y 19 % en cada tarea respectivamente; pruebas de Kruskal-Wallis; p 's < 0.05). Este fenómeno ocurrió también, pero en menor medida, cuando fueron removidas las neuronas Inactivas con el lengüeteo, pues el desempeño cayó a 31.2 %, 34.5 %, y 25.1 % (p 's < 0.05), en cada una de las pruebas conductuales. En contraste, ninguna otra población neuronal hizo caer estadísticamente la decodificación al ser dadas de baja (todas las p 's < 0.05), sugiriendo que las neuronas de Palatabilidad y las Inactivas con lengüeteo contienen información sobre la sacarosa que ningún otro ensamble en el NAcSh puede sustituir.

Nos preguntamos después si es la mera reducción en el tamaño de la población neuronal la responsable de la caída en la decodificación. Un primer indicio para descartar esto es el hecho de que la remoción de la población de Palatabilidad afectaba siempre más la decodificación a pesar de estar conformado por menos neuronas que la población de Inactivas. No obstante, decidimos probarlo directamente. Para ello, repetimos la decodificación pero, en vez de dar de baja la población de Palatabilidad, removimos una población aleatoria del mismo tamaño que la población de Palatabilidad (de acuerdo con cada tarea conductual). Esta decodificación se calculó 100 veces (removiendo una nueva población aleatoria cada vez) y se promedió (líneas horizontales verdes en Fig. 14C). No se encontraron diferencias significativas entre el desempeño de las neuronas Moduladas contra el de la población aleatoriamente disminuida en ninguna de las tareas de acceso breve (35 %, 34.8 % y 28.4 %, en cada una; comparar líneas verdes con líneas punteadas

en Fig. 14C; p 's > 0.05). En contraste, sí existieron diferencias estadísticas comparando con la decodificación obtenida dando de baja a la población de Palatabilidad original (barras verdes; p 's < 0.05). Por tanto se puede concluir que la contribución relativa de las neuronas de Palatabilidad e Inactivas no se debe al azar. Más aún, las neuronas de Palatabilidad e Inactivas proveen información no redundante y crucial para predecir la sacarosa que no puede ser compensada por ninguna otra población neuronal en el NAcSh.

6.8 Respuestas fásicas inhibitorias que monitorean el fin de la recompensa

Además de las neuronas que se activaron fásicamente al accionarse la Pista Stop (Fig. 13), observamos otro grupo neuronal que se inhibió de manera fásica ante el mismo estímulo (Fig. 15). Por lo tanto, exploramos si estas respuestas inhibitorias se presentaban ante la ausencia de recompensa (Apicella et al., 2009). En la Figura 15A se muestran ejemplos de tres respuestas neuronales de este tipo encontradas en cada una de las tareas de acceso breve. En la gráfica tipo raster y el PSTH de la actividad de la neurona de la tarea Gustativa (panel izquierdo de la Fig. 15A) se observa una inhibición fásica que inició ~0.3 s después de RE y cuya duración fue de 1 s. En todos los ensayos, esta respuesta comenzó después de que la rata lengüeteo en seco (sin recibir líquido en la lengua) al menos una vez, lo que sugiere que la inhibición fue evocada por la ausencia de recompensa. Un fenómeno similar se aprecia en el ejemplo registrado en la tarea Start (panel medio) en donde una respuesta fásica ocurría después de dos lengüeteos en seco, aunque esta respuesta fue de menor magnitud comparada con la observada en la tarea Gustativa. Por último, la respuesta neuronal graficada en el panel derecho fue registrada en la tarea Start/Stop y fue la que presentó la inhibición fásica más pronunciada además de que ocurrió siempre inmediatamente después de accionarse la Pista Stop y antecediendo los lengüeteos en seco. Este fenómeno también aconteció en ensayos Incompletos donde el animal ya no estaba lengüeteando al final de periodo de Recompensa. Todo ello sugiere que, en este caso, fue la pista auditiva (en vez de la ausencia de recompensa) lo que evocó esta

respuesta. De aquí se desprende que, para las ratas entrenadas en la tarea Start/Stop la pista auditiva era más informativa sobre el fin del periodo de Recompensa que la ausencia de líquido en la lengua.

En la Figura 15B se muestra, para las tres tareas conductuales, la actividad normalizada unitaria (codificada en gradientes de color; panel superior) y los PSTHs poblacionales (panel inferior) de todas las neuronas que presentaron inhibiciones fásicas después del periodo de Recompensa. Aunque en las gráficas las neuronas fueron agrupadas en función de su perfil de modulación ante el lengüeteo (Activas, Inactivas y No moduladas), para su análisis fueron tratadas como un solo grupo por su homogeneidad en la inhibición fásica posterior al periodo de Recompensa. Los porcentajes de este tipo de respuestas neuronales fueron 5.7 % (24/421), 1.6 % (5/304) y 8.6 % (23/265) en las tareas Gustativa, Start y Start/Stop, respectivamente, siendo significativamente menos frecuentes en la tarea Start con respecto a las otras (prueba de Chi cuadrada; p 's < 0.01). De la misma manera en que se observó en los ejemplos unitarios de la Figura 15A, las latencias con la que iniciaron las respuestas fásicas fue significativamente diferente entre tareas conductuales, siendo 0.29 (\pm 0.05), 0.44 (\pm 0.16) and 0.16 s (\pm 0.03) para las tareas Gustativa, Start, y Start/Stop, respectivamente (ANOVA de una vía; $F_{(2,47)} = 6$, $p < 0.01$). Estadísticamente las respuestas en la tarea Start/Stop fueron las más rápidas (p 's < 0.01). En suma, las respuestas inhibitorias abruptas observadas en la tarea Start/Stop (en conjunto con las activaciones fásicas antes descritas, Fig. 13) pueden explicar porqué los animales entrenados en esta prueba conductual pueden detener el lengüeteo en el bebedero vacío más rápidamente que los animales entrenados en las otras dos tareas.

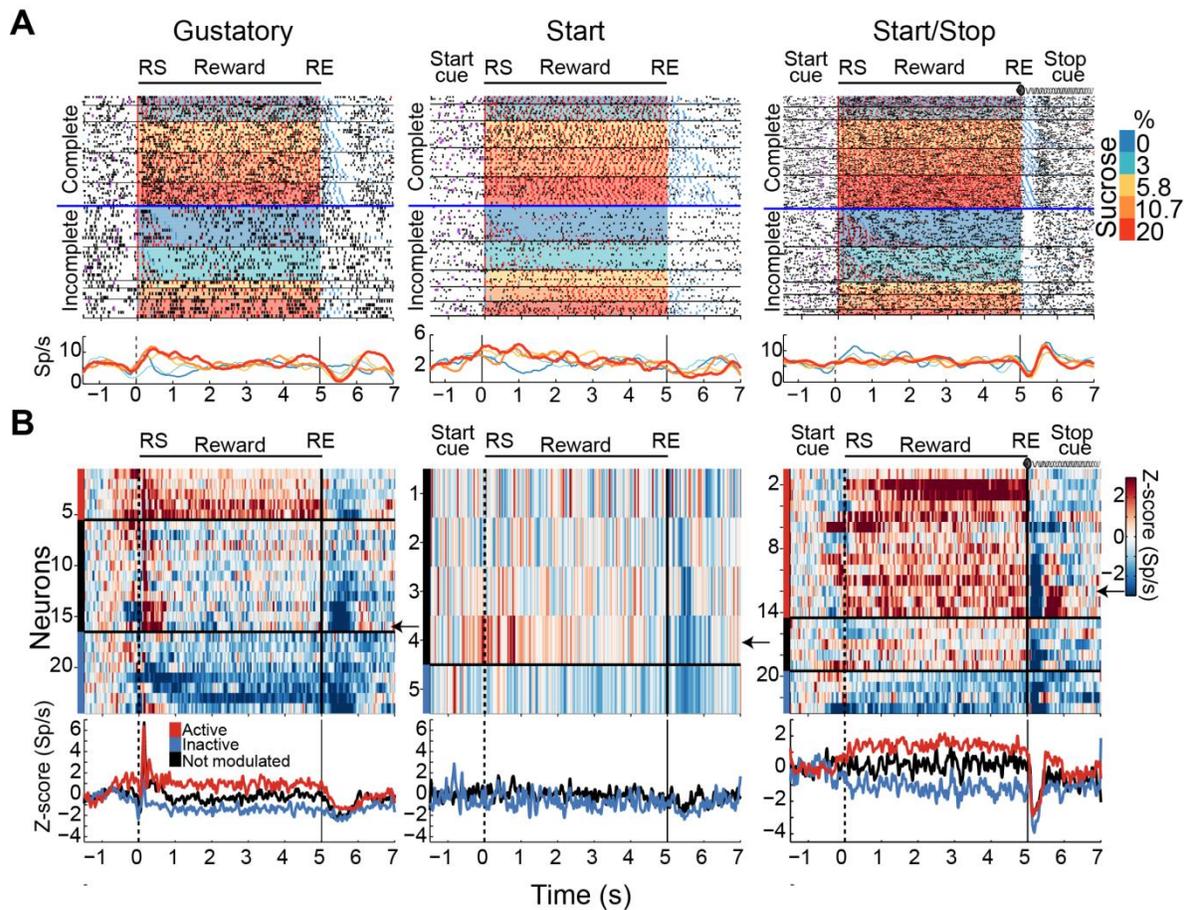


Figura 15. Una población de neuronas del NAcSh señala el fin de la recompensa mediante inhibiciones fásicas usando la primera pista disponible.

A. Gráficas tipo raster alineadas al inicio del periodo de Recompensa (RS) de respuestas neuronales registradas en las tres tareas conductuales que se inhibieron de manera fásica posteriormente al fin del periodo de Recompensa (RE). Nótese que en la respuesta obtenida en la tarea Start/Stop la inhibición fásica se alineó mejor a RE en los ensayos Completos e Incompletos. **B.** La actividad promedio normalizada a números Z (codificada en color) alineada a RS de todas las respuestas neuronales que se inhibieron después de RE y los PSTHs poblaciones (abajo). El número de neuronas detectadas fueron 24, 5 y 23 en las tareas Gustativa, Start y Start/Stop, respectivamente, y, por motivos de visualización, son presentadas de manera separada en función de su perfil de modulación ante el lengüeteo. Las barras en el costado izquierdo de cada panel superior indica la pertenencia de las neuronas al grupo de Activas, Inactivas o No moduladas, según las convenciones de la Figura 13. Las flechas señalan qué respuestas neuronales son las que se muestran en A.

7 DISCUSIÓN

Los objetivos de este trabajo fueron establecer cómo la conducta de ingesta de sacarosa y su palatabilidad puede ser modulada por pistas ambientales, así como caracterizar el papel del NAcSh para dirigir la conducta de ingesta. Así, en este trabajo se encontró que las Pistas Start y Stop pueden potenciar la palatabilidad de la sacarosa de diferentes maneras. Por un lado, la Pista Start presentada de manera aislada mejoró la detección y el rechazo de agua. En cambio, cuando las Pistas Start y Stop fueron presentadas en conjunto los animales lengüetearon más incrementando su ingesta calórica. Además, se identificaron poblaciones neuronales en el NAcSh que monitorean la palatabilidad o la concentración de la sacarosa, o que emplean un código de sincronía para distinguir las concentraciones de sacarosa. Asimismo, en concordancia con trabajos anteriores (Krause et al., 2010; O'Connor et al., 2015; Tellez et al., 2012) se detectaron neuronas Activas e Inactivas con el lengüeteo y, adicionalmente, se mostró que las neuronas Inactivas integran información auditiva y de la palatabilidad de la sacarosa, sugiriendo que juegan un papel de centinelas de la alimentación. Por último, probamos que la información sobre la sacarosa que acarrean las neuronas de palatabilidad e Inactivas no está codificada por ningún otro ensamble funcional en el NAcSh. En resumen, los resultados reportados aquí demuestran que las neuronas del NAcSh codifican pistas exteroceptivas asociadas a la alimentación y esta modulación favorece la ingesta de sacarosa como factor obesogénico.

Las pistas exteroceptivas auditivas modulan la palatabilidad de la sacarosa

En este trabajo encontramos que la adición de pistas que anuncian el inicio y el término de un periodo de recompensa, en el que se puede consumir sacarosa, pueden potenciar las respuestas de palatabilidad de la misma. En relación a nuestro estudio, otros trabajos han presentado resultados consistentes entre sí (Delamater et al., 1986; Livneh et al., 2017; Nitschke et al., 2006; Weingarten, 1984). Más cercano a nuestros resultados se encuentra el reporte de Delamater et. al., quienes

han encontrado que una pista auditiva que sirve como estímulo condicionado de la infusión intra-oral de sacarosa, es capaz de incrementar las expresiones afectivas en respuesta a la infusión de agua, en comparación a cuando el agua se infunde sin ser señalada (Delamater et al., 1986). Nuestros hallazgos extienden esta evidencia, mostrando que una Pista Start no específica a un estímulo puede potenciar la palatabilidad de la sacarosa. Además, en contraste con investigaciones anteriores, la nuestra demostró que las pistas ambientales no sólo potencian la palatabilidad de la sacarosa sino también la ingesta de calorías. Así como otros trabajos han mostrado que la modulación del valor hedónico por pistas ambientales tiene un correlato neuronal en la corteza gustativa primaria (Livneh et al., 2017; Nitschke et al., 2006), nosotros mostramos lo propio en el NAcSh. En la tarea Start la pista anticipatoria modulaba las respuestas de palatabilidad haciendo más rápida la detección del agua y su rechazo (Fig. 8B). En el mismo sentido, encontramos que en esa misma tarea la decodificación de la sacarosa fue más rápida (Fig. 14B). En contraste, los datos conductuales señalan que las Pistas Start y Stop en conjunto potencian la palatabilidad promoviendo el lengüeteo y alargando sus ráfagas (Fig. 8), haciendo que la expresión de la palatabilidad fuera más tardía. Así, una vez más, los datos electrofisiológicos recapitulaban el mismo efecto, pues la decodificación de la sacarosa en la tarea Start/Stop ocurrió con mayor demora (Fig. 14B). También resultó interesante el hecho de que, en las tres tareas conductuales, el inicio de la expresión de palatabilidad fue más rápida (en 1-2 lengüeteos o 150-300 ms; ver Fig. 14B) que la decodificación de la sacarosa por parte de las neuronas. En particular, sólo en la tarea Start se observó que, después del pico inicial en el desempeño de decodificación, la información contenida en la actividad neuronal fue mayor y antecedió a la expresión de palatabilidad, indicando que una pista anticipatoria puede acelerar la codificación de la sacarosa. Este hallazgo está en concordancia con trabajos anteriores que muestran que pistas anticipatorias de una recompensa pueden disminuir la latencia con la que las neuronas de la corteza gustativa primaria comienzan a codificar un sabor (Samuelsen et al., 2012; Yoshida and Katz, 2011). En conjunto, el presente trabajo mostró que las pistas auditivas exteroceptivas pueden potenciar la palatabilidad de la sacarosa y modular la actividad del NAcSh,

una región límbica implicada en la codificación de la recompensa. Por tanto, nuestros resultados sugieren que las pistas ambientales que modulan la palatabilidad contribuyen a generar un ambiente obesogénico.

La codificación de la palatabilidad en el NAcSh

Como se expuso en el curso de la Introducción, actualmente no existe consenso sobre cómo las neuronas del NAcSh codifican la palatabilidad (Roitman et al., 2005; Taha and Fields, 2005). Por un lado, se ha planteado (Roitman et al., 2005) que las inhibiciones de las neuronas del NAcSh representan la recompensa de la sacarosa y las excitaciones están relacionadas a la aversión evocada por la quinina. Por tanto, de acuerdo con este esquema, las modulaciones neuronales del NAcSh correlacionan con las diferentes respuestas oro-motoras de palatabilidad que evocan los estímulos dulces y amargos. Por su parte, Taha y Fields (2005) presentaron una propuesta diferente empleando una tarea conductual con sacarosa solamente. Ellos encontraron que la mayoría de las neuronas del NAcSh se inactivaban durante el consumo de sacarosa (las cuales en este trabajo llamamos neuronas Inactivas con el lengüeteo) y que se encargaban de codificar el aspecto motor-apetitivo de la ingesta, mientras que las neuronas Activas con el lengüeteo estaban relacionadas principalmente con la representación del valor hedónico de la sacarosa. A diferencia de estos dos trabajos, nosotros identificamos una población de neuronas del NAcSh que monitorean la palatabilidad correlacionando su actividad positiva o negativamente (Fig. 10). Además, se encontró que una proporción importante de neuronas que acarrean información de palatabilidad eran neuronas Inactivas con el lengüeteo y su actividad anti-correlacionó con el Índice de Palatabilidad (Fig. 10B). Más aún, las neuronas Inactivas decodificaron la sacarosa mejor que las neuronas Activas (Fig. 14A) y el análisis de dar de baja a una población demostró que la información contenida en la población de neuronas de Palatabilidad, seguida de la información en las Inactivas, era crucial para decodificar la sacarosa (Fig. 14C). En suma, en el presente estudio se demuestra que las neuronas relacionadas a la palatabilidad en el NAcSh participan de manera más

diversa de lo que previamente se había estipulado (Roitman et al., 2005; Taha and Fields, 2005).

Nuestros resultados son consistentes con los de Taha y Fields (2005) quienes sostienen que la magnitud de la inhibición de las neuronas Inactivas no discrimina per se la palatabilidad de la sacarosa (ver gráfica raster en Fig. 10B, de 0 a 1 s). Lo que encontramos fue que en el periodo de Recompensa, los animales detenían el lengüeteo más rápido para concentraciones bajas de sacarosa (poco palatables) y lengüeteaban más para concentraciones más altas (más palatables), lo que ocasionaba que la frecuencia de disparo de las neuronas Inactivas anti-correlacionara con las respuestas de palatabilidad a la sacarosa. Por tanto, los datos que se presentan aquí reconcilian las propuestas de Taha y Fields (2005) y Roitman et al. (2005), pues pueden explicar porqué la quinina, cuyas propiedades aversivas promueven la rápida interrupción del lengüeteo (Perez et al., 2013; Weiss and Di Lorenzo, 2012), activa a las neuronas del NAcSh, mientras que la sacarosa las inhibe (Roitman et al., 2005). En conclusión, las neuronas del NAcSh relacionadas a la palatabilidad monitorean el componente oro-motor de las respuestas de palatabilidad de la sacarosa (Mogenson et al., 1980; Prado et al., 2016).

Codificación sensorial de la sacarosa en el NAcSh

Aunque ya se había reportado que la actividad del NAcSh se modula durante el consumo de sacarosa (Hajnal et al., 2004; Roitman et al., 2005; Taha and Fields, 2005), no se había podido diseccionar los componentes sensorial y de palatabilidad de la sacarosa. Aquí, desarrollamos una metodología que separa dichos atributos y permitió identificar a las neuronas que los codifican (Figs. 10 y 11). En el desarrollo de esta Tesis se describió a una población neuronal en el NAcSh que acarrea información sobre la concentración de la sacarosa (Figs. 11). Esto sugiere que el NAcSh recibe y transmite información gustativa. Esta información puede provenir de neuronas responsivas a sacarosa en el núcleo parabraquial (PBN), las cuales

mandan proyecciones preferentemente al NAcSh (Li et al., 2012). Además, se sabe que la estimulación eléctrica del NAcSh suprime las respuestas evocadas por sabores en el PBN (Li et al., 2012), lo que sugiere la existencia de un circuito NAcSh-PBN que modula el sabor de la sacarosa. La información gustativa también puede ingresar al NAcSh por medio de las proyecciones que allí envía la corteza prefrontal (Hurley et al., 1991), donde la codificación de los sabores también ocurre (Jezzini et al., 2013). De manera novedosa, describimos en este trabajo a un grupo de neuronas en el NAcSh que emplean un código de sincronía para discriminar la sacarosa (Fig. 12). Dado que un código de sincronía similar ha sido reportado en el sistema olfativo de insectos (Bazhenov et al., 2001), es plausible que se haya conservado en el sistema sensorial de los mamíferos. En resumen, en este trabajo se caracterizó a una población neuronal en el NAcSh que codifica la sacarosa por su concentración o intensidad, lo que invita a replantearse su inclusión en la vía gustativa (Jones et al., 2006; Simon et al., 2006; Spetter et al., 2010; Vincis and Fontanini, 2016).

Codificación de estímulos auditivos en el NAcSh

Se encontró que algunas neuronas en el NAcSh respondieron de manera fásica activándose (Fig. 13) o inhibiéndose (Fig. 15) ante las Pistas Start y Stop. Fueron de especial interés, las respuestas fásicas observadas en la tarea Start/Stop que ocurrían al término del periodo de Recompensa, pues en la misma tarea los animales detenían el lengüeteo más rápidamente (Fig. 9D). El hecho de que, en la tarea Start/Stop, las modulaciones abruptas en la actividad neuronal comenzaran antes de que las ratas emitieran algún lengüeteo en seco, sugiere que era la Pista Stop, y no la ausencia de recompensa, lo que desencadenaba dichas perturbaciones. De acuerdo con Apicella et al., (2009), las neuronas que responden fásicamente ante la ausencia de recompensa o a pistas que lo anunciaban muy probablemente son interneuronas colinérgicas tónicamente activas (*tonically active neurons*, TANs), pues se ha observado patrones similares de respuesta en estos tipos neuronales ante pistas relevantes para obtener una recompensa (Apicella et

al., 2009). Siguiendo esta lógica, nosotros proponemos que la terminación rápida de la ingesta, como se ve en la tarea Start/Stop (ver paneles a la derecha en Fig. 13A), puede estar mediada por la desinhibición de las neuronas espinosas medianas que ocurre al activarse las TANs (English et al., 2012). Dicha desinhibición en las neuronas espinosas medianas puede interrumpir la ingesta de manera inmediata (O'Connor et al., 2015). Por su parte, las modulaciones rápidas en el NAcSh evocadas por estímulos auditivos son posibles, pues sólo toma ~10 ms para un estímulo sonoro el activar al tálamo auditivo (Shiramatsu et al., 2016) y a la amígdala (LeDoux, 1992), la cual, a su vez, puede modular la actividad del NAcSh (Millan et al., 2017). Además, recientemente se ha reportado que estímulos auditivos sobresalientes pueden evocar la actividad global en el NAcSh (Solis Jr. et al., 2017). En conclusión, encontramos que las pistas asociadas a la ingesta de la sacarosa pueden influenciar los patrones de alimentación y caracterizamos el código que usan las neuronas del NAcSh para integrar la información auditiva.

Las neuronas Inactivas del NAcSh juegan un papel centinela durante la ingesta de sacarosa

En este estudio se muestra que las neuronas Inactivas con el lengüeteo (y no las Activas) se activaban fásicamente por las Pistas Start y Stop que estaban asociadas a la alimentación (Figs. 13C y D). Colectivamente, estos datos apoyan la hipótesis del control tipo centinela del NAcSh sobre la alimentación (Kelley et al., 2005; O'Connor et al., 2015), la cual propone que la inhibición de las neuronas MSND1+ permite la ingesta, mientras que su activación la interrumpe. Más aún, se ha establecido que las neuronas MSND1+ son las neuronas Inactivas con el lengüeteo e inhiben de manera mono-sináptica a las neuronas GABAérgicas del hipotálamo lateral (LH) (O'Connor et al., 2015). Nosotros proponemos que las neuronas que nosotros identificamos como Inactivas (presumiblemente MSND1+) integran y difunden información sobre la palatabilidad y de estímulos auditivos relevantes para la alimentación y tienen su principal efector en las neuronas de LH que están involucradas en la alimentación y en la codificación de la palatabilidad (Jennings et

al., 2015; Li et al., 2013; Nieh et al., 2015). Esta hipótesis podría probarse empleando las tareas de acceso breve, mientras se silencia optogenéticamente a las neuronas del NAcSh que expresan el receptor D1 o el D2. Si nuestro planteamiento es correcto, sólo la inhibición de las neuronas MSND1+ deberá anular el potenciamiento de la palatabilidad de sacarosa por pistas auditivas o incluso afectar totalmente el reporte de palatabilidad. A diferencia de un abordaje farmacológico, la inhibición optogenética puede perturbar la actividad neuronal con la misma resolución con la que estas neuronas responden a los estímulos.

Por último, como una continuación de este trabajo se pretende registrar la actividad de diferentes tipos neuronales en el NAcSh (como las MSND1+) mediante el uso de sensores de calcio dependientes de voltaje dirigidos genéticamente (i.e. GCaMP6) en animales desempeñándose en las tareas de acceso breve.

8 CONCLUSIONES

En este proyecto se demostró que las pistas auditivas asociadas con la alimentación pueden incrementar la palatabilidad de la sacarosa y la ingesta calórica. Además, empleando registros en el NAcSh de animales en libre movimiento, identificamos distintas poblaciones neuronales que codifican la palatabilidad de la sacarosa y su intensidad, despejando la controversia acerca del código que usan las neuronas de esta región cerebral para monitorear la palatabilidad. Además, encontramos que las neuronas Inactivas con el lengüeteo integran información auditiva, apetitiva y de palatabilidad, y su actividad correlacionó con la facilitación y la interrupción del lengüeteo, sugiriendo que dicha integración es útil para dirigir la conducta de ingesta. Encima de ello, se estableció que la información contenida en las neuronas de Palatabilidad e Inactivas es crucial para predecir la palatabilidad/concentración de sacarosa y no es compartida por ningún otro ensamble funcional en el NAcSh.

Por último, nuestros resultados indican que las pistas auditivas exteroceptivas asociadas con la alimentación pueden contribuir a desarrollar un ambiente obesogénico.

9 LIMITACIONES

En este trabajo se usaron tres variantes de la tarea de acceso breve (Gustativa, Start y Start/Stop) que se diferenciaron en la presentación de algunas pistas auditivas que reducían progresivamente la incertidumbre temporal sobre la duración de un periodo de Recompensa. Las respuestas neuronales que fueron registradas en animales entrenados en alguna de estas tareas conductuales fueron comparadas de función de la conducta observada. Para poder confirmar que las diferentes conductas, mediadas por diferentes contextos auditivos, presentan correlatos neuronales diferentes, sería deseable medir dicha actividad neuronal en los mismos animales desempeñando las diferentes tareas conductuales. Esto no fue posible, debido al tiempo que llevaría entrenar a un animal en una de las variantes conductuales y luego re-entrenarlo en una nueva variante supera el tiempo en el que un electrodo de registro puede proporcionar señales de actividad unitaria.

Otra limitación de este trabajo es que, en este punto, nosotros sólo podemos especular que las neuronas del NAcSh pueden codificar una señal global de palatabilidad que puede ser generalizada a otros estímulos diferentes a la sacarosa. Podemos sostener tal aseveración basados en que, en roedores, la palatabilidad es definida operacionalmente como el incremento en respuestas oro-motoras que representan una experiencia hedónica positiva (Berridge and Grill, 1983; Spector et al., 1998). Por tanto, nosotros postulamos que las neuronas relacionadas a la palatabilidad en el NAcSh podrían monitorear respuestas oro-motoras evocadas por otros estímulos gustativos, aunque esto debe ser probado directamente con otros

experimentos. Más aún, reconocemos que el término palatabilidad podría incluir una connotación de placer y que depende del estado homeostático de los sujetos (Berridge et al., 1984) y de los efectos post-ingestivos aprendidos (Araujo et al., 2008). Así, aunque la tarea de acceso breve puede limitar el efecto de la saciedad en la palatabilidad (Davis, 1973), nuestro diseño experimental no nos permite separar del todo la contribución de cada uno de estos componentes que originan las respuestas de palatabilidad de la sacarosa. Por último, nuestro estudio se acotó a usar concentraciones de sacarosa y evitamos el uso de quinina, un sabor aversivo, para sortear el efecto de miedo que este estímulo puede producir en los animales (Perez et al., 2013). En resumen, con este trabajo sólo podemos describir una población de neuronas en el NAcSh que monitorean la palatabilidad oro-motora evocada por la sacarosa.

10 BIBLIOGRAFÍA

Apicella, P., Deffains, M., Ravel, S., and Legallet, E. (2009). Tonicly active neurons in the striatum differentiate between delivery and omission of expected reward in a probabilistic task context. *Eur. J. Neurosci.* 30, 515–526.

Araujo, I.E. de, Oliveira-Maia, A.J., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Nicoletis, M.A.L., and Simon, S.A. (2008). Food Reward in the Absence of Taste Receptor Signaling. *Neuron* 57, 930–941.

Barquera, S., Hernandez-Barrera, L., Tolentino, M.L., Espinosa, J., Ng, S.W., Rivera, J.A., and Popkin, B.M. (2008). Energy intake from beverages is increasing among Mexican adolescents and adults. *J. Nutr.* 138, 2454–2461.

Barquera, S., Campos, I., and Rivera, J.A. (2013). Mexico attempts to tackle obesity: the process, results, push backs and future challenges. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 14 Suppl 2, 69–78.

Bazhenov, M., Stopfer, M., Rabinovich, M., Huerta, R., Abarbanel, H.D.I., Sejnowski, T.J., and Laurent, G. (2001). Model of Transient Oscillatory Synchronization in the Locust Antennal Lobe. *Neuron* 30, 553–567.

- Berridge, K.C. (2000). Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *24*, 173–198.
- Berridge, K.C., and Grill, H.J. (1983). Alternating ingestive and aversive consummatory responses suggest a two-dimensional analysis of palatability in rats. *Behav. Neurosci.* *97*, 563–573.
- Berridge, K.C., and Kringelbach, M.L. (2015). Pleasure systems in the brain. *Neuron* *86*, 646–664.
- Berridge, K.C., Flynn, F.W., Schulkin, J., and Grill, H.J. (1984). Sodium depletion enhances salt palatability in rats. *Behav. Neurosci.* *98*, 652–660.
- Bleich, S., Cutler, D., Murray, C., and Adams, A. (2008). Why is the developed world obese? *Annu. Rev. Public Health* *29*, 273–295.
- Castro, D.C., and Berridge, K.C. (2014). Opioid hedonic hotspot in nucleus accumbens shell: mu, delta, and kappa maps for enhancement of sweetness “liking” and “wanting.” *J. Neurosci.* *34*, 4239–4250.
- Davis, J.D. (1973). The effectiveness of some sugars in stimulating licking behavior in the rat. *Physiol. Behav.* *11*, 39–45.
- Davis, J.D., and Smith, G.P. (1992). Analysis of the microstructure of the rhythmic tongue movements of rats ingesting maltose and sucrose solutions. *Behav. Neurosci.* *106*, 217–228.
- Davison, A.C., and Hinkley, D.V. (1997). *Bootstrap Methods and Their Application* (Cambridge ; New York, NY, USA: Cambridge Univ Pr).
- Delamater, A.R., LoLordo, V.M., and Berridge, K.C. (1986). Control of fluid palatability by exteroceptive Pavlovian signals. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* *12*, 143–152.
- Drewnowski, A., Mennella, J.A., Johnson, S.L., and Bellisle, F. (2012). Sweetness and Food Preference¹²³. *J. Nutr.* *142*, 1142S–1148S.
- English, D.F., Ibanez-Sandoval, O., Stark, E., Tecuapetla, F., Buzsáki, G., Deisseroth, K., Tepper, J.M., and Koos, T. (2012). GABAergic circuits mediate the reinforcement-related signals of striatal cholinergic interneurons. *Nat. Neurosci.* *15*, 123–130.
- Gutierrez, R., Carmena, J.M., Nicolelis, M.A.L., and Simon, S.A. (2006). Orbitofrontal ensemble activity monitors licking and distinguishes among natural rewards. *J. Neurophysiol.* *95*, 119–133.

Gutierrez, R., Simon, S.A., and Nicolelis, M.A. (2010). Licking-induced synchrony in the taste–reward circuit improves cue discrimination during learning. *J. Neurosci.* *30*, 287–303.

Hajnal, A., Smith, G.P., and Norgren, R. (2004). Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* *286*, R31–R37.

Hughes, J.E., Amyx, H., Howard, J.L., Nanry, K.P., and Pollard, G.T. (1994). Health effects of water restriction to motivate lever-pressing in rats. *Lab. Anim. Sci.* *44*, 135–140.

Hurley, K.M., Herbert, H., Moga, M.M., and Saper, C.B. (1991). Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* *308*, 249–276.

Ismail, A.I., Tanzer, J.M., and Dingle, J.L. (1997). Current trends of sugar consumption in developing societies. *Community Dent. Oral Epidemiol.* *25*, 438–443.

Jarvis, M.R., and Mitra, P.P. (2001). Sampling properties of the spectrum and coherency of sequences of action potentials. *Neural Comput.* *13*, 717–749.

Jennings, J.H., Ung, R.L., Resendez, S.L., Stamatakis, A.M., Taylor, J.G., Huang, J., Veleta, K., Kantak, P.A., Aita, M., Shilling-Scriver, K., et al. (2015). Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell* *160*, 516–527.

Jezzini, A., Mazzucato, L., La Camera, G., and Fontanini, A. (2013). Processing of hedonic and chemosensory features of taste in medial prefrontal and insular networks. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 18966–18978.

Jones, L.M., Fontanini, A., and Katz, D.B. (2006). Gustatory processing: a dynamic systems approach. *Curr. Opin. Neurobiol.* *16*, 420–428.

Kadohisa, M., Verhagen, J.V., and Rolls, E.T. (2005). The primate amygdala: Neuronal representations of the viscosity, fat texture, temperature, grittiness and taste of foods. *Neuroscience* *132*, 33–48.

Kelley, A.E., Baldo, B.A., Pratt, W.E., and Will, M.J. (2005). Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: Integration of energy, action and reward. *Physiol. Behav.* *86*, 773–795.

van der Kooy, D., Koda, L.Y., McGinty, J.F., Gerfen, C.R., and Bloom, F.E. (1984). The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J. Comp. Neurol.* *224*, 1–24.

Krause, M., German, P.W., Taha, S.A., and Fields, H.L. (2010). A pause in nucleus accumbens neuron firing is required to initiate and maintain feeding. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 4746–4756.

LeDoux, J.E. (1992). Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2, 191–197.

Li, C.-S., Cho, Y.K., and Smith, D.V. (2005). Modulation of parabrachial taste neurons by electrical and chemical stimulation of the lateral hypothalamus and amygdala. *J. Neurophysiol.* 93, 1183–1196.

Li, C.-S., Chung, S., Lu, D.-P., and Cho, Y.K. (2012). Descending projections from the nucleus accumbens shell suppress activity of taste-responsive neurons in the hamster parabrachial nuclei. *J. Neurophysiol.* 108, 1288–1298.

Li, J.X., Yoshida, T., Monk, K.J., and Katz, D.B. (2013). Lateral Hypothalamus Contains Two Types of Palatability-Related Taste Responses with Distinct Dynamics. *J. Neurosci.* 33, 9462–9473.

Livneh, Y., Ramesh, R.N., Burgess, C.R., Levandowski, K.M., Madara, J.C., Fenselau, H., Goldey, G.J., Diaz, V.E., Jikomes, N., Resch, J.M., et al. (2017). Homeostatic circuits selectively gate food cue responses in insular cortex. *Nature* 546, 611–616.

Meyers, E. (2013). The neural decoding toolbox. *Front. Neuroinformatics* 7, 8.

Millan, E.Z., Kim, H.A., and Janak, P.H. (2017). Optogenetic activation of amygdala projections to nucleus accumbens can arrest conditioned and unconditioned alcohol consummatory behavior. *Neuroscience* 360, 106–117.

Mogenson, G.J., Jones, D.L., and Yim, C.Y. (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog. Neurobiol.* 14, 69–97.

Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. (2001). Mammalian Sweet Taste Receptors. *Cell* 106, 381–390.

Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E.C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S.F., et al. (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. *Lancet Lond. Engl.* 384, 766–781.

Nieh, E.H., Matthews, G.A., Allsop, S.A., Presbrey, K.N., Leppla, C.A., Wichmann, R., Neve, R., Wildes, C.P., and Tye, K.M. (2015). Decoding neural circuits that control compulsive sucrose seeking. *Cell* 160, 528–541.

Nitschke, J.B., Dixon, G.E., Sarinopoulos, I., Short, S.J., Cohen, J.D., Smith, E.E., Kosslyn, S.M., Rose, R.M., and Davidson, R.J. (2006). Altering expectancy dampens neural response to aversive taste in primary taste cortex. *Nat. Neurosci.* 9, 435–442.

North, B.V., Curtis, D., and Sham, P.C. (2002). A Note on the Calculation of Empirical P Values from Monte Carlo Procedures. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 439–441.

O'Connor, E.C., Kremer, Y., Lefort, S., Harada, M., Pascoli, V., Rohner, C., and Lüscher, C. (2015). Accumbal D1R neurons projecting to lateral hypothalamus authorize feeding. *Neuron* 88, 553–564.

Paxinos, G., and Watson, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press).

Perez, I.O., Villavicencio, M., Simon, S.A., and Gutierrez, R. (2013). Speed and accuracy of taste identification and palatability: impact of learning, reward expectancy, and consummatory licking. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305, R252-270.

Pfaffmann, C., and Norgren, R. (1977). Sensory Affect and Motivation*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 290, 18–34.

Popkin, B.M., and Nielsen, S.J. (2003). The Sweetening of the World's Diet. *Obes. Res.* 11, 1325–1332.

Prado, L., Luis-Islas, J., Sandoval, O.I., Puron, L., Gil, M.M., Luna, A., Arias-García, M.A., Galarraga, E., Simon, S.A., and Gutierrez, R. (2016). Activation of Glutamatergic Fibers in the Anterior NAc Shell Modulates Reward Activity in the aNAcSh, the Lateral Hypothalamus, and Medial Prefrontal Cortex and Transiently Stops Feeding. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 12511–12529.

Rivera, J.A., Barquera, S., González-Cossío, T., Olaiz, G., and Sepúlveda, J. (2004). Nutrition transition in Mexico and in other Latin American countries. *Nutr. Rev.* 62, S149-157.

Roitman, M.F., Wheeler, R.A., and Carelli, R.M. (2005). Nucleus accumbens neurons are innately tuned for rewarding and aversive taste stimuli, encode their predictors, and are linked to motor output. *Neuron* 45, 587–597.

Rolls, E.T. (1989). Information processing in the taste system of primates. *J. Exp. Biol.* 146, 141–164.

Roussin, A.T., D'Agostino, A.E., Fooden, A.M., Victor, J.D., and Di Lorenzo, P.M. (2012). Taste coding in the nucleus of the solitary tract of the awake, freely licking rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 10494–10506.

Rowland, N.E. (2007). Food or fluid restriction in common laboratory animals: balancing welfare considerations with scientific inquiry. *Comp. Med.* 57, 149–160.

Samuelsen, C.L., Gardner, M.P.H., and Fontanini, A. (2012). Effects of cue-triggered expectation on cortical processing of taste. *Neuron* 74, 410–422.

Samuelsen, C.L., Gardner, M.P.H., and Fontanini, A. (2013). Thalamic contribution to cortical processing of taste and expectation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 1815–1827.

Shiramatsu, T.I., Takahashi, K., Noda, T., Kanzaki, R., Nakahara, H., and Takahashi, H. (2016). Microelectrode mapping of tonotopic, laminar, and field-specific organization of thalamo-cortical pathway in rat. *Neuroscience* 332, 38–52.

Simon, S.A., de Araujo, I.E., Gutierrez, R., and Nicolelis, M.A.L. (2006). The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 890–901.

Smith, J.C., Davis, J.D., and O'Keefe, G.B. (1992). Lack of an order effect in brief contact taste tests with closely spaced test trials. *Physiol. Behav.* 52, 1107–1111.

Solis Jr., E., Cameron-Burr, K.T., and Kiyatkin, E.A. (2017). Rapid physiological fluctuations in nucleus accumbens oxygen levels induced by arousing stimuli: relationships with changes in brain glucose and metabolic neural activation. *Front. Integr. Neurosci.* 11, 1–16.

Spector, A.C., Klumpp, P.A., and 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.

Spence, C. (2015). Multisensory Flavor Perception. *Cell* 161, 24–35.

Spetter, M.S., Smeets, P. a. M., de Graaf, C., and Viergever, M.A. (2010). Representation of sweet and salty taste intensity in the brain. *Chem. Senses* 35, 831–840.

Stapleton, J.R., Lavine, M.L., Wolpert, R.L., Nicolelis, M.A.L., and Simon, S.A. (2006). Rapid taste responses in the gustatory cortex during licking. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 4126–4138.

Steiner, J.E., Glaser, D., Hawilo, M.E., and Berridge, K.C. (2001). Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 53–74.

Stratford, T.R., and Kelley, A.E. (1997). GABA in the Nucleus Accumbens Shell Participates in the Central Regulation of Feeding Behavior. *J. Neurosci.* 17, 4434–4440.

Taha, S.A., and Fields, H.L. (2005). Encoding of palatability and appetitive behaviors by distinct neuronal populations in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 25, 1193–1202.

Tellez, L.A., Perez, I.O., Simon, S.A., and Gutierrez, R. (2012). Transitions between sleep and feeding states in rat ventral striatum neurons. *J. Neurophysiol.* *108*, 1739–1751.

Vincis, R., and Fontanini, A. (2016). A gustocentric perspective to understanding primary sensory cortices. *Curr. Opin. Neurobiol.* *40*, 118–124.

Weingarten, H.P. (1984). Meal initiation controlled by learned cues: basic behavioral properties. *Appetite* *5*, 147–158.

Weiss, M.S., and Di Lorenzo, P.M. (2012). Not so fast: taste stimulus coding time in the rat revisited. *Front. Integr. Neurosci.* *6*.

Wu, A., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., and Roper, S.D. (2015). Breadth of tuning in taste afferent neurons varies with stimulus strength. *Nat. Commun.* *6*, 8171.

Yoshida, T., and Katz, D.B. (2011). Control of prestimulus activity related to improved sensory coding within a discrimination task. *J. Neurosci.* *31*, 4101–4112.

Young, P.T., and Trafton, C.L. (1964). Activity contour maps as related to preference in four gustatory stimulus areas of the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* *58*, 68–75.

Zuker, C.S. (2015). Food for the Brain. *Cell* *161*, 9–11.

11 ANEXO

Figures	Panels	Statistic test		Post hoc test	
8	B	Two-way ANOVA (Lick rate)	Task factor: F(2,4)=911.5, p < 0.0001 Trial Type factor: F(2,4)=1325.8, p < 0.0001 Interaction task*trial type: F(8,29467)=18.8, p < 0.0001	Fisher's LSD test	Start vs. Start/Stop p<0.0001 Gustatory vs. Start/Stop p<0.0001 Gustatory vs. Start p<0.0001 0% vs. 3% p<0.0001 0% vs. 5.8% p<0.0001 0% vs. 10.7% p<0.0001 0% vs. 20% p<0.0001 3% vs. 5.8% p<0.0001 3% vs. 10.7% p<0.0001 3% vs. 20% p<0.0001 5.8% vs. 10.7% p<0.0001 5.8% vs. 20% p<0.0001 10.7% vs. 20% p=0.0008
8	C	Two-way ANOVA (First lick bout duration)	Task factor: F(2,4)=686.5, p < 0.0001 Trial Type factor: F(2,4)=316.5, p < 0.0001 Interaction task*trial type: F(8,29467)=16.4, p < 0.0001	Fisher's LSD test	Start vs. Start/Stop p<0.0001 Gustatory vs. Start/Stop p<0.0001 Gustatory vs. Start p<0.0001 0% vs. 3% p<0.0001 0% vs. 5.8% p<0.0001 0% vs. 10.7% p<0.0001 0% vs. 20% p<0.0001 3% vs. 5.8% p<0.0001 3% vs. 10.7% p<0.0001 3% vs. 20% p<0.0001 5.8% vs. 10.7% p<0.0001 5.8% vs. 20% p<0.0001 10.7% vs. 20% p=0.725
8	C	One-way ANOVA (Water rejection time)	Task factor: F(2,5917)=144.2, p < 0.0001	Fisher's LSD test	Gustatory vs. Start p<0.0001 Gustatory vs. Start/Stop p=0.002 Start vs. Start/Stop p<0.0001
8	C	Chi-squared (Proportions of single lick bouts)	Gustatory vs. Start $\chi^2(1, N=21055) = 0.79, p = 0.37$ Gustatory vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=17440) = 4.09, p = 0.04$ Start vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=20469) = 8.16, p = 0.0043$		
9	A	Two-way ANOVA (Bout index)	Task factor: F(2,4)=132.4, p < 0.0001 Trial Type factor: F(2,4)=92.3, p < 0.0001 Interaction task*trial type: F(6,1530)=5.8, p < 0.0001	Fisher's LSD test	Start vs. Start/Stop p<0.0001 Gustatory vs. Start/Stop p=0.0002 Gustatory vs. Start p<0.0001 0% vs. 3% p<0.0001 0% vs. 5.8% p<0.0001 0% vs. 10.7% p<0.0001 0% vs. 20% p<0.0001 3% vs. 5.8% p<0.0001 3% vs. 10.7% p<0.0001 3% vs. 20% p<0.0001 5.8% vs. 10.7% p<0.0001 5.8% vs. 20% p<0.0001 10.7% vs. 20% p=0.284
9	B	Kolmogorov-Smirnov (Cumulative sums of wet licks)	Gustatory vs. Start D = 0.23, p=0.083 Gustatory vs. Start/Stop D = 0.25, p=0.05 Start vs. Start/Stop D = 0.41, p<0.0001		
9	C	Two-way ANOVA (Calorie intake)	Task factor: F(2,3)=72, p < 0.0001 Trial Type factor: F(2,3)=2730.3, p < 0.0001 Interaction task*trial type: F(6,1176)=12.6, p < 0.0001	Fisher's LSD test	Start vs. Start/Stop p=0.0002 Gustatory vs. Start/Stop p<0.0001 Gustatory vs. Start p<0.0001 0% vs. 3% p<0.0001 0% vs. 5.8% p<0.0001 0% vs. 10.7% p<0.0001 0% vs. 20% p<0.0001 3% vs. 5.8% p<0.0001 3% vs. 10.7% p<0.0001 3% vs. 20% p<0.0001 5.8% vs. 10.7% p<0.0001 5.8% vs. 20% p<0.0001 10.7% vs. 20% p<0.0001
9	D	One-way ANOVA (Latency to stop licking the empty sipper)	Task factor: F(2,291)=46.5, p < 0.0001	Fisher's LSD test	Gustatory vs. Start p = 0.0002 Gustatory vs. Start/Stop p<0.0001 Start vs. Start/Stop p<0.0001
10	C	Chi-squared (Proportions of Palatability-related neurons)	Gustatory vs. Start $\chi^2(1, N=230) = 2.12, p = 0.14$ Gustatory vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=188) = 0.56, p = 0.45$ Start vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=176) = 3.93, p = 0.047$		
11	C	Chi-squared (Proportions of Concentration-related neurons)	Gustatory vs. Start $\chi^2(1, N=98) = 0.03, p = 0.86$ Gustatory vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=96) = 0.32, p = 0.57$ Start vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=82) = 0.14, p = 0.7$		
10 y 11	10C & 11C	Chi-squared	Palatability vs. Concentration $\chi^2(1, N=435) = 47.8, p < 0.001$		

Continúa en página siguiente.

Figures	Panels	Statistic test		Post hoc test	
13	B	Chi-squared (Proportions of Lick-Active and Lick-Inactive neurons)	Active Gustatory vs. Start $\chi^2(1, N=725) = 0.007, p = 0.9$ Active Gustatory vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=686) = 2.81, p = 0.09$ Active Start vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=569) = 2.63, p = 0.1$ Inactive Gustatory vs. Start $\chi^2(1, N=725) = 0.018, p = 0.9$ Inactive Gustatory vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=686) = 0.057, p = 0.8$ Inactive Start vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=569) = 0.118, p = 0.73$		
13	C	Chi-squared (Proportions of Lick-Active and Lick-Inactive Start cue-responsive neurons)	Active Gustatory vs. Start $\chi^2(1, N=725) = 3.53, p = 0.06$ Active Gustatory vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=686) = 0.21, p = 0.64$ Active Start vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=569) = 1.47, p = 0.22$ Inactive Gustatory vs. Start $\chi^2(1, N=725) = 44.7, p < 0.001$ Inactive Gustatory vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=686) = 14.5, p < 0.001$ Inactive Start vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=569) = 6.4, p = 0.011$		
13	D	Chi-squared (Proportions of Lick-Inactive and Start and Stop cues responsive)	Inactive Gustatory vs. Start $\chi^2(1, N=96) = 0.02, p = 0.9$ Inactive Gustatory vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=59) = 6.72, p = 0.01$ Inactive Start vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=113) = 16.4, p < 0.001$		
14	A	Two-way ANOVA (Neuronal populations' decoding performance during the Reward epoch)	Task factor: $F(2,4) = 262.5, p < 0.0001$ Functional ensemble factor: $F(2,4) = 215.9, p < 0.0001$ Interaction task*function ensemble: $F(8,105) = 20.79, p < 0.0001$	Fisher's LSD test	Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Active vs. Inactive $p < 0.0001$ Active vs. Coherent $p < 0.0001$ Active vs. Palatability $p < 0.0001$ Active vs. Concentration $p < 0.0001$ Inactive vs. Coherent $p = 0.0055$ Inactive vs. Palatability $p < 0.0001$ Inactive vs. Concentration $p = 0.0005$ Coherent vs. Palatability $p < 0.0001$ Coherent vs. Concentration $p = 0.46$ Palatability vs. Concentration $p < 0.0001$
14	C	Kruskal-wallis (Modulated-dropped neurons decoding performance during the Reward epoch)	Gustatory task Modulated vs. Palatability: $\chi^2(2, N=340) = 11.3, p = 0.0008$ Modulated vs. Concentration: $\chi^2(2, N=340) = 0, p = 1$ Modulated vs. Coherent: $\chi^2(2, N=340) = 0, p = 1$ Modulated vs. Lick-Active: $\chi^2(2, N=340) = 1.33, p = 0.248$ Modulated vs. Lick-Inactive: $\chi^2(2, N=340) = 9.28, p = 0.0023$ Start task Modulated vs. Palatability: $\chi^2(2, N=340) = 11.29, p = 0.0008$ Modulated vs. Concentration: $\chi^2(2, N=340) = 0.4, p = 0.53$ Modulated vs. Coherent: $\chi^2(2, N=340) = 0.1, p = 0.75$ Modulated vs. Lick-Active: $\chi^2(2, N=340) = 2.48, p = 0.11$ Modulated vs. Lick-Inactive: $\chi^2(2, N=340) = 4.41, p = 0.0357$ Start/Stop task Modulated vs. Palatability: $\chi^2(2, N=340) = 11.3, p = 0.0008$ Modulated vs. Concentration: $\chi^2(2, N=340) = 0.04, p = 0.83$ Modulated vs. Coherent: $\chi^2(2, N=340) = 3.19, p = 0.074$ Modulated vs. Lick-Active: $\chi^2(2, N=340) = 3.19, p = 0.074$ Modulated vs. Lick-Inactive: $\chi^2(2, N=340) = 8.65, p = 0.0033$		
15	B	Chi-squared (Proportions of phasic inhibitory neurons)	Gustatory vs. Start $\chi^2(1, N=725) = 7.6, p = 0.006$ Gustatory vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=686) = 1.62, p = 0.2$ Start vs. Start/Stop $\chi^2(1, N=569) = 13.5, p < 0.001$		
15	B	One-way ANOVA (Phasic inhibitions at RE onset latencies)	Task factor: $F(2,47) = 6, p = 0.0048$	Fisher's LSD test	Gustatory vs. Start $p = 0.17$ Gustatory vs. Start/Stop $p = 0.01$ Start vs. Start/Stop $p = 0.0048$
Table 1	Column 1 Total	Kruskal-wallis (Lick rate 0 %)	Task factor: $\chi^2(2, N=5919) = 435.99, p < 0.0001$	Dunn's test	Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 2 Total	Kruskal-wallis (Lick rate 3 %)	Task factor: $\chi^2(2, N=5892) = 220.19, p < 0.0001$	Dunn's test	Gustatory vs. Start $p = 0.011$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 3 Total	Kruskal-wallis (Lick rate 5.8 %)	Task factor: $\chi^2(2, N=5886) = 315.31, p < 0.0001$	Dunn's test	Gustatory vs. Start $p = 0.0096$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 4 Total	Kruskal-wallis (Lick rate 10.7 %)	Task factor: $\chi^2(2, N=5919) = 523.39, p < 0.0001$	Dunn's test	Gustatory vs. Start $p = 0.98$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 5 Total	Kruskal-wallis (Lick rate 20 %)	Task factor: $\chi^2(2, N=5896) = 708.48, p < 0.0001$	Dunn's test	Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 1 Complete	Kruskal-wallis (Lick rate 0 %)	Task factor: $\chi^2(2, N=926) = 37.57, p < 0.0001$	Dunn's test	Gustatory vs. Start $p = 0.58$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p = 0.0006$
Table 1	Column 2 Complete	Kruskal-wallis (Lick rate 3 %)	Task factor: $\chi^2(2, N=1419) = 78.41, p < 0.0001$	Dunn's test	Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 3 Complete	Kruskal-wallis (Lick rate 5.8 %)	Task factor: $\chi^2(2, N=1889) = 141.8, p < 0.0001$	Dunn's test	Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 4 Complete	Kruskal-wallis (Lick rate 10.7 %)	Task factor: $\chi^2(2, N=2520) = 200.75, p < 0.0001$	Dunn's test	Gustatory vs. Start $p = 0.37$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 5 Complete	Kruskal-wallis (Lick rate 20 %)	Task factor: $\chi^2(2, N=2416) = 244.8, p < 0.0001$	Dunn's test	Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$

Continúa en página siguiente.

Figures	Panels	Statistic test	Task factor:	Post hoc test
Table 1	Column 1 Incomplete	Kruskal-wallis (Lick rate 0 %)	$\chi^2 (2, N=256.33)=4992, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 2 Incomplete	Kruskal-wallis (Lick rate 3 %)	$\chi^2 (2, N=4472)=90.15, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p = 0.0076$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 3 Incomplete	Kruskal-wallis (Lick rate 5.8 %)	$\chi^2 (2, N=3996)=107.38, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 4 Incomplete	Kruskal-wallis (Lick rate 10.7 %)	$\chi^2 (2, N=3363)=75.88, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 5 Incomplete	Kruskal-wallis (Lick rate 20 %)	$\chi^2 (2, N=3479)=64.51, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p = 0.0064$
Table 1	Column 2	Kruskal-wallis (Tastant/water ratio 3 %)	$\chi^2 (2, N=296)=74.24, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p = 0.0003$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 3	Kruskal-wallis (Tastant/water ratio 5.8 %)	$\chi^2 (2, N=296)=63.84, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p = 0.0084$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 4	Kruskal-wallis (Tastant/water ratio 10.7 %)	$\chi^2 (2, N=296)=52.68, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p = 0.0545$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 1	Column 5	Kruskal-wallis (Tastant/water ratio 20 %)	$\chi^2 (2, N=296)=38.67, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p = 0.17$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 2	Row 1	One-way ANOVA (Number of lick bouts for 0 % sucrose)	Task factor: $F(2,5841)=91.8, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 2	Row 2	One-way ANOVA (Number of lick bouts for 3 % sucrose)	Task factor: $F(2,5815)=165.7, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p = 0.18$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 2	Row 3	One-way ANOVA (Number of lick bouts for 5.8 % sucrose)	Task factor: $F(2,5838)=218.1, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p = 0.99$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 2	Row 4	One-way ANOVA (Number of lick bouts for 10.7 % sucrose)	Task factor: $F(2,5839)=186.2, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 2	Row 5	One-way ANOVA (Number of lick bouts for 20 % sucrose)	Task factor: $F(2,5847)=228.4, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p = 0.99$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 2	Row 1	One-way ANOVA (Duration of lick bouts for 0 % sucrose)	Task factor: $F(2,10353)=172.3, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 2	Row 2	One-way ANOVA (Duration of lick bouts for 3 % sucrose)	Task factor: $F(2,11914)=198.3, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p = 0.18$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 2	Row 3	One-way ANOVA (Duration of lick bouts for 5.8 % sucrose)	Task factor: $F(2,12633)=255.9, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p = 0.91$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 2	Row 4	One-way ANOVA (Duration of lick bouts for 10.7 % sucrose)	Task factor: $F(2,11774)=257.1, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p < 0.0001$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 2	Row 5	One-way ANOVA (Duration of lick bouts for 20 % sucrose)	Task factor: $F(2,11994)=303.2, p < 0.0001$	Dunn's test Gustatory vs. Start $p = 0.12$ Gustatory vs. Start/Stop $p < 0.0001$ Start vs. Start/Stop $p < 0.0001$
Table 2	Column 1	One-way ANOVA (Number of lick bouts in the Gustatory task)	Task factor: $F(2,8921)=19.86, p < 0.0001$	Dunn's test 0 vs. 3 % $p < 0.0001$ 0 vs. 5.8 % $p < 0.0001$ 0 vs. 10.7 % $p < 0.0001$ 0 vs. 20 % $p < 0.0001$
Table 2	Column 2	One-way ANOVA (Duration of lick bouts in the Gustatory task)	Task factor: $F(2,19921)=100.5, p < 0.0001$	Dunn's test 0 vs. 3 % $p = 0.83$ 0 vs. 5.8 % $p < 0.0001$ 0 vs. 10.7 % $p < 0.0001$ 0 vs. 20 % $p < 0.0001$
Table 2	Column 3	One-way ANOVA (Number of lick bouts in the Start task)	Task factor: $F(2,11932)=89.12, p < 0.0001$	Dunn's test 0 vs. 3 % $p < 0.0001$ 0 vs. 5.8 % $p < 0.0001$ 0 vs. 10.7 % $p < 0.0001$ 0 vs. 20 % $p < 0.0001$
Table 2	Column 4	One-way ANOVA (Duration of lick bouts in the Start task)	Task factor: $F(2,25857)=361.09, p < 0.0001$	Dunn's test 0 vs. 3 % $p < 0.0001$ 0 vs. 5.8 % $p < 0.0001$ 0 vs. 10.7 % $p < 0.0001$ 0 vs. 20 % $p < 0.0001$
Table 2	Column 5	One-way ANOVA (Number of lick bouts in the Start/Stop task)	Task factor: $F(2,8329)=3.14, p = 0.0137$	Dunn's test 0 vs. 3 % $p = 0.32$ 0 vs. 5.8 % $p = 0.29$ 0 vs. 10.7 % $p = 0.99$ 0 vs. 20 % $p = 0.99$
Table 2	Column 6	One-way ANOVA (Duration of lick bouts in the Start/Stop task)	Task factor: $F(2,12892)=257.77, p < 0.0001$	Dunn's test 0 vs. 3 % $p < 0.0001$ 0 vs. 5.8 % $p < 0.0001$ 0 vs. 10.7 % $p < 0.0001$ 0 vs. 20 % $p < 0.0001$
Table 3	All coherent neurons	Chi-squared (Proportions of neurons)	Gustatory vs. Start $\chi^2 (1, N=725) = 0.33, p = 0.56$ Gustatory vs. Start/Stop $\chi^2 (1, N=686) = 0.6, p = 0.44$ Start vs. Start/Stop $\chi^2 (1, N=569) = 0.04, p = 0.83$	
Table 3	All coherent neurons	One-way ANOVA (Coherence coefficients)	Task factor: $F(2,83)=3.86, p = 0.0251$	Fisher's LSD test Gustatory vs. Start $p = 0.118$ Gustatory vs. Start/Stop $p = 0.18$ Start vs. Start/Stop $p = 0.0069$

12 PUBLICACIÓN REALIZADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE Provisionally accepted The full-text will be published soon.

Front. Neurosci. | doi: 10.3389/fnins.2018.00265

Encoding of sucrose's palatability in the nucleus accumbens shell and its modulation by exteroceptive auditory cues

 Miguel Villavicencio (<https://loop.frontiersin.org/people/96388/overview>)¹,  Mario G. Moreno (<https://loop.frontiersin.org/people/484303/overview>)¹,  Sidney A. Simon (<https://loop.frontiersin.org/people/8/overview>)² and  Ranier Gutierrez (<https://loop.frontiersin.org/people/624/overview>)^{1*}

¹Department of Pharmacology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Mexico

²Department of Neurobiology, School of Medicine, Duke University, United States

Although the palatability of sucrose is the primary reason for why it is over consumed, it is not well understood how it is encoded in the nucleus accumbens shell (NAcSh), a brain region involved in reward, feeding, and sensory/motor transformations. Similarly, untouched are issues regarding how an external auditory stimulus affects sucrose palatability and, in the NAcSh, the neuronal correlates of this behavior. To address these questions in behaving rats, we investigated how food-related auditory cues modulate sucrose's palatability. The goals are to determine whether NAcSh neuronal responses would track sucrose's palatability (as measured by the increase in hedonically positive oromotor responses lick rate), sucrose concentration, and how it processes auditory information. Using brief-access tests, we found that sucrose's palatability was enhanced by exteroceptive auditory cues that signal the start and the end of a reward epoch. With only the start cue the rejection of water was accelerated, and the sucrose/water ratio was enhanced, indicating greater palatability. However, the start cue also fragmented licking patterns and decreased caloric intake. In the presence of both start and stop cues, the animals fed continuously and increased their caloric intake. Analysis of the licking microstructure confirmed that auditory cues (either signaling the start alone or start/stop) enhanced sucrose's oromotor-palatability responses. Recordings of extracellular single-unit activity identified several distinct populations of NAcSh responses that tracked either the sucrose palatability responses or the sucrose concentrations by increasing or decreasing their activity. Another neural population fired synchronously with licking and exhibited an enhancement in their coherence with increasing sucrose concentrations. The population of NAcSh's Palatability-related and Lick-Inactive neurons were the most important for decoding sucrose's palatability. Only the Lick-Inactive neurons were phasically activated by both auditory cues and may play a sentinel role monitoring relevant auditory cues to increase caloric intake and sucrose's palatability. In summary, we found that auditory cues that signal the availability of sucrose modulate its palatability and caloric intake in a task dependent-manner and had neural correlates in the NAcSh. These findings show that exteroceptive cues associated with feeding may enhance positive hedonic oromotor-responses elicited by sucrose's palatability.

Keywords: Sucrose palatability, auditory cues, Taste, feeding, licking, Obesity

Received: 07 Oct 2017; **Accepted:** 05 Apr 2018